

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
MESTRADO PROFISSIONAL EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE LEITE E
DERIVADOS

EVERALDO ZENI

**EFEITO DO BINÔMIO TEMPO E TEMPERATURA DE
CONSERVAÇÃO SOBRE O ASPECTO DE QUALIDADE
HIGIÊNICO-SANITÁRIO DE LEITE DE CABRA**

Juiz de Fora - MG

2014

EVERALDO ZENI

**EFEITO DO BINÔMIO TEMPO E TEMPERATURA DE
CONSERVAÇÃO SOBRE O ASPECTO DE QUALIDADE
HIGIÊNICO-SANITÁRIO DE LEITE DE CABRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Área de concentração: Qualidade do Leite e Derivados

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Moreira Furtado

Coorientador: Dr. Márcio Roberto Silva

Coorientador: Dr. Guilherme Nunes de Souza

Juiz de Fora - MG

2014

Zeni, Everaldo.

Efeito do binômio tempo e temperatura de conservação sobre o aspecto de qualidade higiênico-sanitário de leite de cabra / Everaldo Zeni. -- 2014.

57 p. : il.

Orientador: Marco Antônio Moreira Furtado

Coorientador: Márcio Roberto Silva

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2014.

1. Leite de cabra. 2. Qualidade do leite. 3. Contagem de células somáticas. 4. Contagem total de bactérias. I. Furtado, Marco Antônio Moreira, orient. II. Silva, Márcio Roberto, coorient. III. Título.

**EFEITO DO BINÔMIO TEMPO E TEMPERATURA DE
CONSERVAÇÃO SOBRE O ASPECTO DE QUALIDADE HIGIÊNICO-
SANITÁRIO DE LEITE DE CABRA**

Everaldo Zeni

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marco Antônio Moreira Furtado

Dissertação de Mestrado submetida ao Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Aprovada em 11/12/2014



Dr. João Batista Ribeiro
Embrapa Gado de Leite



Dr. Márcio Roberto Silva
Embrapa Gado de Leite



Dr. Marco Antônio Moreira Furtado
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico este trabalho a minha esposa Josane que me acompanhou neste momento tão importante de nossas vidas, enfrentando os desafios e sempre incentivando na busca do conhecimento e a meus filhos Isabelle e Gabriel, fontes de inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida, do amor, pelos momentos de alegria e persistência, a Ele toda Honra e Glória.

A minha esposa Josane pela paciência, compreensão e dedicação aos cuidados de nossos filhos, nos momentos de minha ausência.

Aos meus pais, Selvino e Cecília (in memoriam), os quais não tiveram a oportunidade de frequentar uma escola, mas não mediram esforços para que seus filhos buscassem o conhecimento.

Aos meus irmãos, Sadi, Mariza e Adriana, pela eterna amizade e carinho.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, por acreditar em seus servidores, proporcionando o afastamento para qualificação.

Ao professor Dr. Marco Antônio Moreira Furtado, pela oportunidade, amizade, orientação e dedicação ao trabalho, sempre mostrando o caminho a ser seguido.

Ao professor Dr. Márcio Roberto Silva, pela coorientação, dedicação, amizade e ensinamentos ao longo deste trabalho, fazendo que sempre houvesse brilhos nos olhos para o bom andamento da pesquisa.

Ao professor Dr. Guilherme Nunes de Souza, pela coorientação, pelas palavras de incentivo, amizade e acima de tudo o compartilhamento de seu conhecimento.

Aos colegas de trabalho que compreenderam o nosso objetivo incentivando a minha caminhada. Aos que torceram contra, a certeza da vitória.

Aos colegas do curso, verdadeiros companheiros e novos amigos, com os quais aprendemos a conviver com as diferenças de pensamento e comportamento, os meus sinceros votos de apreço e sucesso.

As bibliotecárias da Embrapa Gado de Leite, Margarida e Inês, pela ajuda na busca de livros e periódicos os quais não eram acessíveis sem custo.

Aos professores das disciplinas cursadas, pelos ensinamentos transmitidos.

À UFJF, ao Instituto de Laticínios Cândido Tostes/EPAMIG, à Embrapa Gado de Leite e ao Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, pela oportunidade de realização deste trabalho.

“Enquanto a população cresce em progressão geométrica, a produção de alimentos cresce em progressão aritmética”.

Thomas Malthus

Efeito do binômio tempo e temperatura de conservação sobre o aspecto de qualidade higiênico-sanitário de leite de cabra

RESUMO

A contagem de células somáticas (CCS) é utilizada como indicador de qualidade tanto do leite de vacas como de cabras. A contagem total de bactérias (CTB) é de particular interesse para o produtor e para a indústria, pois reflete as condições gerais de higiene no processo de produção do leite na fazenda. A interferência do tempo e temperatura na conservação do leite para análise de CCS e CTB pode ser usada para mensurar a qualidade higiênico-sanitário do leite. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do binômio tempo e temperatura de conservação sobre o aspecto de qualidade higiênico-sanitário do leite de cabra. Foram coletadas 20 amostras de 1,8 litros de leite de cabras das raças Saanen e Toggenburg em garrafas plásticas para análise de CCS, CTB e CIB, de cada animal. Após chegada das amostras no laboratório, o leite foi homogeneizado e distribuído em 40 frascos esterilizados, sendo 20 frascos contendo um comprimido do conservante azidiol e 20 frascos contendo um comprimido do conservante bronopol, totalizando 320 alíquotas para cada conservante, respectivamente. Os frascos com amostras de leite foram colocados em geladeiras e incubadoras com diferentes temperaturas (5, 10, 20 e 30°C). Essas amostras foram analisadas com 1, 3, 5 e 7 dias após a coleta. A CCS e CTB foram realizadas pelo método de citometria de fluxo. O delineamento utilizado foi o de parcelas subdivididas. Os resultados de CCS, CTB e CIB foram transformados em logaritmo neperiano para comparação de médias. Foi utilizado o teste Student-Newman-Keuls (SNK) para comparação das médias da CCS, CTB e CIB de acordo com a temperatura e tempo de armazenamento. O maior impacto sobre a variação da CCS foi devido ao tempo dentro da temperatura apresentando diferença significativa nas temperaturas 20 e 30°C, tendo uma diminuição da CCS de 3,5 e 3,9% a cada dia de aumento no tempo de armazenamento a uma temperatura de 20 e 30°C, respectivamente. O maior impacto sobre a variação da CTB foi devido ao tempo dentro da temperatura apresentando diferença significativa nas temperaturas 10 e 30°C, tendo uma diminuição da CTB de 8,9% a cada dia de aumento no tempo de armazenamento a uma temperatura de 10°C e um aumento da CTB de 33,3% a cada dia de aumento no tempo de armazenamento a uma temperatura de 30°C. O maior impacto sobre a variação da CIB foi devido ao tempo dentro da temperatura apresentando diferença significativa nas temperaturas 10 e 30°C, tendo uma diminuição da CIB de 11,1% a cada dia de aumento no tempo de armazenamento a uma temperatura de 10°C e um aumento da CIB de 44,3% a cada dia de aumento no tempo de armazenamento a uma temperatura de 30°C. Amostras armazenadas em temperaturas superiores a 20°C podem gerar diminuição nos resultados de CCS e aumento nos resultados de CTB. Os resultados mostram a necessidade de se encaminhar as amostras de leite para CCS e CTB sob refrigeração e de ser feita análise até sete dias após a coleta.

Palavras-chave: Contagem de células somáticas. Contagem total de bactérias. Qualidade do leite. Leite de cabra.

Effect of binomial time and storage temperature on the quality aspect hygienic-sanitary goat

ABSTRACT

The somatic cell count (SCC) is used as an indicator of milk quality for both cows and goats. The total count of bacteria (TCB) is of particular interest to the producer and to the industry, because it reflects the general conditions of hygiene in the production process of milk on the farm. The interference of time and temperature on the preservation of milk for analysis of SCC and TCB may measure the quality and hygienic-sanitary milk. The objective of this study was to evaluate the effect of the binomial time and storage temperature on the aspect of quality and hygienic-sanitary of goat's milk. We collected 20 samples of milk from goats in the races Saanen and Toggenburg in plastic bottles for analysis of SCC, TCB and ICB, totaling approximately 1.8 liters of each animal. After arrival of the samples in the laboratory, the milk was homogenized and distributed in 40 bottles sterilized, being 20 vials containing a compressed of preservative azidol and 20 vials containing a compressed of preservative bronopol, totaling 320 aliquots with samples for each preservative, respectively. The bottles with milk samples were placed in refrigerators and incubators with different temperatures (5, 10, 20 and 30°C) and analyzed with 1, 3, 5 and 7 days after collection. The SCC and TCB were determined by the method of flow cytometry. The experimental design was a split-plot. The results of SCC, TCB and ICB were transformed into Neperian Logarithm for comparison of means. Was SNK test for comparison of means of SCC, TCB and ICB in accordance with the temperature and time of storage. The greatest impact on the variation of SCC was due to time within the temperature showing significant difference in temperatures 20 and 30°C, having a decrease in SCC 3.5 and 3.9% each day increase in time of storage at a temperature of 20 and 30°C, respectively. The greatest impact on the variation of TCB was due to the length of time within the temperature showing significant difference in temperatures 10 and 30°C, having a decrease in the TCB of 8.9% for each day of an increase in the time of storage at a temperature of 10°C and an increase in the TCB of 33.3% each day increase in time of storage at a temperature of 30°C. The greatest impact on the variation of the ICB was due to time within the temperature showing significant difference in temperatures 10 and 30°C, having a decrease in the ICB of 11.1% each day increase in long-term storage at a temperature of 10°C and an increase in the ICB of 44.3% each day to increase the time of storage at a temperature of 30°C. Samples stored at temperatures higher than 20°C can generate decrease in results of SCC and increase in results of TCB. The results show the need to forward the samples of milk for SCC and TCB under cooling and be done analysis up to seven days after collection.

Keywords: Somatic cell count. Total Count of bacteria. Milk Quality. Goat milk.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Variação no efetivo de cabeças de cabras e produção de leite dos rebanhos caprinos brasileiros no período de 2000 a 2012.....	19
Figura 2 – Glândulas que podem perder parte do seu citoplasma durante o processo de excreção, mas que, regeneram a porção perdida.....	23
Gráfico 1 – Efeito do tempo de armazenamento em cada temperatura de conservação na CCS.....	36
Gráfico 2 – Efeito da temperatura de conservação em cada tempo de armazenamento na CCS.....	37
Gráfico 3 – Efeito do tempo de armazenamento em cada temperatura de conservação na CTB.....	43
Gráfico 4 – Efeito da temperatura de conservação em cada tempo de armazenamento na CTB.....	44
Gráfico 5 – Efeito do tempo de armazenamento em cada temperatura de conservação na CIB.....	47
Gráfico 6 – Efeito da temperatura de conservação em cada tempo de armazenamento na CIB.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos países produtores de leite de cabra e valores relativos em função da produção mundial durante o ano de 2012.....	18
Tabela 2 – Perda calculada do leite e coalhada do rebanho caprino devido o nível de infecção.....	25
Tabela 3 – Média da contagem total de mesófilos e psicotróficos em amostras de leite de rebanhos caprinos de acordo com a temperatura e tempo de armazenamento.....	27
Tabela 4 – Médias originais da CCS ($\times 10^3$ CCS/mL) para amostras armazenadas em diferentes temperaturas ao longo do tempo de conservação.....	35
Tabela 5 – Análise da regressão para o desdobramento da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) dentro do dia.....	39
Tabela 6 – Análise da regressão para o desdobramento do tempo (dia) dentro da temperatura ($^{\circ}\text{C}$).....	39
Tabela 7 – Médias originais da CTB ($\times 10^3$ UFC/mL) para amostras armazenadas em diferentes temperaturas ao longo do tempo de conservação.....	40
Tabela 8 – Análise da regressão para o desdobramento da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) dentro do dia.....	41
Tabela 9 – Análise da regressão para o desdobramento do tempo (dia) dentro da temperatura ($^{\circ}\text{C}$).....	45
Tabela 10 – Médias originais da CIB ($\times 10^3$ bactérias/mL) para amostras armazenadas em diferentes temperaturas ao longo do tempo de conservação.....	46
Tabela 11 – Análise da regressão para o desdobramento da temperatura ($^{\circ}\text{C}$) dentro do dia.....	49
Tabela 12 – Análise da regressão para o desdobramento do tempo (dia) dentro da temperatura ($^{\circ}\text{C}$).....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CCS	Contagem de Células Somáticas
CIB	Contagem Individual de Bactérias
CPP	Contagem Padrão em Placas
CTB	Contagem Total de Bactérias
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	Food and Agriculture Organization
FAOSTAT	Food and Agricultural Organization Statistical
FDA	Food and Drug Administration
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDF	International Dairy Federation
IN	Instrução Normativa
Ln	Logaritmo neperiano
logCCS	Logaritmo de Contagem de Células Somáticas
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mL	Mililitro
MLG	Modelo Linear Geral
MN	Minnessota
PMO	Pasteurized Milk Ordinance
°C	Graus Celcius
SNK	Teste de Student-Newman-Keuls
SRD	Sem Raça Definida
UFC	Unidade Formadora de Colônia
®	Marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Produção de leite de cabra no Mundo e no Brasil.....	16
2.2. Indicadores de Qualidade Higiênico-Sanitária do Leite de Cabra	20
2.2.1 Contagem de Células Somáticas	20
2.2.2 Contagem Total de Bactérias	25
2.3 Legislação	27
2.4 Interferências do tempo e temperatura na conservação do leite para análise de CCS e CTB.....	29
3. OBJETIVO.....	31
3.1 Objetivo Geral:	31
3.2 Objetivos Específicos:	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1. Coleta de amostras e análise laboratorial	32
4.2. Análise estatística	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1 Contagem de Células Somáticas	35
5.2 Contagem Total de Bactérias.....	40
5.3 Contagem Individual de Bactérias.....	45
6 CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1 INTRODUÇÃO

O aumento da exploração da caprinocultura leiteira demanda uma maior preocupação com a qualidade da matéria-prima, tanto do ponto de vista físico-químico quanto microbiológico.

Os esforços para aumentar a produção e a qualidade do leite de cabra têm incluído programas genéticos e de saúde baseados em monitoramento de variáveis do leite. A determinação precisa dos seus elementos constitutivos é importante tanto para o produtor de leite quanto a indústria de laticínios por causa de implicações econômicas, de saúde e de gestão. A contagem de células somáticas (CCS) do leite de cabras não infectadas é maior do que a CCS das vacas e ovelhas não infectadas, e os fatores fisiológicos e produtivos têm sido relacionados ao aumento da CCS da cabra (SÁNCHEZ et al., 2005). A CCS do leite é amplamente utilizada como uma medida de saúde do úbere e da qualidade do leite de cabra (HAENLEIN, 2002; PAAPE et al., 2007).

