

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

PRODUÇÃO E ANÁLISE DA QUALIDADE DO LEITE E USO INDUSTRIAL DO
COLOSTRO DE OVELHAS DA RAÇA LACAUNE NA REGIÃO OESTE DE
SANTA CATARINA/BRASIL

LUISA WOLKER FAVA

PORTO ALEGRE

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

PRODUÇÃO E ANÁLISE DA QUALIDADE DO LEITE E USO INDUSTRIAL DO
COLOSTRO DE OVELHAS DA RAÇA LACAUNE NA REGIÃO OESTE DE
SANTA CATARINA/BRASIL

Autor: Luisa Wolker Fava

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de doutor em Ciências
Veterinárias na área de Medicina Veterinária
Preventiva

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Troller Pinto

Co-orientadora: Profa. Dra. Verônica Schmidt

PORTO ALEGRE

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Fava, Luisa Wolker
PRODUÇÃO E ANÁLISE DA QUALIDADE DO LEITE E USO
INDUSTRIAL DO COLOSTRO DE OVELHAS DA RAÇA LACAUNE NA
REGIÃO OESTE DE SANTA CATARINA/BRASIL / Luisa Wolker
Fava. -- 2017.
72 f.

Orientador: Andrea Troller Pinto.
Coorientador: Verônica Schmidt.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2017.

1. leite ovino. 2. composição. 3. CCS. 4. silagem
de colostro. 5. fosfatase alcalina. I. Pinto, Andrea
Troller , orient. II. Schmidt, Verônica, coorient.
III. Título.

Luisa Wolker Fava

PRODUÇÃO E ANÁLISE DA QUALIDADE DO LEITE E USO INDUSTRIAL DO
COLOSTRO DE OVELHAS DA RAÇA LACAUNE NA REGIÃO OESTE DE
SANTA CATARINA/BRASIL

Aprovada em

APROVADA POR:

Profa. Dra. Andrea Troller Pinto
Orientadora e Presidente da Comissão

Dra. Beatris Sonntag Kuchenbecker
Membro da Comissão

Prof. Dr. João Luiz Zani
Membro da Comissão

Prof. Dr. Paulo Ricardo Aguiar
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Muito especialmente desejo agradecer à minha orientadora, Profa. Dra. Andrea Troller Pinto, pela atenção dispensada, disponibilidade, dedicação e, principalmente, paciência.

À Profa. Dra. Verônica Schmidt, minha co-orientadora, pela dedicação, atenção e por ser fonte de novos conhecimentos.

À Cabanha Chapecó por permitir as coletas de leite e pelo apoio à pesquisa. Ao Anderson Elias Bianchi pelo apoio e auxílio durante as coletas.

Ao Instituto Federal Catarinense pelo incentivo à qualificação de seus servidores.

A minha família e amigos pelo apoio e compreensão.

Produção e análise da qualidade do leite e uso industrial do colostro de ovelhas da raça Lacaune na região oeste de Santa Catarina/Brasil

Autora: Luisa Wolker Fava

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Troller Pinto

RESUMO Com o aumento de produção de leite ovino, estudos voltados a este produto são importantes para garantir a melhoria da qualidade da matéria-prima e a oferta de produtos inócuos. A presente tese objetivou avaliar a influência das fases de lactação de ovelhas Lacaune sobre a produção, composição química e celular no leite; realizar cultivo bacteriano para detecção de mastite; aferir a atividade da fosfatase alcalina no leite; e avaliar a capacidade tecnológica da silagem de colostro como matéria-prima para a produção de manteiga através de três estudos. Em uma propriedade situada em Chapecó, foi avaliado um grupo de 15 fêmeas ao longo de seis meses. Na ordenha, após descarte dos primeiros jatos, foram coletadas amostras de leite, por teto, para realização da contagem de células somáticas (CCS) microscópica e isolamento bacteriano e diretamente do copo coletor, para determinação de composição e CCS eletrônica, contabilizado o volume produzido. Das 180 amostras, 53 apresentaram isolamento de *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN). Não houve diferença entre a CCS nas amostras com e sem isolamento, sendo observada média de CCS de 3,92 e 3,80 log₁₀ células.mL⁻¹, respectivamente. Não houve diferença no volume de produção, nem na CCS (média de 3,82 log₁₀ células.mL⁻¹) entre as fases de lactação. Os componentes do leite apresentaram diferença entre as fases, havendo redução da gordura e aumento da proteína e do extrato seco desengordurado (ESD). Posteriormente, o colostro foi obtido através de ordenha mecânica três dias pós-parto para análises de composição química, gordura, densidade relativa, acidez titulável e pH. Foi produzida silagem em garrafas PET para obtenção de creme para produção de manteiga. A manteiga foi pesada e foram realizadas as análises de determinação da gordura e acidez titulável, atividade de água, análise colorimétrica e avaliação da oxidação da amostra. O colostro de terceiro dia apresentou 8,75% de gordura, 7,12% de proteína, 3,90% de lactose e 21,11% de EST. Os valores de pH, acidez titulável e densidade relativa foram de 6,38, 27,17°D e 1,038 g.mL⁻¹, respectivamente. O rendimento da manteiga foi de 50,33%. A manteiga apresentou 59±0,00% de gordura, 2,56±0,32% de acidez titulável, 0,96±0,00 de atividade de água e índice de TBA de 0,13±0,02 mg MA.kg⁻¹. Na análise colorimétrica,

os parâmetros de cor L^* , a^* e b^* foram de $89,66 \pm 1,50$, $-1,98 \pm 0,27$ e $11,41 \pm 0,36$, respectivamente. Por último, para determinação da atividade da fosfatase alcalina no leite, foi realizada uma coleta de leite no tanque de resfriamento por expansão direta na mesma propriedade. A atividade foi determinada por espectrofotometria, com kit para fosfatase alcalina (K 019/Bioclin), sendo o valor médio de atividade da enzima no leite cru de $822,619 \text{ U/L}$ e $330,238 \text{ U/L}$ após pasteurização lenta. O tempo empregado no processo e a atividade da enzima apresentaram correlação negativa moderada ($r = -0,3$). Os estudos permitem concluir que as fêmeas da raça Lacaune apresentaram boa persistência de lactação e boa saúde do úbere; a silagem de colostro ovino apresentou viabilidade tecnológica para produção de manteiga. O teste para fosfatase alcalina utilizado no presente estudo não deve ser indicado para a espécie ovina.

Palavras-chave: leite ovino, composição, CCS, silagem de colostro, fosfatase alcalina.

Production and analysis of milk quality and industrial use of colostrum of Lacaune ewes from western Santa Catarina, Brazil.

Author: Luisa Wolker Fava

Supervisor: Profa. Dra. Andrea Troller Pinto

ABSTRACT Research aiming in the quality improvement of raw sheep milk and in the offer of innocuous material has become even more important, especially with the current growth in sheep milk production. The present dissertation aimed to evaluate the influence of lactation phases of Lacaune sheep on milk production, chemical and cellular composition, perform bacterial culture to detect mastitis, assess the activity of alkaline phosphatase in milk, and evaluate the technological capacity of colostrum silage as a raw material for butter production by means of three studies. In a property located in Chapecó, SC, Brazil, 15 females were evaluated along six months of lactation. After the first jets were discarded, milk samples were collected per udder for microscopic somatic cell counting (SCC) and bacterial isolation, in addition to analysis of composition, electronic SCC, and volume, determined in samples collected from the collector cup. From 180 samples, 53 were positive for coagulase-negative *Staphylococcus* (SCN). There were no difference between SCC in samples positive or negative for SCN, with mean SCC of 3.92 and 3.80 log₁₀ cells per mL respectively. There were no difference in the volume of milk produced or SCC (mean of 3.82 log₁₀ cells per mL) between the lactation phases. The milk components showed differences between the phases, with reduced fat, and increased protein and degreased dry extract. Secondly, colostrum was obtained from sheep through mechanical milking three days post-partum for analysis of chemical composition, fat, relative density, titratable acidity and pH. The colostrum was used to produce silage in polyethylene terephthalate bottles for further cream separation for butter production. The butter was weighed and analyzed for fat determination and titratable acidity, water activity, colorimetric analysis and oxidation evaluation. The third day colostrum had 8.75% fat, 7.12% protein, 3.90% lactose and 21.11% total dry matter. The values of pH, titratable acidity and relative density were 6.38, 27.17°D and 1.038 g per mL respectively. The butter yield was 50.33% and presented 59 ± 0.00% fat, 2.56 ± 0.32% titratable acidity, 0.96 ± 0.00 water activity and TBA index of 0.13 ± 0.02 mg MA per kg. In the colorimetric analysis, the color parameters L *, a * and b * were 89.66 ± 1.50, -1.98 ± 0.27 and 11.41 ± 0.36