Nos Estados Unidos da América (EUA) o limite legal de CCS estabelecido pela Food and Drug Administration (FDA) para cabras leiteiras é de 1.500.000 CCS/mL (FDA, PMO Grade "A"..., 2009; 2013). Os valores para CCS na União Europeia, conforme o Regulamento (EC) n.º 853/2004 do Parlamento e do Conselho Europeu, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos gêneros alimentícios de origem animal ainda não estão estabelecidos (OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN UNION, 2004) e confirmado por Pirisi et al. (2007). No entanto Kalantzopoulos et al., (2002) apresentaram o trabalho Características dos leites de ovinos e caprinos: Qualidade e higiene, apostas para o setor leiteiro dos ovinos e caprinos, propondo os níveis de CCS entre 1.000.000 a 2.000.000/mL na França.

No Brasil a Instrução Normativa nº 37 de 31 de outubro de 2000 (IN 37/2000) não define os valores para CCS.

Os valores de CCS inferior a 400.000 células/mL podem ser utilizadas para classificar cabras não infectadas no início da lactação (McDOUGALL et al., 2001).

Atualmente, o bronopol tem sido utilizado como um conservante para análise de CCS em amostras de leite pelos laboratórios de qualidade do leite no Brasil.

Nos EUA o limite legal da contagem total de bactérias (CTB) estabelecido pela FDA para cabras leiteiras não pode exceder 100.000 UFC/mL por produtor individual antes de misturar com outros produtores e não pode exceder a 300.000 UFC/mL antes da pasteurização (FDA, PMO Grade "A"... , 2009; 2013). Na União Europeia conforme o Regulamento (EC) n.º 853/2004 do Parlamento e do Conselho Europeu, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos gêneros alimentícios de origem animal (OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN UNION, 2004) e relatado por Pirisi et al., (2007) os valores são atribuídos em número de bactérias por mililitro e devem ser menor que 500.000 CIB/mL.

As exigências higiênico-sanitárias para o leite cru de cabra definidas na Instrução Normativa nº 37/2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2000) incluem um limite máximo de 500.000 unidades formadoras de colônias (UFC)/mL.

O conservante escolhido para esse fim é o azidiol (azida sódica e cloranfenicol). Devido ao grande número de produtores existentes no Brasil, as distâncias entre os pontos de coleta e os laboratórios da Rede Brasileira de Qualidade do Leite (RBQL), e as dificuldades de logística de transporte, nem sempre é possível atender o prazo mínimo entre a coleta de amostras no campo e a realização dos exames no laboratório.

A qualidade do leite cru está relacionada com o grau de contaminação inicial e com o binômio tempo e temperatura que o leite permanece desde a ordenha até o processamento. Quanto maior o número de contaminantes e quanto mais alta for a temperatura que o leite permanece, menor será o seu tempo de conservação. Em geral, a qualidade do leite está associada com a carga microbiana presente no produto (MUTUKUMIRA et al., 1996).

A carga microbiológica do leite cru é de extrema importância na qualidade final de produtos lácteos. Um leite de baixa qualidade microbiológica não se conserva por longos períodos, mesmo sob refrigeração, devido a sua contaminação principalmente pelas bactérias psicrófilas, que apesar de seu crescimento lento, produzem grandes quantidades de enzimas (lipases e proteases), que rapidamente alteram o produto (CRAVEN ; MACAULEY, 1993).

Sabendo que a informação sobre a variação da CCS, CTB e CIB em leite de cabra de acordo com a temperatura e tempo de armazenamento pode ajudar na interpretação dos resultados, e que informações sobre a variação da CCS, CTB e CIB em leite de cabra em função do tempo e temperatura de armazenamento são escassas no Brasil, estas informações podem ser usadas para estabelecer protocolos de coleta de amostras de leite de cabra.

Desta forma, fica evidente que o binômio tempo e temperatura são importantes fontes de variação para CCS, CTB e CIB em amostras de leite de cabra cru, mesmo com adição de bronopol e azidiol. Apesar de se recomendar a adição do conservante (azidiol) em amostras de leite cru no momento da coleta com a finalidade de inibir a multiplicação bacteriana, recomenda-se manter as amostras em temperatura de refrigeração, no máximo a 7°C, e que estas sejam analisadas no máximo 96 horas após a coleta (MESQUITA et al., 2003). Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da temperatura de armazenamento e tempo decorrido entre a coleta e análise em amostras de leite cru contendo bronopol sobre a CCS e azidiol sobre a CTB e CIB bem como ampliar o conhecimento sobre o comportamento da CCS, CTB e CIB frente a diferentes situações de temperatura de armazenamento e tempo entre coleta e análise.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção de leite de cabra no Mundo e no Brasil

A cabra é a terceira espécie produtora de leite em volume de produção mundial. Estima-se que em 2010 foram produzidos 16.646.618 toneladas de leite de cabra no mundo, o que corresponde a 2,3% da produção mundial de leite (EMBRAPA, 2012).

Para Silveira (2008), aproximadamente 94,2% dos caprinos do mundo encontram-se em regiões em desenvolvimento, evidenciando a capacidade do caprino de adaptação a condições diversas e de rusticidade. Porém, os 5,8% dos caprinos localizados em regiões desenvolvidas são responsáveis por 26,3% do leite produzido pela espécie, o que demonstra aumento da produtividade em condições favoráveis. No cenário agrícola mundial, é notória a evolução da caprinocultura leiteira.

Em determinados países, os sistemas de criação, transformação e distribuição encontram-se em estágio avançado de desenvolvimento. Em 2012, de acordo com os dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), o Brasil foi o 22º maior produtor de leite no mundo, produzindo 150.000 toneladas de leite de cabra (Tabela 1).

Os caprinos foram introduzidos no Brasil na época da colonização. Os animais que chegaram ao país neste período passaram por um longo período de adaptação e hoje se encontram naturalizados, formando os grupos genéticos regionais (COSTA et al., 2008). Porém, a busca por raças mais produtivas fez com que, a partir do final do século XIX e início do século XX, houvessem importações de raças consideradas exóticas que, por cruzamentos absorventes, causaram uma rápida substituição e erosão nas raças naturalizadas (EGITO et al., 2002).

A preocupação crescente em conservar os recursos genéticos locais, fez com que em 1983 fosse criado o Programa Nacional de Conservação e Uso dos Recursos Genéticos Animais do Brasil que deu origem a uma rede de conservação desse patrimônio genético (MENEZES, 2005). Atualmente esta rede de conservação

encontra-se consolidada, mas quando se trata do *status* sanitário desses animais quase nada se sabe quanto à incidência de enfermidades, principalmente de doenças infectocontagiosas, como a mastite, que são frequentemente relatadas nos rebanhos sem raça definida (SRD) e importados.

No Brasil, de acordo com a FAO o efetivo de caprinos em 2012 foi de 8,646 milhões de cabeças, mostrando uma redução de 5,6% do rebanho em relação a 2009. Entretanto, neste mesmo período foi observado um aumento na produção de leite de 143.768 para 150.000 toneladas, o que representa um aumento de 4,2% neste período (Figura 1). Portanto, observa-se que houve um aumento da produtividade no leite de cabra por rebanho, melhoria na genética, na alimentação, nas instalações, na reprodução e sanidade do rebanho no País.

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2012), o efetivo de caprinos reduziu 7,9% em 2012 comparativamente ao ano de 2011. A redução do efetivo ocorreu em todas as regiões brasileiras, apresentando os seguintes percentuais: Norte 10%, Nordeste 8,2%, Sudeste 2,1%, Sul 2,7% e Centro-Oeste 10,8%. No entanto a Região Nordeste do País continua sendo a mantenedora do maior efetivo de cabras, com mais de 90,0% do total nacional, tanto para produção de leite como de carne.

No Brasil, geralmente a produção de leite de cabra é explorada de maneira semi-intensiva, exceto nas propriedades rurais próximas aos grandes centros urbanos, onde predomina o sistema de produção intensivo. No Sudeste, a produção é inteiramente intensiva, enquanto no Centro-Oeste e no Sul do país esse sistema é ainda incipiente (SILVA, 1998). Em relação à região Sudeste do país, as propriedades rurais da Zona da Mata de Minas Gerais, das regiões Serrana e Noroeste do Rio de Janeiro e das regiões Sul e Serrana do Espírito Santo têm sofrido reduções consideráveis no tamanho. A redução do tamanho das propriedades rurais e a topografia característica destas regiões são fatores limitantes à produção de bovinos de corte ou de leite na escala necessária para torná-las um negócio rentável e atrativo aos produtores de toda esta macrorregião, uma vez que a política agrícola brasileira não estabelece a concessão de subsídios aos produtores rurais para cobrir os déficits financeiros gerados pelos sistemas de produção (GONÇALVES et al., 2008).

Tabela 1 – Classificação dos países produtores de leite de cabra e valores relativos em função da produção mundial durante o ano de 2012

Posição	País	Tonelada	Participação (%)
1º	Índia	4.850.000	26,75
2º	Bangladesh	2.608.000	14,39
3º	Sudão	1.532.000	8,45
4º	Paquistão	779.000	4,30
5º	Mali	715.000	3,94
6º	França	624.016	3,44
7º	China	500.000	2,76
8º	Somália	443.625	2,45
9º	Espanha	407.000	2,25
10º	Grécia	369.429	2,04
11º	Turquia	575.000	3,17
12º	Níger	288.974	1,59
13º	Indonésia	282.000	1,56
14º	Quênia	267.904	1,48
15º	Algéria	267.000	1,47
16º	Rússia	248.001	1,37
17º	Ucrânia	227.700	1,26
18º	Irã	225.000	1,24
19º	Holanda	217.330	1,20
20º	Jamaica	182.000	1,00
21º	México	155.636	0,86
22º	Brasil	150.000	0,83
Total		15.914.615	87,79
Demais Países (84)		2.214.004	12,21
Total Mundial (106)		18.128.619	100,0

Fonte: FAOSTAT, 2012.

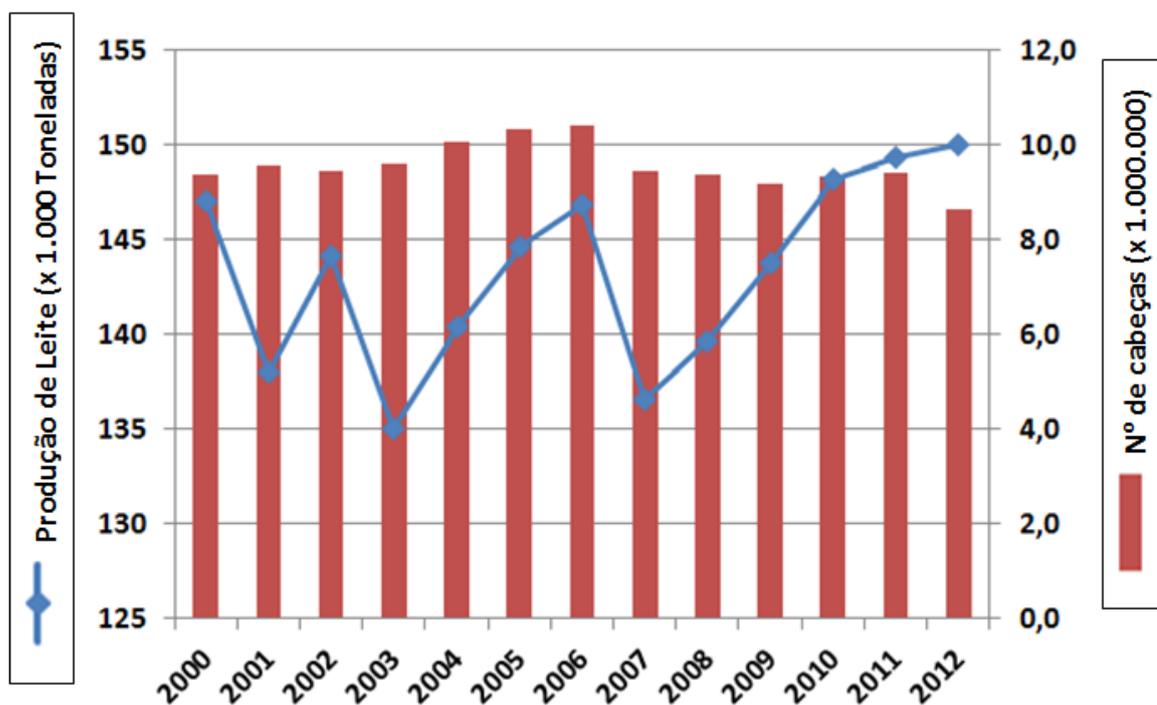


Figura 1 – Variação no efetivo do quantitativo de cabras e produção de leite dos rebanhos caprinos brasileiros no período de 2000 a 2012

Existem vários fatores, dentro e fora da propriedade, que limitam o aumento da produtividade e da oferta de leite ou de carne caprina no Brasil. Apesar de ter sido observado melhorias, o potencial genético dos rebanhos, a sazonalidade da produção, a qualidade das forrageiras tropicais, o clima, o manejo, o intervalo de partos, a idade ao primeiro parto, o controle das enfermidades, o gerenciamento dos rebanhos, a nutrição e a alimentação dos rebanhos são fatores que precisam ser estudados para a realização de melhorias significativas na produtividade dos rebanhos caprinos. A construção da sustentabilidade na caprinocultura leiteira depende da análise dos principais desafios e das possibilidades, que podem ser obtidas por meio de estudos dos segmentos da cadeia produtiva. Por isso, é necessária a inclusão dos fatores de produção na composição dos custos de produção de leite em sistemas intensivos de produção de caprinos.

Com o desenvolvimento da criação de caprinos e o aumento na produção leiteira, tem ocorrido uma maior preocupação com a qualidade do leite, o que requer o controle de alguns fatores que podem alterar suas características, e o principal deles é a mastite (LANGONI et al., 2006).

2.2. Indicadores de Qualidade Higiênico-Sanitária do Leite de Cabra

2.2.1 Contagem de Células Somáticas

Células somáticas são aquelas encontradas no leite e que se originam do sangue e da glândula mamária. A maioria destas células passa do sangue para a cisterna da glândula mamária em resposta a um estímulo e uma pequena proporção desprende-se da glândula à medida que envelhecem. Essas últimas são conhecidas como células epiteliais. As células que se originam do sangue são as células brancas ou leucócitos e possuem a capacidade de defender o animal de ataques externos. Estas ofensivas podem ser causadas por microrganismos, traumas e substâncias químicas. As causas mais comuns de agressão à glândula mamária são os microrganismos e dentre estes as bactérias são os mais importantes (SOUZA et al., 2009).

Estudos que identificaram os tipos de células no leite mostraram que células epiteliais ou células que produzem leite não são frequentemente encontradas nas secreções do úbere; incluindo aquelas do úbere seco, e variam de 0 a 7 % de todo o conjunto de células. Durante a inflamação, o maior aumento da contagem de células somáticas (CCS) é devido ao fluxo de neutrófilos para a glândula mamária (HARMON, 1998).

Os tipos de células brancas ou leucócitos encontrados no leite são os polimorfonucleares, linfócitos e macrófagos. Junto com as células epiteliais, os polimorfonucleares, linfócitos e macrófagos formam o que chamamos de células somáticas. A composição e o número total dos três tipos principais (polimorfonucleares, linfócitos e macrófagos) variam de animal para animal, estágio de lactação e com a saúde da glândula mamária. Os polimorfonucleares são reconhecidos como o grupo de células mais importante no mecanismo de defesa e limpeza da glândula mamária (SOUZA et al., 2009).

No leite de cabra, a CCS é fisiologicamente mais alta do que no leite de vaca, sendo ainda observadas variações nas populações de células presentes. Apesar de ainda não existirem padrões estabelecidos para a sua enumeração, de acordo com Zeng (1996), é normal a ocorrência de contagens superiores a 1.000.000 células/mL. O número de células se acentua no final da lactação quando, mesmo na

ausência de infecções intramamárias, ocorre aumento significativo da CCS. As principais células inflamatórias presentes no leite são os polimorfonucleares (74%), os linfócitos (15%) e os monócitos (4,4%) (SIERRA et al., 1999).

A contagem eletrônica de células somáticas no leite é uma forma de diagnóstico da mastite subclínica, aceita internacionalmente como critério de avaliação da sanidade da glândula mamária, conseqüentemente, da qualidade do leite produzido (LANGONI, 2000). Por isso, a CCS é importante no monitoramento do "status" inflamatório das glândulas mamárias responsáveis pela produção de leite. As células somáticas têm duas principais funções no úbere: combater os microrganismos infecciosos e auxiliar na reparação dos tecidos secretores de leite, danificados pela infecção (PHILPOT, 1998).

A contagem de células somáticas é usada como indicador de qualidade tanto do leite de vacas como de cabras. Normalmente a CCS no leite de cabras não infectadas é maior que no leite de vacas não infectadas. Em média, a CCS no leite de vacas livres de infecções intramamárias varia de 40.000 a 80.000 células/mL de leite. No leite de cabras livres de infecções intramamárias a contagem varia de 50.000 a 400.000 células/mL (McDOUGALL et al., 2002). Gomes et al., (2006) observaram aumento significativo da CCS após o quarto mês de lactação em cabras da raça Saanen sem infecção intramamária e enfatizaram a necessidade da associação da CCS e outros métodos na avaliação e monitoramento da mastite e qualidade do leite em rebanhos caprinos.

O limite de células somáticas no leite do rebanho é também motivo de grande preocupação para produtores de cabras e indústria de laticínios. Nos últimos vinte anos, a CCS em caprinos tem sido incansavelmente estudada e sua relação com a qualidade do leite e saúde do úbere (McDOUGALL et al., 2002; MORONI et al., 2005; GOMES et al., 2006; RAYAL-LJUTOVAC et al., 2007; PAAPE et al., 2007), porém os estudos desta natureza para CCS do rebanho são escassos (MORGAN et al., 2003). Nos Estados Unidos desde 2009 houve mudanças no limite regulamentado para CCS, sendo de 750.000 e 1.500.000 células/mL para rebanhos bovinos e caprinos tipo A, respectivamente (FDA, PMO Grade "A"..., 2009; 2013).

A CCS do rebanho e do tanque de expansão deve ser vista como uma ferramenta valiosa que possui as seguintes finalidades: monitoramento da prevalência de mastite subclínica no rebanho; fornecer um indicativo da qualidade

do leite cru e indicar as condições higiênicas sob as quais o leite foi produzido nas fazendas leiteiras (PHILPOT, 1998).

O principal fator que afeta a CCS é a infecção da glândula mamária (HARMON, 1998). Todavia, a CCS também pode ser influenciada por número de lactações (DULIN et al., 1982), idade, raça, estro, produção de leite, condições de manejo (POUTREL et al., 1997) e pela artrite encefalite caprina e partos (PAAPE; CAPUCO, 1997).

Outra particularidade do leite caprino são as partículas citoplasmáticas, oriundas do processo de secreção láctea, que, nesta espécie, é classificada como apócrina (Figura 2). Essas estruturas têm diâmetro e morfologia semelhantes à de leucócitos, contém grande quantidade de proteína e RNA, mas nenhum DNA (DULIN et al., 1982).

Procedimentos de contagem que são específicos para identificação do DNA, como contador celular eletrônico e contagem celular por microscopia direta usando corante específico para DNA, devem ser usados para estimar a concentração de células somáticas no leite de cabra, pois estes diferenciam células nucleadas de partículas citoplasmáticas (DULIN et al., 1982).

O método de microscopia direta em que se usa o corante pyronina Y - verde de metila é um teste confirmativo reconhecido e deve ser usado como método padrão de referência de leite de cabra e amostras desconhecidas. Zeng e Escobar (1996) verificaram que a CCS no leite de cabra foi respectivamente 27,0% e 24,5% menor quando o equipamento Fossomatic 300 foi calibrado com leite padrão de cabra em relação ao mesmo equipamento calibrado com leite padrão de vaca.

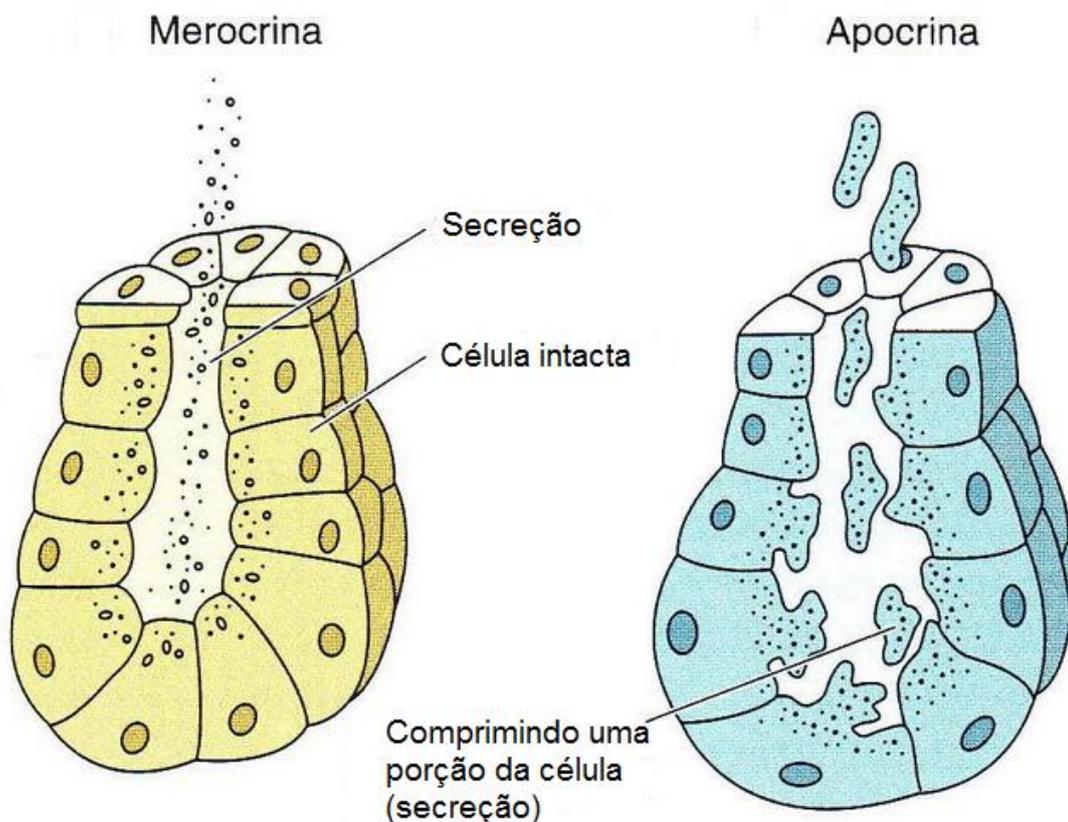


Figura 2 – Glândulas que podem perder parte do seu citoplasma durante o processo de excreção, mas que, regeneram a porção perdida.

Fonte: <http://lahistotecadenico.blogspot.com.br/2010/11/tejido-epitelial-glandular.html>

Gonzalo (1995) citou os valores para células somáticas de 614.000 a 830.000 células/mL para a média aritmética. Para cabras no terço médio da lactação, o limite de 550.000 células/mL é satisfatório, pois permite a classificação correta da infecção de 63% dos úberes examinados. A chance de erro aumenta no final da lactação, quando um decréscimo normal na produção de leite aumenta os falsos positivos em até 37%. O mesmo autor propôs o limite de 750.000 células/mL como um limiar de diferenciação mais eficiente para toda a lactação. Zeng (1996) concluiu que 37,6% das amostras ultrapassaram o limite legal de um milhão estabelecido nos EUA até 2007.

Tirard-Collet et al. (1991) concluíram que, se o limite usado fosse 750.000 células/mL, 78% das amostras de leite de cabra seriam aceitas e se esse fosse de 1.000.000 células/mL apenas 9% indicariam possível mastite e seriam rejeitadas. Zeng e Escobar (1996) observaram que amostras com mais de 1.000.000

células/mL apresentavam apenas traços de bactérias patogênicas relacionadas à mastite.

Na Noruega, a contagem de células somáticas também é parâmetro considerado para avaliar a qualidade do leite de cabra. As células somáticas são contadas duas vezes por mês e, devido às variações sazonais observadas nesse país, o pagamento é baseado na média geométrica anual e o produtor recebe um bônus de 4% sobre o preço base se a CCS for menor que 1.200.000 células/mL e 2% quando estiverem entre 1.200.000 e 1.500.000 células/mL (RAGE; LUNDER, 1995).

A CCS do leite de cabra é bem mais alta que a CCS do leite de vaca, embora seja reconhecido que o aumento da CCS no leite de vaca resulte em diminuição da produção. Não há evidências de que isso ocorra na produção de leite de cabra (PAAPE; CAPUCO, 1997). A CCS de um leite de cabra não infectado é mais alta que uma CCS de leite de vaca sem infecção, especialmente no final da lactação (PARK; HUMPHREY, 1986).

A composição das células somáticas difere entre cabras e vacas. Vacas livres de infecção intramamária possuem cerca de 5 a 20% de neutrófilos na CCS e as cabras possuem 45 a 74% de neutrófilos. Isto sugere que a migração de leucócitos no leite de cabra é bem mais rápida que no leite de vaca, contribuindo naturalmente para uma elevação da CCS. Devido a esta alta contagem de células na espécie caprina, padrões de CCS estabilizados para vacas não são apropriados para cabras (PAAPE; CAPUCO, 1997).

No geral, a CCS no leite de vacas, livres de infecção intramamária, varia de $4,0$ a $8,0 \times 10^4$ células/mL, enquanto que no leite de cabras esse valor varia de $5,0 \times 10^4$ a $4,0 \times 10^6$ células/mL (PAAPE; CAPUCO, 1997). Uma CCS de $1,5 \times 10^6$ células/mL é o limite Legal de qualidade para o leite de cabra nos Estados Unidos, (FDA, PMO Grade "A"..., 2009; 2013).

Em um estudo realizado por Leitner et al. (2008) em Israel, a CCS do tanque de um determinado rebanho caprino deve refletir diretamente a taxa de infecção intramamária subclínica nesse rebanho. De acordo com estes resultados, um regime de pagamento que leva em consideração os dados científicos e a situação higiênica real entre os rebanhos de Israel é sugerido para a classificação do leite de cabra naquele País, o que poderia ser igualmente valioso para outros locais. Leite com <

400.000 CCS/mL reflete uma taxa de infecção de todo o rebanho de zero ou próximo de zero, mas esta situação que é a ideal, praticamente não existe. Diante do estudo realizado foi proposto o seguinte: i. Leite de alta qualidade < 800.000 CCS/mL, associada com infecção de ~ 25%; ii. Leite de qualidade média < 1.500.000 CCS/mL, associado com taxa de infecção entre 25 e 50%; iii. Leite de baixa qualidade > 1.500.000 CCS/mL, associado com taxa de infecção acima de 50%; e iv. Leite contendo > 3.500.000 CCS/mL não devem ser aceitos para o consumo humano.

As perdas na produção de leite e de coalhada em um rebanho caprino em Israel estão demonstradas na tabela 2.

Tabela 2. Perda calculada do leite e coalhada do rebanho caprino devido o nível de infecção

Nível de infecção (%)	CCS projetada ($\times 10^3$)	Perda de leite (%)	Perda de coalhada (%)
25	840	0,8	3,3
50	1.200	1,5	6,5
75	1.600	2,3	9,8

Adaptado de Leitner et al. (2008)

2.2.2 Contagem Total de Bactérias

A contagem total de bactérias (CTB) é de particular interesse para o produtor e para a indústria, pois reflete condições gerais de higiene no processo de produção do leite na fazenda (HOLM et al., 2004). De forma geral, as principais fontes de contaminação bacteriana do leite cru podem ser divididas em três: quartos mamários infectados (mastite), úbere e tetos sujos no momento da ordenha, e qualquer tipo de utensílio ou equipamento que entre em contato com o leite no momento da ordenha e estocagem (HAYES et al., 2001). Após a ordenha, o armazenamento do leite em tanque de refrigeração e o tempo de armazenamento influenciarão a habilidade de multiplicação de bactérias contaminantes do leite (HEESCHEN, 1996; BOOR et al., 1998). Como a contaminação do leite por bactérias pode ter múltiplas fontes, tais como cabras com mastite, úbere sujo e higienização inadequada do equipamento de

ordenha, medidas de controle e prevenção da mastite podem apresentar grande eficácia em reduzir a CTB.

Quando o leite é mantido sem refrigeração, ocorre a acidificação devido à multiplicação de bactérias lácticas e do grupo coliformes, que fermentam a lactose produzindo ácido lático. No entanto, hoje se sabe que somente o resfriamento não garante a qualidade microbiológica do leite. Os microrganismos psicrótrócos, se presentes na carga bacteriana inicial do leite cru, são capazes de multiplicar a temperatura inferior ou igual a 7°C, independente de sua temperatura ótima de crescimento (FRANK et al., 1992).