respectively. At last, for the determination of the alkaline phosphatase activity in the sheep milk, samples were collected direct from the cooling tank by direct expansion in the same property. A spectrophotometric method (kit K019/Bioclin) was used to determine the enzyme activity. Mean value of alkaline phosphatase was 822.619 U/L in raw milk and 330.238 U/L after slow pasteurization. The time spent in the process and the enzyme activity presented moderate negative correlation ($r = -0.3$). In conclusion, Lacaune sheep have good persistence of lactation and good health of the udder. Sheep colostrum silage present technological viability for the production of butter. The test for alkaline phosphatase used in the present study is not indicated for analysis of sheep milk.

Keywords: sheep milk, composition, somatic cell count, colostrum silage, alkaline phosphatase.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1	Anatomia e fisiologia da glândula mamária	14
2.2	Curva de lactação	15
2.3	Composição química do leite de ovelha	16
2.4	Mastite em ovelhas	18
2.5	Contagem de células somáticas (CCS) no leite de ovelhas	20
2.6	Fosfatase Alcalina.....	22
2.7	Colostro ovino.....	23
2.8	Produtos derivados do leite de ovelha.....	24
3	NOTA TÉCNICA.....	26
4	ARTIGO 1	32
5	ARTIGO 2	44
6	ARTIGO 3	55
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
	REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

As principais espécies que possuem internacionalmente uso comercial do leite são a bovina, bubalina, ovina, caprina e camelídea, embora o leite de equinos, asininos, renas e iaques também sejam consumidos em menor escala (FAO, 2017-1). De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, que realiza relatórios bianuais a respeito da produção de leite mundial, o Brasil não consta entre os maiores exportadores ou importadores de leite e derivados no mundo, mas é sem dúvida um dos maiores produtores, indicando que a produção ainda supre somente o mercado interno (FAO, 2017-2).

A espécie bovina responde por 83% da produção de leite no mundo, seguida pela bubalina (13%), caprina (2%) e ovina (1%), embora as últimas sejam responsáveis por aproximadamente um terço da produção em países em desenvolvimento na Ásia e África, especialmente em ambientes inóspitos, devido à facilidade do manejo e adaptação genética dessas espécies (FAO, 2017-1). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014), o Brasil possuía 17,61 milhões de ovinos no ano de 2014, mas não especificou quantos são voltados para a produção leiteira. As raças Lacaune, Santa Inês e Bergamácia (ou mestiças destas) são aquelas utilizadas no país para a produção de leite (GRECA, 2013).

A produção mundial de leite de ovelha foi de mais de dez milhões de toneladas em 2014 (FAOSTAT, 2017). No Brasil, não há dados oficiais sobre produção de leite de ovelha, sendo que a produção e o processamento industrial ainda são muito pequenos. Segundo dados da Associação Brasileira de Criadores de Ovinos Leiteiros (ABCOL), no país há 28 propriedades com a criação de raças ovinas especializadas na produção de leite, estando presentes nos estados do RS, SC, PR, SP, RJ, MG e no Distrito Federal. Apesar de no RS haver o maior número de propriedades leiteiras, SC desponta como o principal produtor, possuindo o maior volume de leite produzido. Pesquisas que busquem o melhoramento da produção, promoção da sanidade ovina, caracterização técnica dos produtos e o fomento da produção leiteira ovina são fundamentais para que seja possível, no futuro, a normatização de mais produtos derivados do leite ovino, e para que mais investimentos nesse setor sejam justificados, pois além da conhecida qualidade nutricional e valor de mercado do leite de ovelha e de seus derivados, o modelo de produção e manejo de ovinos leiteiros adequa-se ao modelo de agricultura familiar predominante no país.

O volume de leite produzido, a composição química e as propriedades físicas podem ser influenciados por fatores genéticos, fisiológicos – idade, estágio de lactação, estado sanitário – e ambientais – manejo, alimentação, método de ordenha (PAVIĆ et al., 2002, BENCINI; PULINA, 1997, FUERTES et al., 1998).

Uma forma de avaliar a produção leiteira é através da curva de lactação. A curva de lactação representa a variação da produção de leite diária em função da duração da lactação. A curva é usada para estimar a produção de leite e pode ser dividida em três fases: a fase crescente de produção após o parto, o pico de lactação e a fase decrescente até o final da lactação, o chamado período seco. A comparação da forma da curva entre animais de diferentes raças, idades, genéticas e manejos permite a estimativa da eficiência do rebanho e melhor controle da produção (GRECA, 2015). O pico de lactação refere-se ao dia específico no qual a produção de leite atinge o volume máximo e nas ovelhas ocorre entre a terceira e a oitava semana de lactação e diminui até a 15ª semana. Já a persistência da lactação representa a capacidade da fêmea de manter sua produção de leite após atingir o pico de produção (COBUCI et al., 2003).

Em comparação com os leites de vaca e de cabra, o leite de ovelha apresenta uma maior riqueza em seus componentes (ASSENAT, 1991). Possui maior conteúdo proteico, valores em torno de 5% (BRITO et al., 2006; FAVA et al., 2014), e de gordura, valores em torno de 8% (LARROSA; KREMER, 1990; FAVA et al., 2014). O nível de lactose no leite da espécie ovina é semelhante ao de outras espécies (RAMOS; JUAREZ, 2011).

Além de seu conteúdo químico, outro indicador de qualidade do leite que não se relaciona ao seu valor nutritivo é a contagem de células somáticas (CCS), que informa a saúde da glândula mamária (VIANA et al., 2010). Trata-se de um teste indireto muito utilizado para detecção de mastite e o aumento na contagem é a principal característica para o diagnóstico de mastite subclínica. Na espécie ovina, padrões de contagens são ainda pouco conhecidos (GOMES et al., 2008), entretanto são fundamentais para a padronização dos parâmetros de qualidade, a fim de que o leite de ovelha possa ser julgado de acordo com as suas especificidades, em legislação própria. Nos EUA o limite para CCS no leite ovino é de 750.000 células.mL⁻¹ e na União Europeia não há limite legal para este parâmetro no leite dessa espécie (PAAPE, 2007).

A mastite é a principal causa de aumento da CCS no leite bovino e contaminação do leite para consumo humano (HARTAMAN et al., 2009). Esta doença traz prejuízos econômicos e de saúde pública (BERGONIER; BERTHELOT, 2003),

sendo a principal causa de descarte de ovelhas (NUNES et al., 2008). Embora a mastite clínica em ovinos tenha incidência baixa, a forma subclínica, que se caracteriza pela ausência de sintomatologia clínica, é bastante frequente (CONTRERAS et al., 2007). Os principais agentes causadores da mastite subclínica na espécie ovina são as bactérias *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN). As bactérias do gênero *Staphylococcus* dividem-se em coagulase positivas ou negativas de acordo com a sua capacidade de coagular plasma. As últimas são agentes oportunistas com grande capacidade de formar biofilmes (BERGONIER, 2003).

Para garantir a segurança microbiológica do leite, é necessário o tratamento térmico para a eliminação de microrganismos patogênicos não formadores de esporos e para aumentar a vida de prateleira do produto (LUDI KHUYZE et al, 2000; RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2007). Uma das formas de avaliar a eficácia do tratamento térmico aplicado é através da mensuração da atividade de fosfatase alcalina no leite.