Em um estudo realizado no Brasil, Fonseca et al., (2006) identificaram a variação da contagem total de mesófilos e psicrótrócos de acordo com a temperatura e o tempo de armazenamento (Tabela 3). Foi observado que a temperatura de armazenagem do leite cru a 4°C manteve a população de microrganismos mesófilos dentro dos limites estabelecidos na IN 37 (500.000 UFC/mL) até o terceiro dia de armazenamento, enquanto que a 10°C, esse limite já havia sido ultrapassado para o mesmo período de armazenamento. Os microrganismos psicrótrócos, diferente do que ocorreu com a população dos mesófilos, tiveram taxa de crescimento semelhante em ambas às temperaturas e atingiram contagens próximas nas duas temperaturas de estocagem após 6 dias. O trabalho de Fonseca et al. (2006) demonstra a importância da temperatura e o tempo de armazenamento do leite na contagem total de mesófilos e psicrótrócos.

Ressalta-se que os limites legais estabelecidos no Brasil (500.000 UFC/mL) (BRASIL, 2000), Estados Unidos (100.000 UFC/mL) (FDA, PMO Grade "A"..., 2009; 2013) e até mesmo do Canadá (50.000 UFC/mL) (PERKINS, 2013) podem ser considerados altos do ponto de vista microbiológico de acordo com Jayarao et al., (2004) que consideram baixa, média e alta contagem quando há até 5.000, entre 5.000 e 10.000, e acima de 10.000 UFC/mL, respectivamente. O sumário dos resultados de testes para avaliar o leite de 163 rebanhos caprinos localizados no Canadá mostrou que durante os anos de 2012 e 2013 foram analisadas 3.675 amostras. Desse total, 50, 80 e 85% das amostras apresentaram CTB's inferiores a 7.000, 25.000 e 50.000 UFC/mL, respectivamente (PERKINS, 2013). Foi observado também que aproximadamente 9% das amostras de leite analisadas para CTB apresentaram resultados superiores a 100.000 UFC/mL. De acordo com a

experiência da indústria de lácteos do Canadá, os resultados de CTB superiores a 100.000 UFC/mL foram associadas ao mau funcionamento dos ciclos de lavagem do equipamento de ordenha, práticas inadequadas de limpeza dos equipamentos e utensílios que entram em contato com leite, demora no início da refrigeração do leite e desgaste das partes de borracha do equipamento de ordenha. Os resultados desse estudo mostraram que a baixa carga bacteriana inicial e a baixa temperatura de armazenamento são a melhor combinação para a manutenção da qualidade microbiológica do leite.

Tabela 3 – Média da contagem total de mesófilos e psicotróficos em amostras de leite de rebanhos caprinos de acordo com a temperatura e tempo de armazenamento.

Microrganismos (UFC/mL)	Temperatura (°C)	Dias de armazenamento		
		0	3	6
Mesófilos	4	$5,21 \times 10^4$	$2,27 \times 10^5$	$2,76 \times 10^6$
	10	$1,58 \times 10^5$	$6,60 \times 10^7$	$6,89 \times 10^8$
Psicotróficos	4	$1,58 \times 10^4$	$1,76 \times 10^5$	$2,59 \times 10^7$
	10	$1,31 \times 10^5$	$6,09 \times 10^7$	$7,37 \times 10^8$

Fonte: Adaptado de Fonseca et al., (2006)

2.3 Legislação

O leite de cabra é, por definição, o produto da ordenha higiênica completa e ininterrupta em condições de higiene, de animais da espécie caprina sadios, bem alimentados e descansados. Entende-se, nesse caso, o conceito de sadios aos animais sem sinais clínicos de doenças e/ou resultados negativos em provas diagnósticas indicativas de doenças infectocontagiosas, bom estado de nutrição, nem na fase final da lactação, nem na fase colostrar, não recebendo medicamentos capazes de deixar resíduos no leite (BRASIL, 2000).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Instrução Normativa nº 37 (IN 37/2000) de 31 de Outubro de 2000 (BRASIL, 2000), estabeleceu requisitos mínimos de qualidade do leite destinado ao consumo humano, fixados no Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite de Cabra. Como por exemplo, podem-se citar os limites aceitáveis para acidez (13 a 18°D - graus Dornic) e densidade (1.028,0 a 1.034,0 a 15 °C), limites mínimos para os teores de proteína (2,9%), para lactose (4,3%) e para os sólidos não gordurosos (8,2%). O teor mínimo de gordura não é fixado, sendo admitidos valores inferiores a 2,9% mediante comprovação de que o teor médio de gordura de um determinado rebanho não atinja esse nível. Foi estabelecido na IN 37/2000 que o leite de cabra, quando cru, deverá apresentar Contagem Padrão em Placas (CPP) de, no máximo, 500.000 UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônias por mililitro) (BRASIL, 2000).

Entretanto, um importante indicador de qualidade higiênico sanitário do leite de cabra não foi contemplado na IN 37/2000, que é a contagem de células somáticas (CCS). Países com a cadeia produtiva de leite de cabra mais desenvolvidos consideram a CCS para fins de fiscalização e pagamento do leite baseado em indicadores de qualidade. O limite máximo para CCS nos Estados Unidos é de 1.500.000 células/mL para o leite de cabra (FDA, PMO Grade "A"..., 2009; 2013). O leite de caprinos, em comparação ao de bovino, apresenta valores superiores de CCS e, segundo Zeng (1996), não é rara a ocorrência de cabras com contagens superiores a 1.000.000 células/mL, e que essas altas contagens de CCS se acentuam no final da lactação, mesmo com ausência de infecções intramamárias. Esta diferença de valores de CCS entre vacas e cabras é devido à forma de secreção de leite pela glândula mamária. No caso da vaca, a glândula é classificada como merócrina onde somente o produto da glândula, o leite, é secretado. Na cabra, o produto da glândula, o leite, é secretado juntamente com pedaços de células glandulares, chamado de corpúsculos citoplasmáticos (ZENG, 1996).

Ressalta-se que a CCS é uma importante ferramenta para avaliação e monitoramento da saúde da glândula mamária e que pode ser utilizada para tomada de decisão em relação a medidas de controle e prevenção da mastite em nível de rebanho e de indivíduo (SCHUKKEN et al., 2003).

2.4 Interferências do tempo e temperatura na conservação do leite para análise de CCS e CTB

Conforme Chapaval et al. (2010), o controle de qualidade do leite de cabra pode ser realizado através do conhecimento do conteúdo bacteriano, sendo que o número elevado de bactérias pode ser índice de: a) leite velho; b) refrigeração inadequada; c) métodos não-higiênicos na produção, manuseio e processamento.

De acordo com a recomendação da International Dairy Federation (IDF, 2006), as amostras de leite de vaca com Bronopol®, mantidas entre 2°C e 6°C, devem ser analisadas para CCS dentro de três dias. Segundo Marshall (1992), as análises podem ser feitas até sete dias após a coleta, desde que a temperatura de armazenamento esteja entre 0 e 4,4°C.

Em um estudo conduzido por Meyer et al., (2002) para avaliar métodos e tempos de armazenamento das amostras nos resultados da análise da CCS do leite de vaca, verificaram interação entre o método de armazenamento e a idade das amostras de LnCCS, apresentando decréscimos lineares em função da idade para LnCCS e os declives foram -0,01, -0,006, -0,069 e -0,226 para refrigeração (temperatura de 4°C), congelamento (temperatura de -10°C), temperatura controlada (temperatura de 22,1 a 30,9°C) e temperatura variável (temperatura ambiente mínima de 22,1°C e aquecida a 40°C por 4h/dia), respectivamente.

Sánchez et al., (2005) verificaram que os fatores cabra, temperatura de armazenamento, conservante, interação da temperatura de armazenamento x conservante, e idade do leite na interação temperatura de armazenamento x conservante contribuiu significativamente para a variação observada logCCS. A média dos quadrados mínimos do logCCS foi maior ($P < 0,001$) à temperatura de refrigeração (5,862) do que em temperatura de congelamento (5,830).

Considerando-se que uma variação de CCS menor que 10% é aceitável para monitorar a saúde do úbere e a CCS do tanque, amostras de leite de cabra conservadas com bronopol podem ser armazenadas à temperatura de refrigeração ($5 \pm 1^\circ\text{C}$) durante 25 dias (SÁNCHEZ et al., 2005).

Em trabalho realizado por Souza et al., (2006) foi verificado que as médias da CTB em amostras de leite cru de vaca com azidiol de acordo com o tempo decorrido entre a coleta e análise e as temperaturas de armazenamento não apresentaram

diferença estatística entre as médias das amostras analisadas no dia zero e amostras armazenadas a temperatura média de 3,8°C e 10°C e analisadas com um dia após a coleta ($P > 0,05$). No mesmo estudo não foi verificada diferença ($P > 0,05$) entre as médias das amostras armazenadas a 3,8°C e 10°C de acordo com os dias de análise. Para as amostras armazenadas a temperatura média de 16,7°C verificaram diferença ($P < 0,05$) a partir do dia 5, sendo que as médias entre os dias 1 e 3 e entre os dias 5 e 7 foram iguais. O mesmo não foi observado para as amostras mantidas à temperatura média de 22,9°C. Nesta última situação, as médias da CTB diferiram estatisticamente entre os dias de análise das amostras.

De acordo com Souza et al., (2006) a temperatura foi responsável pelo maior efeito sobre a CTB, porém ressalta-se a importância do tempo decorrido entre a coleta e análise. Apesar de o azidiol inibir a multiplicação bacteriana em amostras de leite cru, fica evidente a importância do armazenamento a baixa temperatura e do período decorrido entre a coleta e realização das análises laboratoriais.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar o efeito do binômio tempo e temperatura de conservação sobre o aspecto de qualidade higiênico-sanitário de leite de cabra.

3.2 Objetivos Específicos:

Avaliar o efeito do conservante bronopol na conservação do leite para a análise de contagem de células somáticas do leite de cabra, nos tempos 1, 3, 5 e 7 dias e a quatro temperaturas de conservação (5, 10, 20 e 30°C).

Avaliar o efeito do conservante azidiol na conservação do leite para as análises de contagem total de bactérias (CTB) e contagem individual de bactérias (CIB) do leite de cabra, nos tempos 1, 3, 5 e 7 dias e a quatro temperaturas de conservação (5, 10, 20 e 30°C).

Identificar o tempo e temperatura ideal para cada análise.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta de amostras e análise laboratorial

Vinte cabras das raças Saanen e Toggenburg do mesmo rebanho foram selecionadas aleatoriamente para o estudo. Os animais estavam em diferentes estágios de lactação, variaram de 1 a 5 paridades (partos), e não mostraram nenhum sinal clínico de mastite. Antes da rotina de ordenha, vinte amostras de 1.800 mL de leite composta foram obtidos a partir das cabras selecionadas. As amostras foram mantidas a 4°C e imediatamente transportadas para o Laboratório (Laboratório de Qualidade de Leite - Embrapa Gado de Leite – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Imediatamente após a mistura, invertendo 20 vezes, cada uma das amostras foi dividida em dezesseis alíquotas de 40 mL, sendo estas então atribuídas aos dezesseis grupos experimentais.

Para análise da CCS, um total de 320 alíquotas foi obtido das 20 amostras de leite de origem. Todas as alíquotas foram colocadas em frascos de plástico de 50 mL e preservadas com bronopol® (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol).

O tempo do leite testado foi de 1, 3, 5 e 7 dias de pós-colheita. Todas as alíquotas foram preparadas e armazenadas dentro de 6 horas após a colheita. Antes do ensaio, as alíquotas de leite foram aquecidas a 40°C durante 10 minutos, sendo definido para realizar as análises o equipamento Somacount 300 do fabricante, Bentley® Instruments Inc., Chaska, MN. A CCS foi determinada pelo método do fluxo de citômetro de equipamentos eletrônicos (Somacount 300, Bentley® Instruments Inc., Chaska, MN) de acordo com a norma internacional IDF 148A (IDF, 2006).

Para análise da CTB e CIB, um total de 320 alíquotas foi obtido das 20 amostras de leite de origem. Todas as alíquotas foram colocadas em frascos de plástico de 50 mL e preservadas com azidiol (cloranfenicol e azul de bromofenol).

O tempo do leite testado foi de 1, 3, 5 e 7 dias de pós-colheita. Todas as alíquotas foram preparadas e armazenadas dentro de 6 horas após a colheita. Antes do ensaio, as alíquotas de leite foram aquecidas a 40°C durante 10 minutos, sendo

definido para realizar as análises o equipamento Bactocount IBC do fabricante Bentley® Instruments Inc., Chaska, MN. A CTB e CIB foram determinadas pelo método do fluxo de citômetro de equipamentos eletrônicos (Bactocount IBC, Bentley® Instruments Inc., Chaska, MN) de acordo com Holm et al., (2004).

4.2. Análise estatística

O delineamento utilizado neste experimento foi o de parcelas subdivididas e com medidas repetidas no tempo, em que cada animal assumiu o papel de um bloco. A parcela foi definida como sendo as temperaturas 5, 10, 20 e 30°C, e as subparcelas como os tempos decorridos entre coleta e análise, ou seja, 1, 3, 5 e 7 dias. As amostras foram armazenadas em geladeira comercial com temperatura controlada, 5°C, ou em estufa incubadora para as temperaturas 10, 20 e 30°C. Foram feitas análises de variância e comparação de médias da CCS, CTB e CIB usando-se o Teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Os resultados originais da CCS (x 1.000 células/mL), CTB (x 1000 UFC/mL) e CIB (x 1000 bactérias/mL) foram transformados para logaritmo natural (Ln), de acordo com Sampaio (2010). Apesar de a comparação de médias terem sido realizadas com dados transformados para Ln, as médias foram apresentadas com os dados originais de CCS (x 1.000 células/mL), CTB (x 1000 UFC/mL) e CIB (x 1000 bactérias/mL) (SAMPALIO, 2010). Para avaliar a variação da CCS, CTB e CIB em função da temperatura e do tempo de estocagem, foram aplicados modelos de regressão linear a partir dos dados originais e transformados para Ln. As análises estatísticas foram feitas com o uso do programa Sisvar (FERREIRA, 2010).

Antes e durante os experimentos, testes de controle de qualidade interlaboratorial e calibração do equipamento para verificar se há variabilidade inter-amostra foi realizada pelo laboratório de referência VALACTA (Ste Anne de Bellevue, Canadá), utilizando padrões de leite de vacas disponíveis. Durante as contagens experimentais, o contador de células foi ajustado para um declive (b) = 1,00 e intercepção (a) = 0.

De acordo com Arcuri et al., (2004) a utilização do método automatizado, padronizado com leite de vaca é apropriado para leituras de CCS de leite de cabras

dentro dos limites considerados no trabalho realizado entre 24.000 a 2.549.000 células mL⁻¹.

A análise estatística foi realizada utilizando o modelo linear geral (MLG) (FERREIRA, 2010). O Ln CCS foi utilizado para normalizar a distribuição de CCS e usado como a variável dependente. As médias foram comparadas utilizando-se os procedimentos GLM. No modelo utilizado, o efeito da cabra foi aleatório, e os efeitos eram fixos de tal modo que:

$$Y_{ijk} = m + G_i + S_j + T_k + ST_{jk} + e_{ijk}$$

Onde Y_{ijk} = variáveis dependentes para logCCS; m = média; G_i = efeito de cabra (20 níveis); S_j = efeito da temperatura de armazenamento (4 níveis: 5, 10, 20 e 30°C); T_k = efeito do tempo do leite (4 níveis: 1, 3, 5 e 7 dias após a colheita); ST_{jk} = efeito do tempo de armazenamento de interação x temperatura do leite; e e_{ijk} = resíduo aleatório.

Como foi realizada a transformação logarítmica da resposta (y), para interpretação dos coeficientes gerados nas análises de regressão simples e múltipla em termos originais, foi feita a exponencial de y .

A interpretação dos resultados depois de feita a exponencial de y foi realizada da seguinte maneira: i) Coeficientes maiores que 1: considera-se que houve um aumento na CCS, CTB ou CIB em função do tempo e temperatura, retirando-se do valor do coeficiente com transformação exponencial uma unidade e multiplicando-o por 100 para saber a porcentagem de aumento. ii) Coeficientes menores que 1: considera-se que houve uma redução na CCS, CTB ou CIB em função do tempo e temperatura, fazendo-se a subtração - 1 menos o valor do coeficiente com transformação exponencial - e multiplicando-o por 100 (HAIR JR et al., 2009).

Para comparação das médias, os resultados originais de CCS, CTB e CIB foram transformados para Ln.

Para os modelos matemáticos utilizaram-se modelos de regressão linear, tendo como variável resposta a CCS, CTB, e CIB e como explicativas o Tempo e a Temperatura de Conservação.

Para interpretar os coeficientes de regressão foi feito o exponencial dos mesmos para avaliar o impacto em termos originais.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Contagem de Células Somáticas

As médias da CCS em amostras de leite cru de cabra conservadas com bronopol de acordo com o tempo decorrido entre a coleta e análise e as temperaturas de armazenamento estão apresentadas na Tabela 4. Não houve diferença estatística entre as médias das amostras analisadas nas temperaturas de 5, 10, 20 e 30°C com 1, 3 e 5 dias após a coleta ($P > 0,05$). Verificou-se diferença significativa ($P < 0,05$) nas amostras analisadas com temperaturas de 20 e 30°C no dia 7. Para as amostras armazenadas na temperatura de 30°C foi observada diferença ($P < 0,05$) nos dias 3, 5 e 7, em relação ao primeiro dia. Apesar da recomendação de Chapaval et al. (2010) em não ultrapassar a temperatura de 7°C durante todo o período entre a coleta e a recepção no laboratório, foi verificado que não houve diferença entre as médias de CCS para as amostras mantidas até 20°C e analisadas ao longo de cinco dias.

Tabela 4 – Médias originais da CCS ($\times 10^3$ CCS/mL) para amostras armazenadas em diferentes temperaturas ao longo do tempo de conservação

Temperatura (°C)	Tempo (dias)				
	0	1	3	5	7
-	1.007,55	-	-	-	-
5		1.009,85 ^{Aa}	1.005,25 ^{Aa}	1.011,30 ^{Aa}	978,40 ^{Ba}
10		1.028,20 ^{Aa}	986,05 ^{Aa}	999,40 ^{Aa}	970,20 ^{Ba}
20		1.035,30 ^{Aa}	983,75 ^{Aa}	963,55 ^{Aa}	847,00 ^{Ab}
30		1.019,55 ^{Ab}	939,85 ^{Aa}	910,70 ^{Aa}	847,65 ^{Aa}

Letras maiúsculas e minúsculas distintas nas linhas e colunas, respectivamente, indicam valores diferentes ($P < 0,05$) pelo teste SNK.

Durante o armazenamento a 5°C, a CCS não mudou no período de 1 a 7 dias de pós-colheita, de acordo com resultados anteriores obtidos em amostras de leite de cabra mantido refrigerado para 3 e 4 dias, conforme Zeng et al., (1999).

Avaliando as médias de CCS das amostras de leite conservadas em cada uma das temperaturas ao longo do tempo (Gráfico 1) podemos observar que a 5°C as médias de CCS permanecem constantes até o dia 5, tendo uma diminuição no dia 7. Para as temperaturas de armazenamento de 10 e 20°C as médias de CCS foram equivalentes para os dias 1 e 3 com decréscimo, sendo que na temperatura de 10°C no dia 5 apresentou aumento, enquanto que na temperatura de 20°C houve diminuição com novo decréscimo no dia 7. Para a temperatura de 30°C o decréscimo das médias de CCS foi constante.

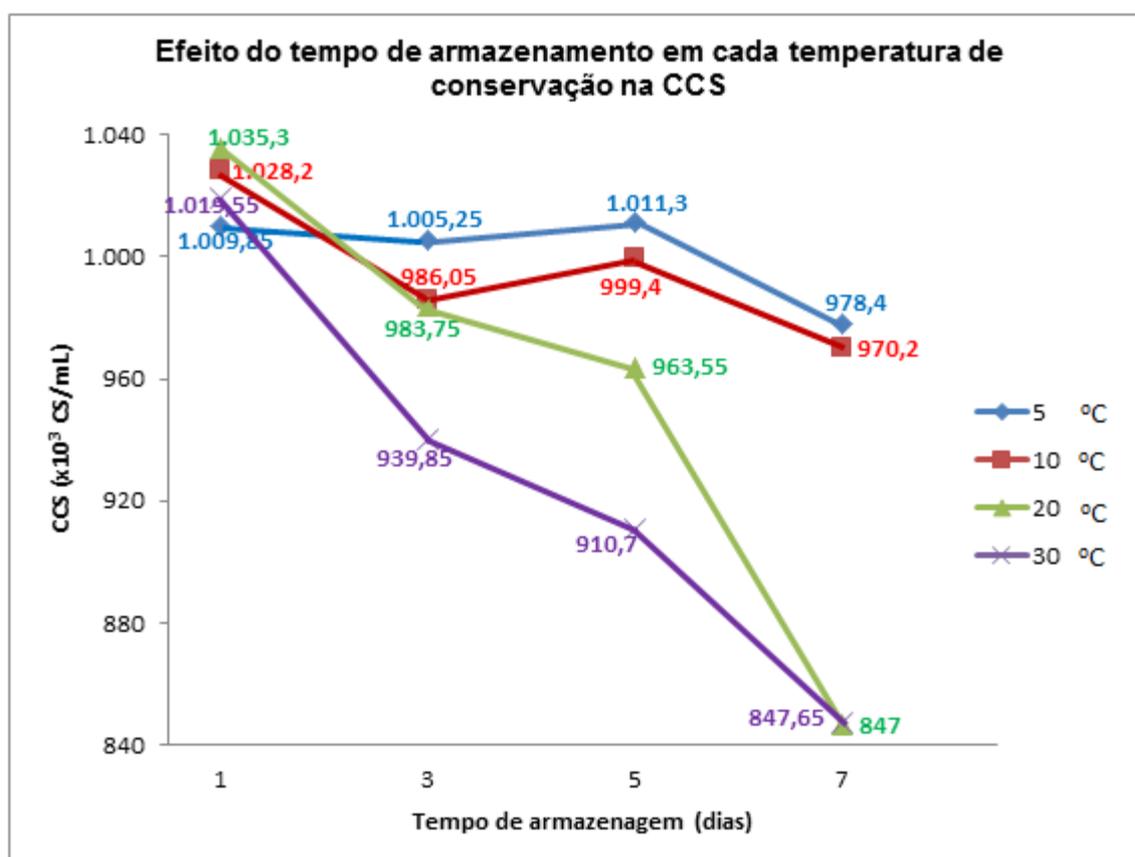


Gráfico 1 – Efeito do tempo de armazenamento em cada temperatura de conservação na CCS.

Avaliando as médias de CCS levando em consideração as temperaturas dentro de cada tempo (Gráfico 2) podemos observar que no primeiro dia de armazenamento as médias de CCS foram equivalentes para todas as temperaturas. No terceiro dia as médias de CCS decresceram quando as amostras foram

armazenadas a 10°C quando comparadas as das amostras armazenadas a 5°C, no terceiro dia as menores médias de CCS foram observadas quando armazenadas a 30°C. No quinto dia de armazenamento as medias de CCS sofreram uma diminuição constante nas temperaturas de 5 a 10°C e permaneceram constantes nas temperaturas de 20 a 30°C. No sétimo dia de armazenamento o decréscimo das médias de CCS foi constante.

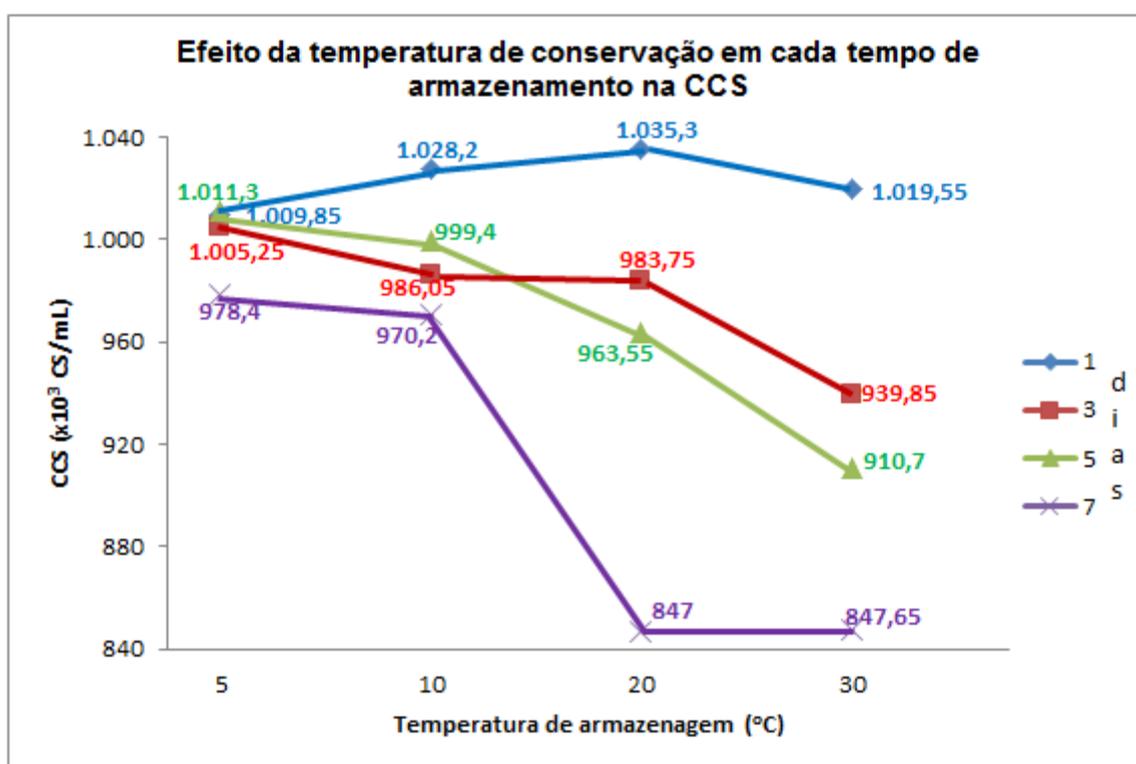


Gráfico 2 – Efeito da temperatura de conservação em cada tempo de armazenamento na CCS.

Com essas análises podemos perceber que há uma interação entre os fatores tempo e temperatura e que a resposta da CCS depende da interação desses dois fatores.

Observamos que o impacto da temperatura dentro do dia apresentou diferença significativa nos dias 5 e 7, tendo uma diminuição de 0,5 e 0,9% a cada grau de aumento da temperatura nos dias 5 e 7, respectivamente (Tabela 5).

Foi observado que o maior impacto sobre a variação da CCS foi devido ao tempo dentro da temperatura apresentando diferença significativa nas temperaturas 20 e 30°C, tendo uma diminuição da CCS de 3,5 e 3,9% a cada dia de aumento no tempo de armazenamento a uma temperatura de 20 e 30°C, respectivamente

(Tabela 6). Verificou-se que o efeito da temperatura foi o maior responsável pela variação da CCS em amostras de leite cru contendo bronopol, o que indica a necessidade de enviar as amostras sob refrigeração. Embora a temperatura seja responsável pelo maior efeito sobre a CCS, ressalta-se também a importância do tempo decorrido entre a coleta e análise.

Gonzalo et al. (2003) ao efetuar a contagem de células somáticas em amostras de leite de ovelha concluiu que amostras mantidas sob refrigeração apresentaram médias mais elevadas do que aquelas mantidas em temperatura ambiente. Os autores sugerem que esta diferença se deva ao fato da refrigeração conservar a integridade da célula somática.

Verificou-se que com o aumento do tempo de estocagem das amostras de leite de cabra houve diminuição da CCS, sendo explicado por Souza et al., (2005) e Meyer et al., (2002) que o decréscimo da CCS em leite em relação a temperatura e o tempo de armazenamento, ocorra em razão da proporção e meia-vida dos tipos celulares, ou seja, com a lise celular o DNA da célula fica inviável para leitura.

Verificou-se decréscimo dos valores iniciais da CCS transformados para Ln em função da temperatura de armazenamento e do tempo entre a coleta e a análise das amostras de leite. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Meyer et al. (2002), que avaliaram métodos e tempos de armazenamento das amostras nos resultados da análise da CCS do leite de vaca, verificando interação entre o método de armazenamento e a idade das amostras de LnCCS, apresentando decréscimos lineares em função da idade para LnCCS e os declives foram -0,01, -0,006, -0,069 e -0,226 para refrigeração (temperatura de 4°C), congelamento (temperatura de -10°C), temperatura controlada (temperatura de 22,1 a 30,9°C) e temperatura variável (temperatura ambiente mínima de 22,1°C e aquecida a 40°C por 4h/dia), respectivamente.