A enzima fosfatase alcalina endógena do leite é utilizada como forma de validação do processo de pasteurização, baseando-se nas suas características de inativação térmica (WALSTRA et al., 2006; RANKIN et al., 2010; TRONCO, 2008). A enzima é inativada em temperatura ligeiramente superior àquela que elimina os contaminantes do leite cru considerados mais termorresistentes, a *Coxiella burnetii* e o *Mycobacterium tuberculosis*, sendo uma indicadora de que o processo térmico foi realizado de forma adequada (HOLSINGER et. al, 1997; LUDI KHUYZE et al, 2000; LEITE et al., 2006; WALSTRA et al., 2006; RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2007; SHAMSI et al., 2008). Já que a enzima encontra-se principalmente associada à membrana dos glóbulos de gordura do leite e seus níveis são dependentes não só do conteúdo de gordura do leite, mas também da espécie, período de lactação, idade, estado de saúde do animal e estação do ano (PAINTER; BRADLEY, 1997; MOATSOU, 2010; LORENZEN et al., 2010), é necessário que padrões de avaliação desta enzima sejam estabelecidos em ovinos, visto que a legislação brasileira não adota critério quantitativo para avaliação dessa enzima, utilizando-se método qualitativo, através de reação colorimétrica (BRASIL, 2006). Desse modo, a pesquisa da atividade dessa enzima em leite ovino faz-se importante.

Além do leite, o colostro é outro potencial produto que pode ser aproveitado na produção de ovinos leiteiros. O colostro é uma secreção da glândula mamária produzida antes do parto e 24 a 48 horas após o nascimento dos cordeiros (PAVLÍKOVÁ et al., 2010). Caracteriza-se pela alta concentração de proteínas, especialmente

imunoglobulinas, além de minerais, vitaminas, gordura e sólidos totais (KEHOE et al., 2007; GEORGIEV, 2008).

O uso de colostro para alimentação humana é proibido no Brasil (BRASIL, 2017), embora em outros países este seja reconhecido como um alimento saudável e de elevado potencial nutritivo, além de ser utilizado para fins farmacêuticos (SAALFELD et al., 2012; URUAKPA et al., 2002). A silagem de colostro, produto da fermentação anaeróbica do mesmo, apresenta grande potencial para ser destinada à produção de produtos para consumo humano, pois além de manter as características físico-químicas, suprime o crescimento de bactérias deteriorantes e patogênicas e possui forte apelo mercadológico, já que bactérias ácido-láticas permanecem viáveis após o processo de fermentação, apresentando potencial probiótico e sendo possível seu uso na fabricação derivados lácteos.

Tendo em vista o aumento de produção, estudos voltados ao leite de ovelha são cada vez mais importantes para garantir a oferta de produtos inócuos à população, bem como melhorar a qualidade da matéria-prima e dos produtos acabados. Como o conhecimento das características físico-químicas do leite ovino ainda é restrito e a produção recente, não há parâmetros próprios de julgamento e a definição de padrões de qualidade específicos depende, prioritariamente, de estudos científicos que demonstrem os parâmetros de normalidade do leite desta espécie. O objetivo geral desta tese de doutorado foi caracterizar o leite de ovelha quanto à sua composição química e celular, além de avaliar os parâmetros de qualidade e o uso industrial do colostro. Os objetivos específicos foram avaliar a influência das fases de lactação de ovelhas da raça Lacaune sobre a produção, composição química e contagem de células somáticas no leite; realizar cultivo bacteriano para detecção de mastite, identificando o agente em amostras individualizadas por teto; aferir a atividade da fosfatase alcalina no leite ovino; e avaliar a capacidade tecnológica da silagem de colostro como matéria prima para a produção de manteiga.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Anatomia e fisiologia da glândula mamária

A glândula mamária é uma glândula sebácea especializada composta de tecido epitelial tubuloalveolar de origem ectodérmica. Embora haja similaridades histológicas e funcionais entre as espécies, existem diferenças anatômicas e de composição do leite importantes entre as espécies domésticas. Em todas estas espécies de uso comercial na indústria leiteira, as glândulas estão presentes na região inguinal. As fêmeas bovina, bubalina e camelídea possuem uma grande cisterna e dois canais por teto, além de possuírem quatro tetos por úbere. As fêmeas ovina e caprina possuem uma cisterna, mas apenas um canal por teto. As fêmeas equinas, por sua vez, não possuem uma cisterna desenvolvida e possuem de dois a três ductos por teto. Estas últimas três espécies possuem somente dois tetos por úbere. Tetos supranumerários podem ocorrer em qualquer espécie, podendo ser funcionais ou afuncionais (DUKES; SWENSON, 1996).

O leite e o colostro são produzidos por células epiteliais organizadas em alvéolos ou ácinos, estruturas circulares com aproximadamente 200 µm de diâmetro, considerados a unidade funcional básica da glândula mamária. Os alvéolos são agrupados em lóbulos, separados por septos de tecido conjuntivo. Os alvéolos desembocam em ductos que congruem com os demais ductos em direção à cisterna da glândula. Os alvéolos e os ductos são cercados por células mioepiteliais responsivas à ocitocina que auxiliam na ejeção da secreção produzida em direção à cisterna glandular. A cisterna da glândula comunica-se com a cisterna do teto, que por sua vez possui canal para excreção do leite, o ducto papilar. Em ovinos, um esfíncter composto de tecido elástico (ao contrário dos bovinos que possuem um esfíncter composto de tecido muscular liso) oclui o ducto papilar, isolando as cisternas do ambiente (DUKES; SWENSON, 1996).

A colostrogênese consiste na formação do colostro, a primeira secreção produzida pela glândula mamária, com alto teor de imunoglobulinas, com o objetivo de prover imunidade passiva à prole (BANCHERO, 2015). Fatores como espécie, raça, tamanho da prole, sanidade e duração do período seco influenciam na colostrogênese, além de fatores como estresse, nutrição e exposição a antígenos. A composição do leite difere da composição do colostro em muitos aspectos. Em ovelhas, o percentual de gordura é de aproximadamente 14% no colostro e 7% no leite, assim como a proteína

total varia de 21 a 6% respectivamente. O conteúdo de lactose, no entanto, é ligeiramente maior no leite em comparação com o colostro, variando de 5 para 3%, respectivamente (LERIAS, 2014).

2.2 Curva de lactação

A curva de lactação consiste na representação gráfica da variação da produção de leite diária em função da duração da lactação. A curva é usada para estimar a produção de leite e pode ser dividida em três fases: a fase crescente de produção após o parto, o pico de lactação e a fase decrescente até o final da lactação, o chamado período seco (GRECA, 2015). Uma curva de lactação ideal é aquela que apresenta um pico elevado e razoável para a raça, mas também um platô após o pico (persistência). A comparação da forma da curva entre animais de diferentes raças, idades, genéticas e manejos permite a estimativa da eficiência do rebanho e melhor controle da produção. O pico de lactação refere-se ao dia específico no qual a produção de leite atinge o volume máximo, e nas ovelhas ocorre entre a terceira e a oitava semana de lactação e diminui até a 15^a semana. Já a persistência da lactação representa a capacidade da fêmea de manter sua produção de leite após atingir o pico de produção (COBUCI et al., 2003). Estratégias como o uso de hormônios, seleção genética para morfologia do úbere e produção de leite, manejo, sanidade, redução do estresse e nutrição devem ser adotadas pelos criadores de ovinos leiteiros (PULINA, 2006; CASTRO, 2011).

Outro fator fundamental para o aumento da produção é a ordenha. O próprio leite apresenta substâncias capazes de inibir a sua secreção, um claro mecanismo de *feedback* negativo para não sobrecarregar a cisterna do úbere. Acredita-se que este fator esteja relacionado a um peptídeo composto de 1 a 28 resíduos de β -caseína produzidos pela ação proteolítica da plasmina. Um experimento em cabras demonstrou que a injeção de caseína hidrolizada no interior do úbere causou redução da produção e aumento das células somáticas, plasmina e sódio no leite (PULINA, 2006).