Os resultados encontrados estão de acordo com o trabalho de Sánchez et al., (2005), que em amostras de leite de cabra, adicionadas de bronopol e armazenadas sob refrigeração apresentaram decréscimo nas médias geométricas da contagem de células somáticas após 10, 25 e 42 dias de 5, 6,9 e 15%, respectivamente.

Tabela 5 – Análise da regressão para o desdobramento da temperatura (°C) dentro do dia

Tempo (dia)	Fórmula	Impacto em termos originais	Significância e Desvio da Linearidade	R ² (%)
1	$y = 6,635890 + 0,001307x$	0,1%	b1 NS Desvio NS	26,20
3	$y = 6,636127 - 0,003185x$	0,4%	b1 NS Desvio NS	93,65
5	$y = 6,653271 - 0,004947x$	0,5%	b1 S Desvio NS	95,68
7	$y = 6,644381 - 0,008254x$	0,9%	b1 S Desvio NS	93,57

A cada grau de aumento da temperatura em °C a CCS diminui 0,5% no tempo (dia) 5.

A cada grau de aumento da temperatura em °C a CCS diminui 0,9% no tempo (dia) 7.

Tabela 6 – Análise da regressão para o desdobramento do tempo (dia) dentro da temperatura (°C)

Temperatura (°C)	Fórmula	Impacto em termos originais	Significância e Desvio da Linearidade	R ² (%)
5	$y = 6,624350 - 0,002900x$	0,3%	b1 NS Desvio NS	52,85
10	$y = 6,668425 - 0,012825x$	1,3%	b1 NS Desvio NS	69,20
20	$y = 6,710450 - 0,035300x$	3,5%	b1 S Desvio NS	93,75
30	$y = 6,683100 - 0,039400x$	3,9%	b1 S Desvio NS	95,79

A cada dia de aumento no tempo de armazenamento a uma temperatura de 20°C a CCS diminui 3,5%.

A cada dia de aumento no tempo de armazenamento a uma temperatura de 30°C a CCS diminui 3,9%.

5.2 Contagem Total de Bactérias

As médias da CTB em amostras de leite cru de cabra conservadas com azidiol de acordo com o tempo decorrido entre a coleta e análise e as temperaturas de armazenamento estão apresentadas na Tabela 7. Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre as médias das amostras analisadas armazenadas nas temperaturas de 5, 10 e 20°C e analisadas ao longo do tempo (1 a 7 dias após a coleta). Também não foi verificada diferença ($P > 0,05$) entre as médias das amostras analisadas nas temperaturas armazenadas a 5, 10, 20 e 30°C nos tempos 1 e 3 dias de análise.

Tabela 7 – Médias originais da CTB ($\times 10^3$ UFC/mL) para amostras armazenadas em diferentes temperaturas ao longo do tempo de conservação

Temperatura (°C)	Tempo (dias)				
	0	1	3	5	7
-	255,6	-	-	-	-
5	-	253,80 ^{Aa}	283,45 ^{Aa}	251,60 ^{Aa}	186,35 ^{Aa}
10	-	276,55 ^{Aa}	239,90 ^{Aa}	214,80 ^{Aab}	164,25 ^{Ab}
20	-	296,35 ^{Ab}	209,45 ^{Aab}	184,90 ^{Aa}	300,35 ^{Aab}
30	-	218,15 ^{Aa}	401,35 ^{Aa}	813,10 ^{Bb}	1.877,55 ^{Bc}

Letras maiúsculas e minúsculas distintas nas linhas e colunas, respectivamente, indicam valores diferentes ($P < 0,05$) pelo teste SNK.

Não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) nas análises realizadas ao longo do tempo na temperatura de 5°C. Na temperatura de 10°C não houve diferença estatística nos dias 1, 3 e 5, apresentando diferença estatística ($P < 0,05$) no dia 7. Verificou-se diferença estatística ($P < 0,05$) nas amostras analisadas na temperatura de 30°C a partir do terceiro dia de análise, onde ficou evidente o crescimento bacteriano de forma exponencial ao longo do tempo na referida temperatura.

Observamos que o impacto da temperatura dentro do dia apresentou diferença significativa nos dias 5 e 7, tendo um aumento de 1,7 e 7,8% a cada grau de aumento da temperatura nos dias 5 e 7, respectivamente (Tabela 8).

Tabela 8 – Análise da regressão para o desdobramento da temperatura (°C) dentro do dia

Tempo (dia)	Fórmula	Impacto em termos originais	Significância e Desvio da Linearidade	R ² (%)
1	$y = 5,422746 - 0,006831x$	0,7%	b1 NS Desvio NS	31,47
3	$y = 5,267627 - 0,000685x$	0,1%	b1 NS Desvio NS	0,44
5	$y = 4,992025 + 0,016883x$	1,7%	b1 S Desvio S	24,34
7	$y = 4,243729 + 0,075347x$	7,8%	b1 S Desvio S	74,90

A cada grau de aumento da temperatura em °C a CTB aumenta 1,7% no tempo (dia) 5.

A cada grau de aumento da temperatura em °C a CTB aumenta 7,8% no tempo (dia) 7.

Avaliando as médias de CTB das amostras de leite conservadas em cada uma das temperaturas ao longo do tempo (Gráfico 3) podemos observar que a 5°C as médias de CTB permanecem constantes até o dia 7. Para a temperatura de armazenamento de 10°C as médias de CTB foram equivalentes para os dias 1, 3 e 5 com decréscimo, sendo que no dia 7 apresentou queda acentuada. Para a temperatura de 20°C as médias de CTB foram equivalentes para os dias 1, 3 e 5 com decréscimo, tendo um aumento no dia 7. Para a temperatura de 30°C o aumento das médias de CTB foi constante.

Avaliando as médias de CTB levando em consideração as temperaturas dentro de cada tempo (Gráfico 4) podemos observar que no primeiro dia de armazenamento as médias de CTB foram equivalentes para todas as temperaturas. No terceiro e quinto dias as médias de CTB diminuíram quando as amostras foram armazenadas a 10 e 20°C, respectivamente, quando comparadas as das amostras armazenadas a 5°C, tendo um aumento na temperatura de 30°C. No sétimo dia de armazenamento houve queda de CTB na temperatura de 10°C, tendo em seguida um aumento constante nas temperaturas 20 e 30°C.

Com essas análises podemos perceber que há uma interação entre os fatores tempo e temperatura e que a resposta CTB depende da interação desses dois fatores.

Foi observado que o maior impacto sobre a variação da CTB foi devido ao tempo dentro da temperatura apresentando diferença significativa nas temperaturas 10 e 30°C, tendo uma diminuição da CTB de 8,9% a cada dia de aumento no tempo de armazenamento a uma temperatura de 10°C e um aumento da CTB de 33,3% a cada dia de aumento no tempo de armazenamento a uma temperatura de 30°C (Tabela 9).

Supomos que na temperatura de 20°C houve uma neutralização da ação bacteriana conforme consta na tabela 9, pois ao invés de ocorrer o crescimento de bactérias, teve um decréscimo de 5,2%.

Verificou-se que o efeito da temperatura foi o maior responsável pela variação da CTB em amostras de leite cru contendo azidiol, o que indica a necessidade de enviar as amostras sob refrigeração. Embora a temperatura seja responsável pelo maior efeito sobre a CTB, ressalta-se também a importância do tempo decorrido entre a coleta e análise.

Apesar da recomendação de Mesquita et al. (2003) em não ultrapassar a temperatura de 7°C durante todo o período entre a coleta e a recepção no laboratório, foi verificado que não houve diferença entre as médias de CTB para as amostras mantidas até 10°C e analisadas ao longo de cinco dias.

Os resultados médios da CTB encontrados para as amostras armazenadas a 5°C apresentaram comportamento semelhante aos resultados encontrados por Souza et al. (2006) em leite de vaca, não apresentando diferença estatística ao longo dos sete dias.

O limite legal estabelecido pela IN 37/2000 é de 500 mil UFC/mL. Sendo assim, o leite analisado neste estudo está dentro dos padrões legais analisados ao longo de 7 dias nas temperaturas de 5, 10 e 20°C.

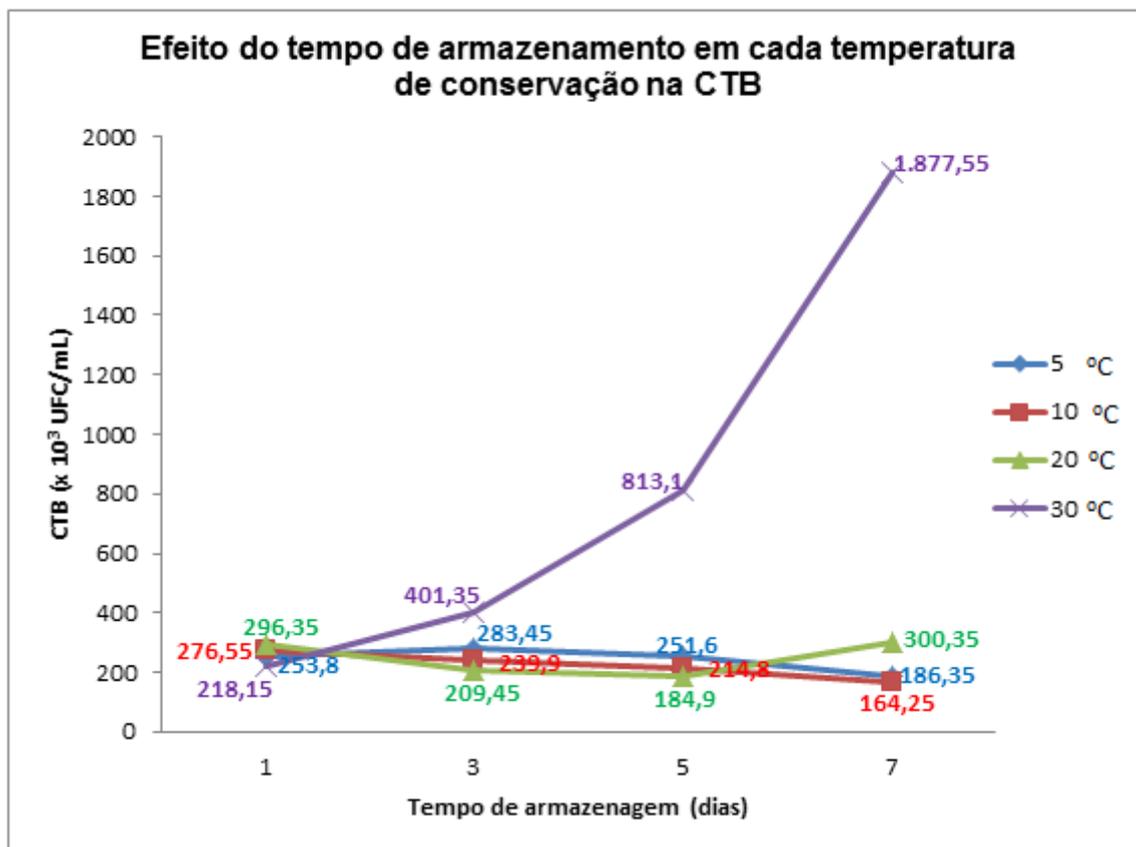


Gráfico 3 – Efeito do tempo de armazenamento em cada temperatura de conservação na CTB.

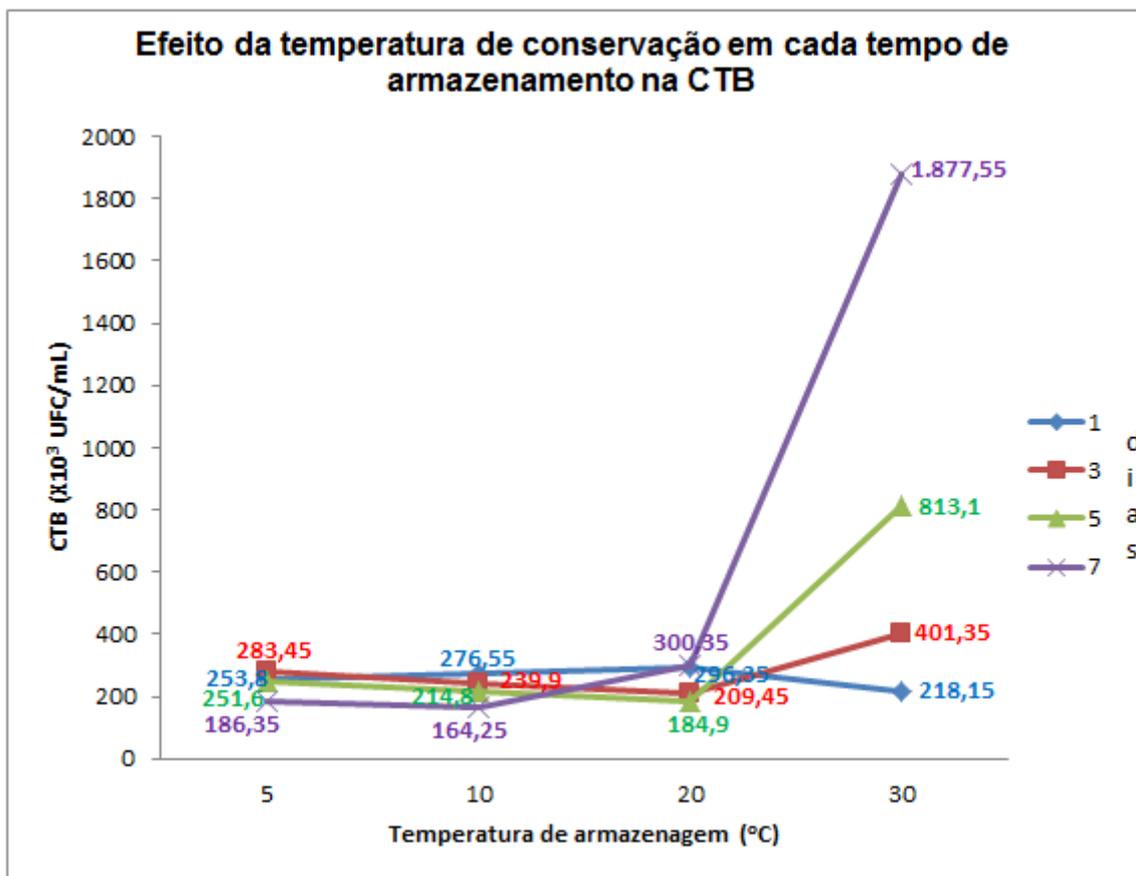


Gráfico 4 – Efeito da temperatura de conservação em cada tempo de armazenamento na CTB.