2.3 Composição química do leite de ovelha

O leite de ovelha possui maior quantidade de sólidos totais quando comparado aos leites de vaca e cabra, sendo uma excelente fonte de proteína de boa qualidade. Possui equilíbrio entre as quantidades de carboidrato, gordura e proteína, sendo os dois últimos os principais componentes da matéria seca (RAMOS; JUAREZ, 2011).

As principais proteínas do leite de ovelha são compostas por micelas de caseína (76% a 83% do total) e proteínas do soro (17% a 22% do total), sendo que nestas últimas a maioria é composta por β -lactoglobulina e α -lactoalbumina (RAMOS; JUAREZ, 2011). No leite ovino o conteúdo proteico varia de acordo com a raça, podendo alcançar valores de 4,5% na raça Churra, 5% e 5,1% nas raças Milchschaft e Assaf, respectivamente, podendo chegar a 6% na raça Manchega (LARROSA; KREMER, 1990). Para a raça Lacaune o teor proteico encontra-se em torno de 5% (BRITO et al., 2006; FAVA et al., 2014).

O componente do leite que sofre mais variações é a gordura (BEHMER, 1980; ALAIS, 1985; ASSENAT, 1991; ORDÓÑES, 2005), sendo um dos principais componentes em termos de nutrição e características sensoriais de produtos lácteos (RAMOS; JUAREZ, 2011), além da sua importância no pagamento pela qualidade do leite (BEHMER, 1980). A raça do animal influencia no conteúdo de gordura presente no leite, podendo alcançar valores de 5,7% na raça Assaf, 5,5 a 7% na raça Milchschaft, 6 a 7% na Awassi, 6 a 8% na raça Manchega, chegando a valores de 10% na raça Churra (LARROSA; KREMER, 1990). O leite de ovelhas da raça Lacaune apresenta teor médio de 8% de gordura (LARROSA; KREMER, 1990; FAVA et al., 2014).

A lactose é o único glicídio livre existente em grandes quantidades em todos os tipos de leite, sendo o componente mais abundante e menos variável (ALAIS, 1985; ORDÓÑES, 2005). Este açúcar é um nutriente importante, pois favorece a absorção intestinal de cálcio, magnésio e fósforo e a utilização de vitamina C (RAMOS; JUAREZ, 2011). O nível de lactose está relacionado com a produção de leite, visto que a quantidade de leite produzida na glândula mamária depende das possibilidades de síntese de lactose, sendo este um fator limitante de produção (ALAIS, 1985; ORDÓÑEZ, 2005). Devido a isso, a curva de produção de lactose é similar à curva de produção de leite (ALAIS, 1985; MAHIEU, 1991). O conteúdo de lactose do leite ovino é semelhante ao leite de outras espécies (RAMOS; JUAREZ, 2011), apresentando média de 4,45% na raça Lacaune (FAVA et al, 2014).

A alimentação da fêmea durante a lactação influencia no conteúdo de minerais do leite, que se encontra em uma fração pequena em todos os tipos de leite (ALAIS, 1985). Os elementos mais abundantes são o cálcio, fósforo, potássio, sódio e magnésio, sendo os dois primeiros mais importantes devido ao valor nutricional e ao seu papel na estrutura das micelas de caseína (RAMOS; JUAREZ, 2011).

O volume de leite produzido, a composição química e as propriedades físicas são influenciados por fatores genéticos e fisiológicos, pelo manejo da propriedade, incluindo principalmente a alimentação dos animais, e pelo método de ordenha (BENCINI; PULINA, 1997). O estágio da lactação em que o animal se encontra influencia significativamente a composição química e a produção de leite (FUERTES et al., 1998). Além disso, as propriedades físico-químicas do leite variam de acordo com as condições de produção e com as características individuais dos animais (PAVIĆ et al., 2002). Além da nutrição, fatores climáticos também devem ser levados em consideração (MARIA-LEVRINO, 1990), pois em temperatura ambiente elevada há diminuição da produção de leite, causando o efeito de concentração dos componentes, afetando principalmente gordura e proteína (SEVI et al., 2004).

No início da lactação, a quantidade de material nitrogenado alcança valores máximos, por isso a importância de satisfazer as necessidades nutritivas desde o início da produção de leite. Os teores de caseína e gordura aumentam ao longo da lactação (ALAIS, 1985; MAHIEU, 1991). A influência do estágio de lactação na composição do leite de ovelhas da raça Lacaune foi estudada por Brito et al. (2006), onde os teores de proteína, gordura e sólidos totais apresentaram aumento gradativo no decorrer da lactação. A lactose apresenta maiores porcentagens aos 30 dias de lactação, sendo possivelmente devido à maior produção de leite neste período. No final da lactação há aumento dos valores de gordura e extrato seco total (EST), diferindo significativamente dos demais períodos. No final da lactação, observa-se aumento na quantidade de proteínas solúveis, implicando em perda da estabilidade do leite frente a tratamentos térmicos, dificuldade de coagulação pela ação do coalho e, devido à diminuição da quantidade de caseína, redução no rendimento na fabricação de queijos (MAHIEU, 1991).

Em rebanhos leiteiros, a mastite reduz consideravelmente a produção de leite (RIBEIRO, 2011), além de causar grandes alterações na sua composição (FOX, 2011). Quanto mais grave for a doença, mais a composição do leite se assemelhará à composição do sangue, devido à destruição das células secretoras da glândula mamária.

Ocorre diminuição dos componentes produzidos pelas células e aumento das moléculas filtradas. O teor de gordura diminui, assim como a proporção das caseínas. Por outro lado, ocorre aumento das proteínas solúveis, principalmente imunoglobulinas e albumina sérica (MAHIEU, 1991).

A influência da estação do ano deve-se aos efeitos combinados da alimentação, dos fatores climáticos e do estágio de lactação dos animais (MAHIEU, 1991). A temperatura ambiente é, provavelmente, uma das causas das variações estacionais. Quando a temperatura é muito elevada ocorre diminuição da ingesta dos animais, devido à perda de apetite, diminuindo a produção de leite (ALAIS, 1985; MAHIEU, 1991). O frio e o calor intensos provocam aumento da concentração de matéria gorda do leite, devido à diminuição do volume de leite produzido (MAHIEU, 1991).

2.4 Mastite em ovelhas

A mastite é um processo inflamatório mamário, usualmente causado por bactérias. Esta doença é a principal razão para o descarte de ovelhas (NUNES et al., 2008), sendo que em pequenos ruminantes a mastite é predominantemente subclínica (MCDUGGAL et al., 2001). A glândula mamária de pequenos ruminantes apresenta particularidades fisiológicas durante a secreção, caracterizando-se como uma secreção do tipo apócrina (PAAPE et al., 2001). Devido a essas particularidades, a abordagem ao controle de mastite em caprinos e ovinos deve ser feita cuidadosamente, de forma específica, não generalizando os resultados obtidos a partir de pesquisas em vacas leiteiras (CONTRERAS et al., 2007). O ambiente, as condições climáticas e o estresse nutricional podem predispor à mastite, em função da redução do fluxo sanguíneo para o úbere ou em função da imunossupressão local (ANDERSON et al., 2005).

As mastites podem ser classificadas quanto à forma de transmissão, em contagiosa e ambiental, e quanto à forma de apresentação, em clínica e subclínica (CUNHA et al, 2006). Na mastite clínica ainda pode-se classificar de acordo com o grau de severidade em hiperaguda, aguda, subaguda e subclínica. Somando-se a isso, a etiologia da doença e a duração podem classificar a doença em aguda, causada por coliformes; recorrente, mastite por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus dysgalactiae*; e persistente ou crônica, causada por *Streptococcus agalactiae* (RADOSTITS et al., 2007). A mastite clínica em pequenos ruminantes apresenta baixa incidência, com

valores anuais menores do que 5%. Contudo, a forma subclínica da doença apresenta incidência de 5 a 30% (CONTRERAS et al., 2007).