Tabela 9 – Análise da regressão para o desdobramento do tempo (dia) dentro da temperatura (°C)

Temperatura (°C)	Fórmula	Impacto em termos originais	Significância e Desvio da Linearidade	R ² (%)
5	$y = 5,414325 - 0,046925x$	4,6%	b1 NS Desvio NS	59,53
10	$y = 5,525525 - 0,092475x$	8,9%	b1 S Desvio NS	97,16
20	$y = 5,344300 - 0,052950x$	5,2%	b1 NS Desvio S	38,42
30	$y = 4,635400 + 0,288150x$	33,3%	b1 S Desvio S	88,31

A cada dia de aumento no tempo de armazenamento a uma temperatura de 10°C a CTB diminui 8,9%.

A cada dia de aumento no tempo de armazenamento a uma temperatura de 30°C a CTB aumenta 33,3%.

5.3 Contagem Individual de Bactérias

As médias da CIB em amostras de leite cru de cabra conservadas com azidiol de acordo com o tempo decorrido entre a coleta e análise e as temperaturas de armazenamento estão apresentadas na Tabela 10. Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre as médias das amostras analisadas armazenadas nas temperaturas de 5, 10 e 20°C e analisadas ao longo do tempo (1 a 7 dias após a coleta). Também não foi verificada diferença ($P > 0,05$) entre as médias das amostras analisadas nas temperaturas armazenadas a 5, 10, 20 e 30°C nos tempos 1 e 3 dias de análise.

Tabela 10 – Médias originais da CIB ($\times 10^3$ bactérias/mL) para amostras armazenadas em diferentes temperaturas ao longo do tempo de conservação

Temperatura (°C)	Tempo (dias)				
	0	1	3	5	7
-	364,4	-	-	-	-
5	-	367,71 ^{Aa}	427,61 ^{Aa}	358,8 ^{Aa}	249,6 ^{Aa}
10	-	406,02 ^{Aa}	338,70 ^{Aa}	297,59 ^{Aab}	214,5 ^{Ab}
20	-	449,3 ^{Ab}	287,48 ^{Aab}	253,84 ^{Aa}	517,34 ^{Aab}
30	-	307,3 ^{Aa}	783,64 ^{Aa}	1.937,1 ^{Bb}	5.060,3 ^{Bc}

Letras maiúsculas e minúsculas distintas nas linhas e colunas, respectivamente, indicam valores diferentes ($P < 0,05$) pelo teste SNK.

Não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) nas análises realizadas ao longo do tempo na temperatura de 5°C. Na temperatura de 10°C não houve diferença estatística nos dias 1, 3 e 5, apresentando diferença estatística ($P < 0,05$) no dia 7. Verificou-se diferença estatística ($P < 0,05$) nas amostras analisadas na temperatura de 30°C a partir do terceiro dia de análise.

Avaliando as médias de CIB das amostras de leite conservadas em cada uma das temperaturas ao longo do tempo (Gráfico 5) podemos observar que a 5°C as médias de CIB permanecem constantes até o dia 7. Para a temperatura de armazenamento de 10°C as médias de CIB foram equivalentes para os dias 1, 3 e 5 com decréscimo, sendo que no dia 7 apresentou queda acentuada. Para a temperatura de 20°C as médias de CIB foram equivalentes para os dias 1, 3 e 5 com decréscimo, tendo um aumento no dia 7. Para a temperatura de 30°C o aumento das médias de CIB foi constante.

Avaliando as médias de CIB levando em consideração as temperaturas dentro de cada tempo (Gráfico 6) podemos observar que no primeiro dia de armazenamento as médias de CIB foram equivalentes para todas as temperaturas. No terceiro e quinto dias as médias de CIB caíram quando as amostras foram armazenadas a 10 e 20°C, respectivamente, quando comparadas as das amostras armazenadas a 5°C, tendo um aumento na temperatura de 30°C. No sétimo dia de armazenamento houve queda de CIB na temperatura de 10°C, tendo em seguida um aumento constante nas temperaturas 20 e 30°C.

Com essas análises podemos perceber que há uma interação entre os fatores tempo e temperatura e que a resposta CIB depende da interação desses dois fatores.

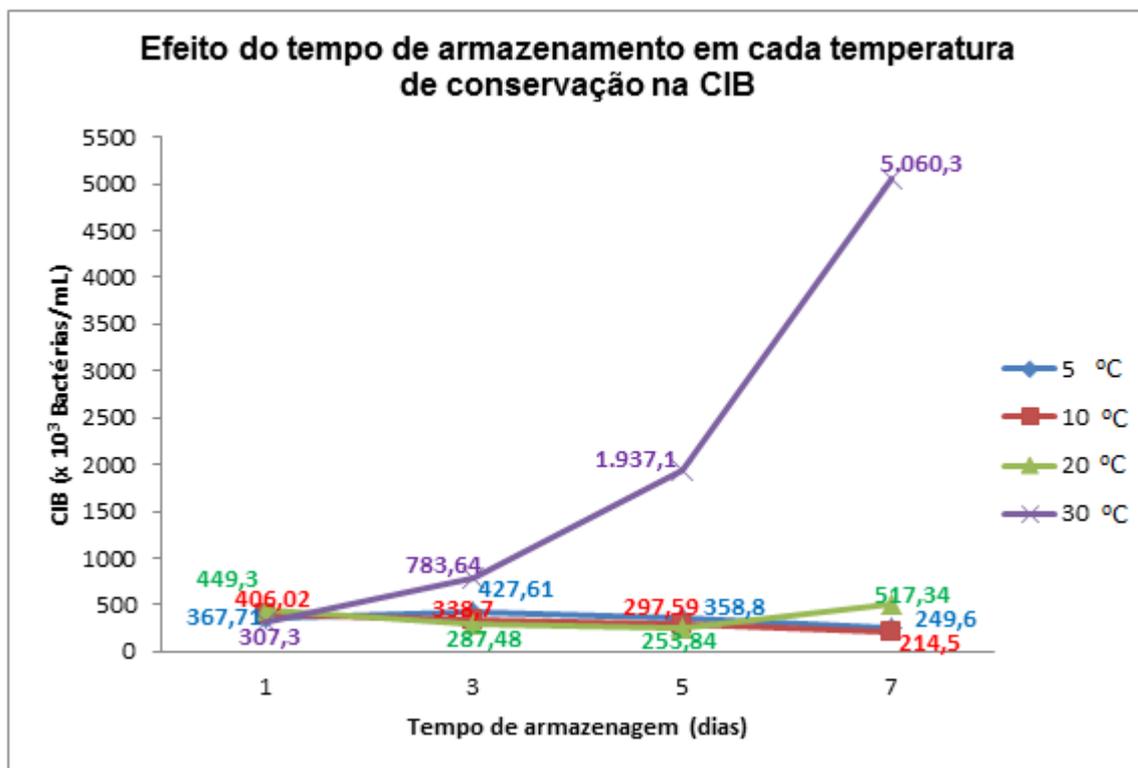


Gráfico 5 – Efeito do tempo de armazenamento em cada temperatura de conservação na CIB.

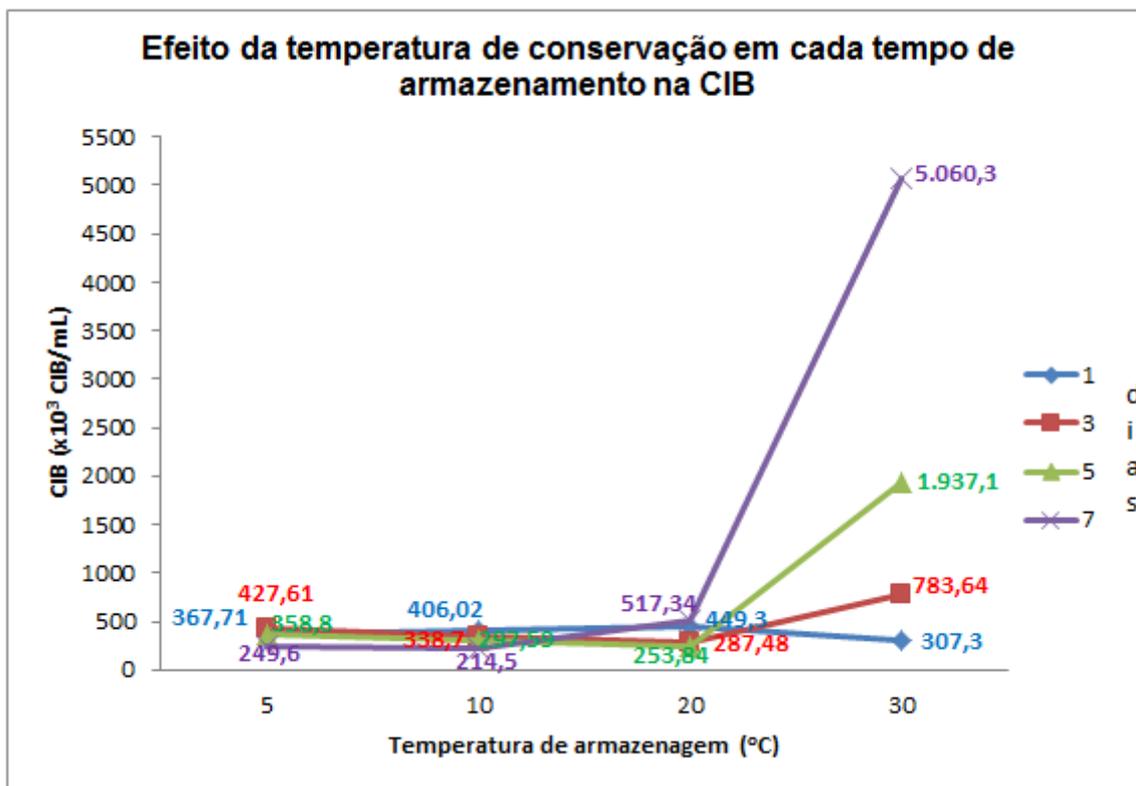


Gráfico 6 – Efeito da temperatura de conservação em cada tempo de armazenamento na CIB.

Observamos que o impacto da temperatura dentro do dia apresentou diferença significativa nos dias 5 e 7, tendo um aumento de 2,1% e 10,0% a cada grau de aumento da temperatura nos dias 5 e 7, respectivamente (Tabela 11).

Foi observado que o maior impacto sobre a variação da CIB foi devido ao tempo dentro da temperatura apresentando diferença significativa nas temperaturas 10 e 30°C, tendo uma diminuição da CIB de 11,1% a cada dia de aumento no tempo de armazenamento a uma temperatura de 10°C e um aumento da CIB de 44,3% a cada dia de aumento no tempo de armazenamento a uma temperatura de 30°C (Tabela 12). Verificou-se que o efeito da temperatura foi o maior responsável pela variação da CIB em amostras de leite cru contendo azidiol, o que indica a necessidade de enviar as amostras sob refrigeração. Embora a temperatura seja responsável pelo maior efeito sobre a CIB, ressalta-se também a importância do tempo decorrido entre a coleta e análise.

Verificou-se que as médias da CIB tiveram o mesmo comportamento da CTB ao longo do tempo do estudo.

Tabela 11 – Análise da regressão para o desdobramento da temperatura (°C) dentro do dia

Tempo (dia)	Fórmula	Impacto em termos originais	Significância e Desvio da Linearidade	R ² (%)
1	$y = 12,585424 - 0,008649x$	0,9 %	b1 NS Desvio NS	31,25
3	$y = 12,388381 - 0,000854x$	0,1 %	b1 NS Desvio NS	0,43
5	$y = 12,037500 + 0,021500x$	2,1 %	b1 S Desvio S	24,44
7	$y = 11,089864 + 0,095824x$	10,0 %	b1 S Desvio S	74,88

A cada grau de aumento da temperatura em °C a CIB aumenta 2,1% no dia (tempo) 5.

A cada grau de aumento da temperatura em °C a CIB aumenta 10,0% no dia (tempo) 7.

Tabela 12 – Análise da regressão para o desdobramento do tempo (dia) dentro da temperatura (°C)

Temperatura (°C)	Fórmula	Impacto em termos originais	Significância e Desvio da Linearidade	R ² (%)
5	$y = 12,572450 - 0,058800x$	5,8 %	b1 NS Desvio NS	59,15
10	$y = 12,717125 - 0,117625x$	11,1 %	b1 S Desvio NS	97,38
20	$y = 12,484575 - 0,066675x$	6,5 %	b1 NS Desvio S	37,91
30	$y = 11,584100 + 0,366850x$	44,3 %	b1 S Desvio S	88,25

A cada dia de aumento no tempo de armazenamento a uma temperatura de 10°C a CIB diminui 11,1%.

A cada dia de aumento no tempo de armazenamento a uma temperatura de 30°C a CIB aumenta 44,3%.

6 CONCLUSÃO

Amostras de leite de cabra destinadas às análises de contagem de células somáticas adicionadas de bronopol e armazenadas em temperaturas de 5 a 10°C quando analisadas em até sete dias após a coleta das mesmas não apresentam diferenças estatísticas.

O armazenamento em temperatura ambiente de amostras de leite de cabra destinadas às análises de CTB e CIB, mesmo adicionadas do conservante azidiol, não é recomendado devido a ocorrência do crescimento bacteriano.

Amostras de leite de cabra adicionadas de azidiol, conservadas em temperaturas de 5 a 10°C, podem ser usadas na contagem bacteriana por citometria de fluxo, sem que ocorram diferenças significativas nos resultados encontrados por até sete dias de armazenamento.

O tempo limite para análise do leite de cabra para CCS utilizando o conservante bronopol e para CTB e CIB utilizando o conservante azidiol é de 1 a 7 dias após a coleta a uma temperatura de conservação de 0 a 10° C.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARCURI, E. F.; SILVA, P. D. L. da; BRITO, J. R. F.; SILVA, M. R.; SOUZA, G. N. de. Emprego do Somacount 300, calibrado com leite de vaca, na contagem de células somáticas no leite de cabra. **Ciência Rural**, v.34, n.5, set-out, 2004.

BOOR, K.J.; BROWN, D.P.; MURPHY, S.C.; KOZLOWSKI, S.M.; BLANDLER, D.K. 1998. Microbiological and chemical quality of raw milk New York State. **Journal Dairy Science**. 81, 1743-1748.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 37, de 31 de outubro de 2000. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite de cabra. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 8 de nov. 2000. Seção 1, p. 23.

CHAPAVAL, L.; AGUIAR, V. M. P.; MOROTÓ, A. M.; VIANA, G. A.; MAGALHÃES, D. C. T.; MIRANDA, K. P. de; SOUZA, A. P. B. de. Procedimentos de coleta e transporte de amostras de leite de cabra cru para determinação dos componentes e das Contagens Totais de Bactérias (CTB) e Células Somáticas (CCS) em laboratório. **Comunicado Técnico, 111 On Line** (Setembro/2010). Disponível em <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/880059/1/UMTCot111.pdf>>. Acesso em 10 abri. 2014.