A manifestação clínica da doença inclui alterações na secreção láctea, no tamanho, consistência e temperatura da glândula. Além disso, pode haver manifestações sistêmicas, incluindo febre, anorexia, depressão, taquicardia e estase ruminal (ANDERSON et al., 2007). O estágio de lactação é um dos fatores que afetam a incidência de casos clínicos, sendo observadas maiores taxas no início da lactação, em ovelhas leiteiras com utilização exclusiva de ordenha mecanizada e sendo o *S.aureus* o principal agente causador (BERGONIER; BERTHELOT, 2003).

A mastite subclínica é uma das principais causas de descarte de animais, prejudicando grandemente a produção de leite, sendo a baixa produção diária o achado mais comum. Em ovelhas é provocada por bactérias como *Bacillus* spp., *Staphylococcus epidermitis*, *Eschericia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Actinomyces pyogenes*, *Trueperella pyogenes*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Klebsiella* spp. e outros patógenos ambientais (ANDERSON et al., 2005). *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) são os agentes mais frequentes de mastite subclínica, seguidos por *S.aureus* (BERGONIER; BERTHELOT, 2003).

Dentre os SCN o *S.epidermidis* é a espécie mais frequentemente isolada em raças ovinas como Sarda, Latxa e Lacaune (BERGONIER et al., 1999). No entanto, outras espécies tais como *S. simulans*, *S. hyicus*, *S. xylosus*, *S. haemolyticus*, *S. capitis* e *S. warneri* também podem ser isolados, não só da pele dos tetos, mas também do leite (BURRIEL, 1998). SCN oferecem risco também ao consumo do leite caso o tratamento térmico não seja eficaz, pois algumas das toxinas produzidas são enterotóxicas (ORDEN, 1992; VASIL, 2007). Esses microrganismos podem ainda apresentar variável resistência a antimicrobianos. Em um estudo realizado por DELLA LIBERA et al. (2010), 121 amostras de SCN foram isolados de 17 rebanhos de ovinos da raça Santa Inês. Nestas, de 10 antimicrobianos testados, o percentual de amostras resistentes variou de 1 a 27% em cada fármaco, sendo a resistência à sulfonamida a mais frequente (27,3%).

A transmissão da mastite contagiosa ocorre, principalmente, no momento da ordenha, sendo importante a aplicação de pré e pós-*dipping* e adequada higiene e desinfecção dos equipamentos de ordenha, quando se tratar de ordenha mecânica, e das mãos, quando se tratar de ordenha manual, pois os agentes etiológicos possuem como

habitat natural o interior da glândula mamária e a superfície dos tetos (LANGONI et al., 2006).

A mastite ambiental é causada por patógenos que habitam o ambiente no qual se encontra o animal, sendo considerados oportunistas. Os agentes etiológicos são, principalmente, de origem fecal, sendo responsáveis por um elevado número de casos clínicos (BERGONIER et al, 2003).

A detecção definitiva de mastite, ou padrão ouro, é baseada no isolamento de patógenos, através da coleta asséptica das amostras de leite (MCDOUGGAL et al., 2001). Testes indiretos são utilizados para o diagnóstico rápido de mastite ou para selecionar animais para a subsequente análise bacteriológica, com o posterior tratamento ou descarte. Estes testes incluem a contagem de células somáticas (CCS), o *California Mastitis Test* (CMT), a concentração hidrogeniônica (pH) e o conteúdo de cloretos e lactose (NUNES et al., 2008). A CCS é a medida do número de leucócitos e células epiteliais e seu aumento no leite é indicativo de inflamação da glândula mamária (LAFI, 2006).

A mastite tem grande importância por razões econômicas, legais e de saúde pública. Economicamente, pode haver morte de fêmeas e cordeiros, há custos com tratamento, redução da produção de leite e, onde há pagamento por qualidade, o valor é afetado. Nas questões legais, incluem-se os padrões de qualidade microbiológica e de contagem de células somáticas em locais onde há legislação específica para o leite dessa espécie. E, finalmente, quando se fala em saúde pública há o risco de infecção ou intoxicação da população consumidora de produtos lácteos ovinos por microrganismos causadores de mastite (BERGONIER; BERTHELOT, 2003).

2.5 Contagem de células somáticas (CCS) no leite de ovelhas

A maioria das subpopulações celulares se origina do sangue em resposta a uma agressão local e devido a isso a CCS é considerada um marcador inflamatório da glândula mamária (BERGONIER; BERTHELOT, 2003; LAFI, 2006).

A glândula mamária de pequenos ruminantes apresenta particularidades fisiológicas durante a secreção, caracterizando-se como uma secreção do tipo apócrina (PAAPE et al., 2001) e apresentando partículas citoplasmáticas semelhantes aos leucócitos, porém ausentes de ácido desoxirribonucleico (ADN) (GOMES et al., 2010). O tipo de célula predominante no leite de ovelha são os macrófagos, seguidos por

leucócitos polimorfonucleares e linfócitos, sendo as células epiteliais presentes em menor proporção (HARTMAN et al., 2009; BARBOSA et al., 2012; SOUZA et al., 2012).

Mesmo que ovinos e caprinos sejam pequenos ruminantes, há diferenças no que se refere à interpretação da CCS, havendo alta contagem em cabras não infectadas e contagens semelhantes às de leite bovino em ovinos. Além disso, há variações dentro da mesma espécie, associadas à raça, parto, período de lactação, estro e sazonalidade. Fatores não patológicos são responsáveis por variações nas contagens no leite de ovelha entre $4,0 \times 10^4$ a $1,0 \times 10^5$ células.mL⁻¹. No entanto, infecções bacterianas na glândula mamária são a principal causa de variação (RAYANAL-LJUTOVAC et al., 2007). Nos Estados Unidos da América o limite imposto para a contagem de células somáticas em leite de ovelhas de conjunto é de 750.000 células.mL⁻¹ (PAAPE et al., 2007). No Brasil não há legislação específica para o leite de ovelha.

A CCS pode ser avaliada pela contagem automática e pela contagem microscópica, havendo a possibilidade de utilização de diversos protocolos de coloração (BLAGITZ et al., 2013). Contudo, as colorações ideais ainda são discutíveis. As colorações específicas para ADN são técnicas mais trabalhosas e utilizam reagentes cancerígenos, prejudicando o responsável por executar a técnica (BARBOSA et al., 2012). Por outro lado, as colorações não específicas podem ser realizadas, utilizando-se equações para estimar a celularidade presente nas amostras (BLAGITZ et al., 2013).

Os valores de CCS considerados fisiológicos no leite ovino são de, no máximo, $0,5 \times 10^6$ células. mL⁻¹ (GONZALO et al., 2002; ; BLAGITZ et al., 2008; SOUZA et al., 2012), sendo considerado por Nunes et al. (2008), como um bom preditor da presença bacteriana e conseqüentemente mastite. O limite entre a CCS de uma glândula mamária saudável e uma glândula com mastite está entre $0,5 \times 10^6$ e $1,6 \times 10^6$ células.mL⁻¹ (LAFI, 2006). Pengov (2001) preconiza o valor de $0,25 \times 10^6$ células. mL⁻¹ como limite máximo para o leite de ovelhas sem mastite.

A mastite afeta a produção e a qualidade do leite. Altas contagens de CCS ocasionam mudanças na composição do leite, sendo que a alteração está relacionada à patogenicidade do agente envolvido na inflamação e a área tecidual afetada (ALDIST et al., 1995; PYÖRÄLÄ, 2003). Há passagem de íons, proteínas e enzimas do sangue para o leite, devido ao aumento da permeabilidade vascular, além da redução da síntese láctea da glândula mamária em função da lesão (MCDOUGALL et al., 2001). Devido a isso, a biossíntese de lactose também diminui, podendo ser utilizada como indicador de

mastite, visto que há pouca variação deste componente na mesma lactação e de uma lactação para outra (PYÖRÄLÄ, 2003).