COSTA, M. S.; ARAÚJO, A. M.; MORAES, J. B.; CUNHA, R. M. S.; CAMPELO, J. E. G.; LIMA, S. E. F.; OLIVEIRA, J. A.; ALMEIDA, G. M.; SILVA, F. R.; ALMEIDA, M. J. O. Caracterização genética de caprinos Marota no Estado do Piauí por meio de microssatélites de DNA. In: VII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL, **Anais...** São Carlos-SP. 2008.

CRAVEN, H.; MACAULEY, B.J. Microorganisms in pasteurized milk after refrigerated storage. III. Effects of milk processor. **Jornal of Dairy Technology**, Australian, v. 47, n.1, p. 50-55, Jan. 1993.

DULIN, A.M.; PAAPE, M.J.; WERGIN, W.P. Differentiation and enumeration of somatic cells in goat milk. **Journal of Food Protection**. v.45, n.5, p.435-439, 1982.

EGITO, A. A.; MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. S. M. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. **Archivos de Zootecnia**. v. 51, n. 39, p. 5. 2002.

EMBRAPA GADO DE LEITE. **Produção mundial de leite de diferentes espécies de animais, 2010/2011**. Embrapa Gado de Leite, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.cnp.gl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0210.php>>. Acesso em: 11 abr. 2014.

FERREIRA, D. F. **Sisvar**: versão 5.3 (Build 77). Lavras: Departamento de Ciências Exatas, Universidade Federal de Lavras, 2010.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. **Grade "A" Pasteurized Milk Ordinance: 2009 revision**. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM209789.pdf>>. Acesso em: 20 mai. 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. **Grade "A" Pasteurized Milk Ordinance: 2013 revision**. Disponível em: <http://www.mass.gov/eohhs/docs/dph/regs/grade-a-milk-ordinance.doc>>. Acesso em: 20 mai. 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO, 2012. **Banco de dados FAOSTAT**. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QL/E>. Acesso em: 04 jun. 2014.

FONSECA, C.R.; PORTO, E.; DIAS, C. T. S.; SUSIN, I. Qualidade do leite de cabra *in natura* e do produto pasteurizado armazenado por diferentes períodos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 26(4): p. 944-949, 2006.

FRANK, J. F.; CHRISTEN, G. L.; BULLERMAN, L. B. Tests for groups of microorganisms. In: MARSHALL, R. T. **Standard methods for examination of dairy products**. 1992. 16. Baltimore: Port City Press, 271-286.

Glândula Apócrina. Disponível em: <<http://lahistotecadenico.blogspot.com.br/2010/11/tejido-epitelial-glandular.html>>. Acesso em: 08 abri. 2014.

GOMES, V.; LIBERA, A. M. M. P. D.; PAIVA, M.; MADUREIRA, K. M.; ARAÚJO, W. P. Effect of the stage of lactation on somatic cell counts in healthy goats (*Caprae hircus*) breed in Brazil. **Small Ruminant Research**, v.64, p. 30-34, 2006.

GONÇALVES, A. L. et al. Avaliação de sistemas de produção de caprinos leiteiros na Região Sudeste do Brasil. **R. Bras. Zootec.** 2008, vol.37, n.2, p. 366-376.

GONZALO, C. Microbiological and hygienic quality of ewe and goat milk: somatic cells and pathogens. In: Production and utilization of ewe and goat milk, 1995, Crete. **Proceedings of the IDF**. International Dairy Federation, 1995, 59-70.

GONZALO, C.; MARTINEZ, J.R.; CARRIEDO, J.A *et al.* Fossomatic cell-counting on ewe milk: comparison with direct microscopy and study of variation factors. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.138-145, 2003.

HAENLEIN, G. F. W. Relationship of somatic cell counts in goat milk to mastitis and productivity. **Small Ruminant Research**., v. 45, n.2, p.163-178, 2002.

HAIR JÚNIOR, J. F.; BLACK, W. C.; BABIN, B. J; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L. **Análise multivariada de dados**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman; 2009. 688 p.

HARMON, R. J. Fatores que afetam a contagem de células somáticas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 1., 1998, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1998. p.7-15.

HAYES, M. C.; RALYEA, R. D.; MURPHY, S. C.; CAREY, N. R.; SCARLETT, J. M.; BOOR, K. J. 2001. Identification and characterization of elevated microbial counts in bulk tank raw milk. **Journal Dairy Science**. 84:292-298.

HEESCHEN, W. H. 1996. Bacteriological quality of raw milk: legal requirements and payment systems. In: **Bacteriological quality of raw milk**. In: INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Brussels: IDF. 8p.

HOLM, C.; MATHIASSEN, T.; JESPERSEN, L. 2004. A flow cytometric technique for quantification and differentiation of bacteria in bulk tank milk. **J. App. Micro.**, 97:935-941.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal**, Rio de Janeiro, v. 40, p.1-71, 2012.

IDF - INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Milk. Enumeration of somatic cells**. Brussels: IDF, 2006. 13p. IDF Standard 148. Guidance on the operation of fluoro-opto-eletronic counters.

JAYARAO, B. M.; PILLAI, S. R.; SAWANT, A. A.; WOLFGANG, D. R; HEGDE, N. V. 2004. Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell count e bacterial counts. **Journal Dairy Science**. 87, 3561-3573.

KALANTZOPOULOS, G.; DUBEUF, J. P.; VALLERAND, F.; PIRISI, A.; CASALTA, E.; LAURET, A.; TRUJILLO, T. **Characteristics of the sheep and goat milks: Quality and Hygienic stakes for the sheep and goat dairy sectors.** In: IDF SC on Microbiological hygiene, Meeting 28 September 2002, Agenda item 4.8. International Dairy Federation. Standing Committee on Microbiological Hygiene. Disponível em: <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Sistemas%20Productos%20Pecuarios/Attachments/77/lech_cap_1.pdf>. Acesso em 26 jun. 2014.

LANGONI, H. Tendências de modernização do setor lácteo: monitoramento da qualidade do leite pela contagem de células somáticas. **Revista de Educação continuada CRMV-SP**, v.3: p.57-64, 2000.

LANGONI, H.; DOMINGUES P. F.; BALDINI S. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. **Rev. Bras. Ciênc. Vet.** 13 (1):51-54. 2006.

LEITNER, G.; SILANIKOVE, N.; MERIN, U. Estimate of milk and curd yield loss of sheep and goats with intramammary infection and its relation to somatic cell count. **Small Ruminant Research**, v. 74, 221-225, 2008.

MARSHALL, Robert T. (Ed.) **Standard methods for the examination of dairy products.** 16. ed. Washington: American Public Health Association, 1992. 547 p.

McDOUGALL, S.; MURDOUGH, P.; PANKEY, W.; DELANEY, C.; BARLOW, J.; SCRUTON, D. Relationship among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. **Small Ruminant Research**, v. 40, n.3, p. 245-254, 2001.

McDOUGALL, S.; VOERMANS, M. Influence of estrus on somatic cell count in dairy goats. **Journal Dairy Science**, 85, 378-383, 2002.

MENEZES, Marcos Paulo Carrera. **Variabilidade e relações genéticas entre raças caprinas brasileiras, ibéricas, e canárias.** 2005. 110f. Tese (Doutorado Integrado em Zootecnia)-Universidade Federal da Paraíba. Areia, 2005.

MESQUITA, A. J. de; MORO, D. V.; HORST, J. A.; SOUZA, G. N. de; CASSOLI, L. D. **Procedimentos de amostragem de leite cru refrigerado.** Goiânia: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003. 9p.

MEYER, P. M.; MACHADO, P. F.; COLDEBELLA, A.; CORASSIN, C. H.; CASSOLI, L. D.; OLIVEIRA, C. A.; RODRIGUES, P. H. M. Methods of milk storage and age of samples on milk components percentage, somatic cells count and urea nitrogen. In: AMERICAN DAIRY SCIENCE ASSOCIATION AND AMERICAN SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE JOINT MEETING, 2002, Quebec-Canadá. **Journal of Dairy Science-Supplement.** Savoy: ADSA/ASAS, 2002. v. 85. p. 285. Disponível em<<http://www.jmtg.org/JAM/2002/abstracts/jnabs104.pdf>>. Acesso em 05 mai. 2014.

MORGAN, F.; MASSOURAS, T.; BARBOSA, M.; ROSEIRO, L.; RAVASCO, F.; KANDARAKIS, I.; BONNIN, V.; FISTAKORIS, M.; ANIFANTAKIS, E.; JAUBERT, G.; RAYNAL-LJUTOVAC, K. Characteristics of goat milk collected from small and medium enterprises in Greece, Portugal and France. **Small Ruminant Research**. 47, p.39-49, 2003.

MORONI, P.; PISONI, G.; RUFFO, G.; BOETTCHER, P. J. Risk factors for intramammary infections and relationship with somatic-cell counts in Italian dairy goats. **Prev. Vet. Med.**, 69, p.163-173, 2005.

MUTUKUMIRA, A. N.; FERESU, S. B.; NARVHUS, J. A.; ABRAHAMSEN, R. K. NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Currents concepts of bovine mastitis**. 4. ed. Madison: National Mastitis Council, 64p, 1996.

PAAPE, M. J.; CAPUCO, A. V. Cellular defense-mechanisms in the udder and lactation of goats. **Journal Animal Science**. v.75, p. 556-565, 1997.

PAAPE, M. J.; WIGGANS, G. R.; BANNERMAN, D. D.; THOMAS, D. L.; SANDERS, A. H.; CONTRERAS, A.; MORONI, P.; MILLER, R. H. Monitoring goat and sheep milk somatic cell counts. **Small Ruminant Research**. 68, p. 114-125, 2007.

PARK, Y. W.; HUMPHREY, R. D. Bacterial cell counts in goat milk and their correlation with somatic cell counts, percent fat and protein. **Journal Dairy Science** 69, p. 32-37, 1986.

PERKINS, J. **Summary of Raw Goat Milk Quality Test Results 2012 and 2013**. Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, 2013. Disponível em: <<http://www.omafra.gov.on.ca/english/index.html>>. Acesso em: 02 jun. 2014.

PHILPOT, W. N. Importância da contagem de células somáticas e outros fatores que afetam a qualidade do leite. In I SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, Curitiba, **Anais...** Universidade Federal do Paraná, p. 28-35, 1998.

PIRISI, A.; LAURET, A.; DUBEUF, J. P. Basic and incentive payments for goat and sheep milk in relation to quality. **Small Ruminant Research**. 68, p. 167-178, 2007.

POUTREL, B.; DE CRÉMOUX, R.; DUCCELLIEZ, M.; VERNEAU, D. Control of Intramammary Infections in Goats: Impact on Somatic Cell Counts, **Journal of Animal Science**, 75: 566-570, 1997.

RAYNAL-LJUTOVAC, K.; PIRISI, A.; DE CRÉMOUX, R.; GONZALO, C. Somatic cells of goat and sheep milk: analytical, sanitary, productive and technological aspects. **Small Ruminant Research**. 68, p. 126-144, 2007.

RAGE, A.; LUNDER, T. **Microbiological and hygienic quality of Norwegian goat milk**. In: PRODUCTION AND UTILIZATION OF EWE AND GOAT MILK, 1995, Crete. *Proceedings of the IDF*. Brussels: International Dairy Federation, p. 128-134, 1995.

REGULATION (EC) No 853/2004 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. **Official Journal of the European Union**. Disponível em: <https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Legislation/Food_Legislation_Links/Milk_and_milk_products/Reg853_2004.pdf>. Acesso em 10 out. 2014.

SAMPAIO, Ivan Barbosa Machado. **Estatística aplicada a experimentação animal**. 3. Ed. – reimpressão – Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2010.

SÁNCHEZ, A.; SIERRA, D.; LUENGO, C.; CORRALES, J. C.; MORALES, C. T.; CONTRERAS, A.; GONZALO, C. Influence of storage and preservation on somatic cell count and composition of goat milk. **Journal Dairy Science**, 88: 3095–3100, 2005.

SCHUKKEN, Y. H.; WILSON, D. J.; WELCOME, F.; GARRISON-TIKOFSKY, L.; GONZALEZ, R. N. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. **Vet. Res.** 34. P. 579-596, 2003.

SIERRA, D. et al. Differential cell counts in goats milk. In: Milking and Milking Production of dairy Sheep and Goats, 1998. Athens. *Proceedings of the 6th International Symposium on the Milking of Small Ruminants*. Wageningen Pers. Wageningen, 1999. p. 178-180.

SILVA, Roberis Ribeiro da. **Agribusiness da caprinocultura de leite no Brasil**. Salvador: Bureau, 1998. 74p.

SILVEIRA, J. A. D. **Leite de Cabra**. São José dos Campos. 2008. Disponível em: <<http://www.riocapri.com.br/artigo7.pdf>>. Acesso em: 12 abri. 2014.

SOUZA, G. N. et al. Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento sobre a contagem de células somáticas no leite. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 2005, vol.57, n.6, pp. 830-834.

SOUZA, G. N. et al. Efeitos da temperatura e do tempo de armazenamento sobre a contagem total de bactérias em amostras de leite cru conservadas com azidiol. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 23, 2006, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: ILCT, n° 351, jul/ago. 2006. v.61, p. 358-361.

SOUZA, G. N. de; BRITO, J. R. F.; FARIA, C. G. de; MORAES, L. C. D. de
Composição e qualidade higiênico-sanitária do leite de rebanhos caprinos. In:
FONSECA, J. F. da; BRUSCHI, J. H. (Ed.). **Produção de caprinos na região da
Mata Atlântica**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite; Sobral: Embrapa Caprinos e
Ovinos, 2009. p. 143-157.

TIRARD-COLLET, et al. A study of the microbiological quality of goat milk in Quebec.
Journal of Food Protection, v.54, n.4, p.263-266, 1991.

ZENG, S. S.; ESCOBAR, E. N. Effect of breed and milking method on somatic cell
count, standard plate count and composition of goat milk. **Small Ruminant
Research**, v.19, p.169-175, 1996.

ZENG, S. S. Comparison of goat milk standards with cow milk standards for analyses
of somatic cell count, fat and protein in goat milk. **Small Ruminant Research**, n. 21,
p. 221-225, 1996.

ZENG, S. S.; ESCOBAR, E. N.; HART, S. P.; HINCKLEY, L.; BAULTHAUS, M.;
ROBINSON, G. T.; JAHNKE, G. Comparative study of the effects of testing
laboratory, counting method, storage and shipment on somatic cell counts in goat
milk. **Small Ruminant Research**, v. 31, n. 2, p. 103-107, 1999.