2.6 Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina (FA) é uma enzima naturalmente encontrada no leite cru e a determinação da sua atividade no leite é utilizada como controle do processo de pasteurização (TRONCO, 2008). O binômio tempo e temperatura atualmente empregado no processo de pasteurização do leite leva em consideração a termorresistência de microrganismos patogênicos mais resistentes ao calor encontrados no leite cru, *Coxiella burnetii* e *Mycobacterium tuberculosis* (HOLSINGER et al., 1997; LUDIKHUYZE et al., 2000; LEITE et al., 2006; WALSTRA et al., 2006; RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2007). Sendo a fosfatase alcalina ligeiramente mais resistente ao calor do que esses microrganismos, sua inativação após a pasteurização indica que o processo foi empregado de forma correta, tornando o leite seguro para o consumo humano (SHAMSI et al., 2008).

A maior parte enzima está presente na membrana do glóbulo de gordura (WALSTRA et al., 2006), sendo assim, o teor de gordura influencia os níveis de fosfatase alcalina do leite (PAINTER; BRADLEY, 1997; MOATSOU, 2010). Além disso, a quantidade de enzima varia com outros parâmetros, como a espécie, estação do ano, período de lactação, idade e estado de saúde do animal (PAINTER; BRADLEY, 1997; LORENZEN et al., 2010).

A legislação brasileira não determina um limite quantitativo para a enzima, havendo somente prova qualitativa para distinguir leite pasteurizado de leite cru (BRASIL, 2006) ou detectar adição de leite cru ao leite pasteurizado (TRONCO, 2008). Atualmente, estão disponíveis comercialmente kits de reagentes, além de tiras colorimétricas para detecção, mas as pesquisas sobre a sensibilidade dos testes são escassas (SEIXAS et al., 2014).

Os Estados Unidos e a União Europeia estabelecem 0,350 U/L como limite máximo da atividade da fosfatase alcalina residual no leite bovino após aplicação de tratamento térmico adequado (LORENZEN et al., 2010). Há diversos métodos para determinação da atividade da FA, baseando-se na exposição da enzima a substratos específicos, com produção de compostos detectáveis pelo desenvolvimento de cor, sendo pouco precisos. A detecção da atividade da enzima com maior sensibilidade

baseia-se na hidrólise catalisada pela fosfatase alcalina de um substrato não fluorescente a um produto altamente fluorescente, realizada em equipamento específico, o Fluorophos[®], fornecendo o resultado em U/L (MARTINS, 2006).

A atividade da FA em leite ovino cru é mais elevada do que no leite das espécies bovina e caprina (VAMVAKAKI et al., 2006; RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2007; LORENZEN et al., 2010), porém sua redução percentual após aplicação de tratamento térmico é maior no leite de ovelha (VAMVAKAKI et al., 2006; LORENZEN et al., 2010). Contudo, já foi relatado na literatura que após pasteurização lenta a atividade residual da enzima no leite ovino não alcançou os valores de referência para leite bovino pasteurizado, sendo maior que 0,350 U/L (LORENZEN et al., 2010). Dessa forma, são necessários mais estudos a fim de avaliar o limite específico para o leite dessa espécie.

2.7 Colostro ovino

O colostro é a secreção mamária inicial após o parto, possuindo a função biológica de conferir ao recém-nascido proteção imunológica na fase mais vulnerável de sua vida, além de auxiliar no desempenho fisiológico, crescimento e desenvolvimento. Sua composição difere da do leite pela presença de componentes biologicamente ativos, incluindo imunoglobulinas, leucócitos, lactoferrina, lisozima, fatores imunomodulatórios, de crescimento e hormônios. Dessa forma, a utilização comercial do colostro para fins farmacêuticos e dietéticos tem atraído muito a atenção nos últimos tempos (MARNILA; KORHONEN, 2011).

O colostro não é comercialmente explorado em larga escala, devido a problemas de industrialização, como a baixa temperatura de coagulação, interferindo na pasteurização, e o elevado teor de componentes antimicrobianos, podendo inibir ou retardar os processos de fermentação e afetar os testes de resíduos de antibióticos baseados no crescimento microbiano. Porém, em alguns países é utilizado para a produção de alguns tipos de queijos e desperta o interesse da indústria farmacêutica para a produção de meios de cultivo celular à base de colostro (MARNILA; KORHONEN, 2011). Além disso, a suplementação com colostro bovino associada ao exercício físico resulta em aumento da massa muscular (ANTONIO et al., 2001), melhora na performance do exercício (COOMBES et al., 2002) e na posterior recuperação (BUCKLEY et al., 2002), além da sua capacidade tamponante sobre os efeitos acidificantes do exercício (BRINKWORTH et al., 2002). Seu mecanismo de ação não

está bem determinado, mas sugere-se que provoca aumento da absorção de nutrientes (MERO et al., 1997; COOMBES et al., 2002; KUIPERS et al., 2002).

Os teores médios de gordura, proteína e sólidos totais do colostro ovino são de 9%, 12% e 25%, respectivamente, podendo variar entre as raças (FERNANDES et al., 2013). A diferença mais notável com relação ao leite é a alta porcentagem de proteína no colostro, devido ao elevado teor de imunoglobulinas, havendo redução posterior. Do contrário, a lactose aumenta gradativamente (HADJIPANAYIOTOU, 1995).

A fermentação anaeróbica do colostro mantém as características físico-químicas encontradas no colostro *in natura*, sendo o produto resultante denominado de silagem de colostro (SAALFELD et al., 2012). Apesar de muitas bactérias patogênicas, incluindo *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*, serem encontradas no colostro e, conseqüentemente, transmitidas através do seu consumo, após 21 dias de fermentação o produto torna-se microbiologicamente seguro, devido às condições ácidas do meio. Acredita-se que bactérias do gênero *Lactobacillus* spp. são responsáveis pelo processo de fermentação e pela supressão do crescimento de bactérias deteriorantes e patogênicas, permanecendo viáveis no produto fermentado (SAALFELD et al., 2013).

Em estudo realizado por SAALFELD et al. (2013), após 30 dias de fermentação o colostro bovino apresentou teores de proteína, lactose, extrato seco total e gordura de 13,4%, 0,76%, 16,5% e 5,8%, havendo redução de todos os componentes. O pH do colostro reduziu de 6,5 para 4,0 na silagem e a porcentagem de ácido láctico presente aumentou de 4,9 para 21,1, devido ao processo de fermentação da lactose.

2.8 Produtos derivados do leite de ovelha

Além do leite ovino pasteurizado ou UHT, é possível a produção de leite evaporado ou em pó para reconstituição. No entanto, devido ao sabor diferenciado do leite ovino em comparação com o leite bovino, a aceitabilidade pelo consumidor pode ser limitada. É possível estimular o consumo, ganhar mercado e agregar valor através da fabricação de derivados, além do fato de o leite ovino possuir alto rendimento pelo maior teor de sólidos.

Os queijos, como o Pecorino, Manchego, Feta, Serra da Estrela, Serena, Graviera, Roquefort, entre outros, o iogurte e o sorvete são os produtos mais difundidos

no Brasil e no mundo (LJUTOVAC, 2008; FOX, 1999). O iogurte pode ser produzido, inclusive, a partir de leite congelado sem perda das propriedades, como descrito por KATISIARI (2002), importante característica de animais que produzem menor volume em relação aos bovinos leiteiros. No entanto, outros produtos tais como o creme, a manteiga, o leite condensado e o *whey protein* podem ser explorados. Outros produtos não comestíveis, como loções, cremes e sabões, também podem ser preparados (PANDYA, 2007). São amplas as possibilidades de utilização do leite de ovelha na indústria leiteira, e mais estudos são necessários para caracterizar suas propriedades.

3 NOTA TÉCNICA

Avaliação da contagem microscópica de células somáticas no diagnóstico de mastite em ovelhas

(Formatado para a revista Ciência Rural)

Avaliação da contagem microscópica de células somáticas no diagnóstico de mastite em ovelhas

L.W. Fava ^a, A.D. Oliveira ^b, V. Schmidt ^b, A.T. Pinto ^b

^a Docente no Instituto Federal Catarinense – *campus* Concórdia. Rodovia SC 283, Km 8, Vila Fragosos. CEP: 89703-720. Concórdia, SC, Brasil. Fone: 55 49 3441.4872.

Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, RS, Brasil.

^b Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Medicina Veterinária, Departamento de Medicina Preventiva. Av. Bento Gonçalves, 9090, CEP: 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil. Fone: 55 51 3308.7858

RESUMO

A contagem de células somáticas (CCS) é comumente utilizada com uma medida indireta para detecção de mastite em bovinos. Os agentes mais frequentemente isolados em mastite subclínica de ovinos são os *Staphylococcus* coagulase negativos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a utilização da CCS microscópica para diagnóstico de mastite em ovelhas da raça Lacaune. Foram selecionadas 15 ovelhas da raça Lacaune na fase inicial de lactação para realização de coletas de leite mensais. Foram coletadas amostras de leite individuais, por teto, sendo uma alíquota destinada à CCS microscópica e outra para isolamento bacteriano. Do total de 180 amostras, 53 (29,44%) apresentaram isolamento microbiano, sendo *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) os agentes isolados. Não houve diferença significativa entre a CCS das amostras com e sem isolamento, sendo observada uma média de CCS de 3,92 log 10 células.mL⁻¹ e 3,80 log 10 células.mL⁻¹ para amostras com e sem isolamento, respectivamente. A contagem microscópica de células somáticas encontrada no presente estudo foi bem inferior aos valores de corte encontrados na literatura e a presença de SCN nas amostras de leite não teve correlação com CCS elevada. Apesar de colorações específicas para DNA serem as mais indicadas, a CCS microscópica em leite ovino ainda está sendo adaptada. Mais estudos devem ser realizados para avaliação das diferentes técnicas.

Palavras-chave: CCS microscópica, leite de ovelha, mastite.

A mastite subclínica em pequenos ruminantes apresenta grande incidência quando comparada à forma clínica da doença, sendo os *Staphylococcus* coagulase

negativos (SCN) os agentes mais isolados frequentemente (CONTRERAS et al., 2007; BERGONIER; BERTHELOT, 2003). O método de referência para diagnóstico de mastite baseia-se no isolamento bacteriano, porém a contagem de células somáticas (CCS) comumente é utilizada como indicativo da doença. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a utilização da CCS microscópica para diagnóstico de mastite em ovelhas da raça Lacaune.

Foram selecionadas 15 ovelhas da raça Lacaune na fase inicial de lactação em uma propriedade situada em Chapecó/SC. Mensalmente, no período de abril a setembro de 2016, na ordenha matutina, após o descarte dos primeiros jatos de leite e assepsia dos tetos, foram coletadas amostras de leite individuais, por teto. Uma alíquota foi destinada à CCS microscópica (MORAES, 2015) e o restante foi congelado para posterior isolamento bacteriano. As amostras, descongeladas em temperatura de refrigeração (7°C) por 24 horas, foram semeadas em ágar acrescido de 5% de sangue ovino e incubadas a 37°C, por 24 a 48 horas. Na presença de, pelo menos, 05 ufc morfológicamente idênticas, as amostras foram consideradas positivas para mastite subclínica e na presença de mais de dois tipos morfológicos (< 05 ufc) a amostra foi considerada contaminada (ARIZNABARRETA et al., 2002; GONZALO et al., 2002). Os agentes bacterianos foram identificados segundo suas características morfo-tintoriais e bioquímicas (QUINN et al., 1994). O teste t foi aplicado para comparar a CCS em amostras com e sem isolamento ($P < 0,05$). O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (número 28225).

Do total de 180 amostras, 53 (29,44%) apresentaram crescimento microbiano, sendo *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) os agentes isolados. Não houve diferença significativa entre a CCS das amostras com e sem isolamento, sendo observada uma média de CCS de $3,92 \log_{10} \text{ células.mL}^{-1}$ para amostras com isolamento e $3,80 \log_{10} \text{ células.mL}^{-1}$ para amostras sem isolamento. O valor máximo de CCS encontrado nas amostras com e sem isolamento foi de $5,24 \log_{10} \text{ células.mL}^{-1}$ e $4,80 \log_{10} \text{ células.mL}^{-1}$, respectivamente.

Os valores logarítmicos de corte considerados como bom preditores para determinação da presença bacteriana no leite ovino encontrados na literatura variam de $5,398$ a $6,230 \log_{10} \text{ células.mL}^{-1}$ (NUNES et al., 2008). Apesar de o leite de pequenos ruminantes apresentar partículas citoplasmáticas semelhantes aos leucócitos, devido à secreção apócrina característica da glândula mamária das espécies, a contagem

microscópica de células somáticas encontrada no presente estudo foi bem inferior, mesmo com a utilização de corante não específico para ácido desoxirribonucleico (ADN). Segundo GOMES et al. (2010), a utilização de corantes não específicos para ADN na CCS microscópica do leite de ovelhas pode elevar aparentemente a concentração de leucócitos, o que não foi observado no presente estudo, pois as contagens mantiveram-se baixas, mesmo com o isolamento de agentes bacterianos nas amostras.

Os *Staphylococcus* coagulase negativos são os agentes etiológicos mais frequentes de mastite subclínica em ovinos, estando relacionados com o aumento de CCS no leite (PENGOV, 2001; BERGONIER; BERTHELOT, 2003). Apesar de no presente estudo os agentes encontrados terem sido os SCN, não houve contagem elevada de células somáticas nas amostras, exceto em um animal que apresentou número incontável de células no leite durante todo o período de estudo, com isolamento de agente bacteriano também em todo o período. Pode-se inferir, neste achado, que a persistência de isolamento bacteriano compatível com mastite pode resultar em altas contagens de células somáticas. O isolamento de agente bacteriano não influenciou a CCS no leite, visto que amostras com e sem isolamento apresentaram contagens semelhantes de células. Além disso, em alguns casos a CCS foi superior em amostras de leite nas quais não houve isolamento bacteriano, quando comparadas a amostras sem isolamento.

A CCS microscópica ainda está sendo adaptada para o leite de ovelhas, pois existe muita divergência sobre qual coloração é a mais adequada. Colorações específicas para ADN são as mais indicadas, devido à presença de corpúsculos citoplasmáticos no leite desta espécie (BLAGITZ et al, 2013), porém as técnicas são mais laboriosas e os reagentes empregados possuem alto potencial carcinogênico (BARBOSA et al., 2012). Todavia, em estudo realizado por MORAES (2015), no qual se utilizou o mesmo protocolo de coloração do presente estudo, a técnica mostrou ser satisfatória para a CCS de leite ovino, por diminuir perdas por falta de aderência das amostras nas lâminas e demonstrar equivalência com a contagem automática.

No presente estudo não foi observada relação entre CCS e isolamento de agente bacteriano nas amostras de leite, não sendo possível estabelecer valores de CCS que indiquem mastite. Contudo, o isolamento bacteriano persistente compatível com mastite durante a lactação das fêmeas pode aumentar o número de células somáticas no leite ovino. Mais estudos devem ser realizados para avaliar os limites de CCS compatíveis

com mastite utilizando técnicas de coloração não específicas para ADN, por serem métodos adequados e de fácil execução.

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (número 28225).

Referências

ARIZNABARRETA, A. et al. Microbiological quality and somatic cell count of ewe milk with especial reference to *Staphylococci*. *Journal of Dairy Science*, v.85, n.6, 1370-1375, 2002.

BARBOSA, D.A. et al. Contagem automática e microscópica direta de células somáticas do leite de ovelhas Santa Inês, utilizando como corantes o broadhurst-palley e a hematoxilina-eosina. *Ciência Animal* 22(3): 17-23, 2012.

BERGONIER, D., BERTHELOT, X. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. *Livestock Production Science* 79, 1–16, 2003.

CONTRERAS, A. et al. Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research*, 68, 145–153, 2007.

GOMES, V. et al. Contagem automática e microscópica direta das células somáticas do leite de ovelhas da raça Lacaune, utilizando como corantes o Rosenfeld e Verde de Metil e Pironina-Y. *Ciência Animal Brasileira*, v. 11, n. 1, p. 162-167, 2010.

GONZALO, C. et al. Mammary pathogens and their relationship to somatic cell count and milk yield losses in dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, v.85, n.6, 1460-1467, 2002.

MORAES, C.R. Contagem de células somáticas e isolamento bacteriano em leite de ovelhas no estado do Rio Grande do Sul – Brasil. 73f. (Tese) Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 2015.

NUNES, G.R. et al. Avaliação de indicadores inflamatórios no diagnóstico da mamite ovina. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.75, n.3, p.271-278, 2008.

PENGOV, A. The Role of Coagulase Negative Staphylococcus spp. and Associated Somatic Cell Counts in the Ovine Mammary Gland. Journal of Dairy Science, Volume 84, Issue 3, Pages 572–574, 2001.

QUINN, P.J. et al. Clinical Veterinary Medicine. London: Mosby-year, 648p., 1994.

4 ARTIGO 1**Influência da fase de lactação na produção, composição e contagem de células somáticas do leite de ovelhas Lacaune**

(Formatado para a revista *Small Ruminant Research*)

Influência da fase de lactação na produção, composição e contagem de células somáticas do leite de ovelhas Lacaune

L.W. Fava ^a, A.T. Pinto ^b, V. Schmidt ^b

^a Docente no Instituto Federal Catarinense – *campus* Concórdia. Rodovia SC 283, Km 8, Vila Fragosos. CEP: 89703-720. Concórdia, SC, Brasil. Fone: 55 49 3441.4872.

Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, RS, Brasil.

^b Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Medicina Veterinária, Departamento de Medicina Preventiva. Av. Bento Gonçalves, 9090, CEP: 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil. Fone: 55 51 3308. 7858

Resumo

O leite de ovelha caracteriza-se pela riqueza de seus componentes, porém variações na contagem de células somáticas no leite refletem em variações na sua composição. Além disso, o estágio da lactação em que o animal se encontra influencia na composição química e no volume de produção. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência das fases de lactação sobre a produção, composição química e contagem de células somáticas no leite de ovelhas da raça Lacaune. Em um grupo de 15 fêmeas, sendo 10 primíparas, a cada 30 dias, no período de quatro meses, no momento da ordenha e com uso de copo coletor, determinou-se o volume de leite produzido e coletaram-se amostras de leite. Foi avaliada a influência das fases de lactação sobre o volume de leite produzido, composição química e contagem de células somáticas no leite (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey para comparação de médias ou Kruskal-Wallis, para comparação de medianas, com nível de significância de 95% ($P < 0,05$). Não houve diferença significativa no volume de produção entre as diferentes fases estudadas. Entretanto, houve variação significativa ($P < 0,05$) nos teores de gordura, ocorrendo diminuição, e proteína e ESD, com aumento no decorrer da lactação. A contagem de células somáticas no leite não apresentou diferença significativa entre as fases de lactação, apresentando média de $5,42 \log_{10}$ células.mL⁻¹.

Palavras-chave: curva de lactação, leite ovino, CCS, composição química, produção de leite.

1. Introdução

A produção mundial de leite de ovelha foi de mais de 10 milhões de toneladas no ano de 2014, sendo a China o maior produtor (FAOSTAT, 2014). A raça Lacaune é originária do sul da França, região de Roquefort, e evoluiu ao longo dos últimos 40 anos de uma raça de duplo propósito, com baixa produção de leite, a uma raça de alta produção leiteira, mantendo sua capacidade de produção de carne (Barillet et al., 2001).

O leite de ovelha difere do leite das outras espécies devido à riqueza em seus componentes (Assenat, 1991). O conteúdo proteico varia conforme a raça, sendo encontrados na literatura valores em torno de 5% (Brito et al., 2006; Fava et al., 2014). A gordura é o componente que mais sofre variações (Behmer, 1980; Alais, 1985; Assenat, 1991; Ordóñez, 2005) e em ovelhas da raça Lacaune apresenta teor médio de 8% (Larrosa & Kremer, 1990; Fava et al., 2014). O nível de lactose no leite da espécie ovina é semelhante ao de outras espécies (Ramos & Juarez, 2011) e está relacionado à produção de leite, visto que a quantidade de leite produzida na glândula mamária depende das possibilidades de síntese de lactose, sendo este um fator limitante de produção (Alais, 1985; Ordóñez, 2005).

A contagem de células somáticas (CCS) é um importante indicador de saúde da glândula mamária (Viana et al., 2010), mas é pouco conhecida na espécie ovina (Gomes et al., 2008). Os valores de CCS no leite de ovelhas saudáveis encontram-se abaixo de $0,5 \times 10^6$ células.mL⁻¹ (Gonzalo et al., 2002; Bergonier & Berthelot, 2003; Blagitz et al., 2008; Barbosa et al., 2012), havendo menores contagens no início da lactação e maiores contagens no final, devido à relação com a maior resistência a infecções intramamárias neste período (Blagitz et al., 2013). Variações na CCS também refletem em variações na composição do leite, devido à redução da síntese dos constituintes (Raynal-Ljutovac et al., 2007). Pode haver aumento nos teores de gordura e proteína com o aumento na CCS, devido à redução do volume de leite produzido e seu efeito de concentração dos componentes (Blagitz et al., 2013).

O volume de leite produzido, a composição química e as propriedades físicas são influenciadas por fatores genéticos e fisiológicos, pelo manejo da propriedade incluindo, principalmente, a alimentação dos animais e o método de ordenha (Bencini & Pulina, 1997). O estágio da lactação em que o animal se encontra influencia significativamente a composição química e a produção de leite (Fuertes et al., 1998). Além disso, as propriedades físico-químicas do leite variam de acordo com as condições de produção e com as características individuais dos animais (Pavić et al., 2002).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência das fases de lactação sobre a produção, composição química e contagem de células somáticas no leite de ovelhas da raça Lacaune.

2. Materiais e métodos

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (número 28225).

2.1 Manejo dos animais

Em uma propriedade situada em Chapecó (Santa Catarina/Brasil), foi avaliado um grupo de 15 fêmeas, todas em início de lactação, das quais 10 eram primíparas. O manejo do grupo experimental não sofreu alteração, sendo o mesmo de todos os animais da propriedade. A ordenha era mecanizada, sendo realizada duas vezes ao dia.

A alimentação dos animais era fornecida duas vezes ao dia, com silagem de milho, feno de tifton (*Cynodon* spp.) e pastagem (aveia e azevém no inverno e *Cynodon* spp. e capim sudão no verão). A ração fornecida era à base de milho grão úmido, farelo de soja e aditivos minerais, segundo as recomendações do NRC (2007). Para as fêmeas recém-paridas eram fornecidos 1,2 kg de ração, chegando a 0,5 kg nas fêmeas em estágio final de lactação.

2.2 Coletas de leite

No período de abril a agosto de 2015, mensalmente, foram realizadas as coletas individuais de leite na propriedade.

Após a ordenha dos animais, foram coletadas amostras de leite diretamente do copo coletor, contabilizando o volume produzido, na ordenha da manhã e da tarde, formando uma única amostra por animal, totalizando 15 amostras mensais. As amostras foram encaminhadas para o Laboratório Estadual de Qualidade do Leite (UnC/SC), para avaliação da composição química do leite (método infravermelho) e da contagem de células somáticas (CCS – citometria de fluxo).

As fases de produção foram divididas em: 1 - colostro (até 7 dias); 2 - fase crescente de produção (8 a 41 dias de lactação); 3 - pico de lactação (42 a 56 dias); 4 - período de queda de produção (57 a 120 dias) e 5 – lactação persistente (acima de 121 dias de lactação) (Anderson et al., 2005). A fase 1 não foi avaliada, por representar o período de colostro, quando o leite era destinado aos cordeiros.

2.3 Análise estatística

Foi realizada estatística descritiva e para avaliação da influência das fases de lactação sobre o volume de leite produzido, composição química e contagem de células somáticas no leite foi realizada análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey para comparação de médias ou Kruskal-Wallis, para comparação de medianas, com nível de significância de 95% ($P < 0,05$). Utilizou-se o programa GrpPad InStat.

3. Resultados e discussão

A produção mediana de leite diária dos animais no período estudado foi de 976,66 mL. Embora não tenha sido demonstrada diferença significativa no volume de produção total entre as diferentes fases estudadas, observou-se tendência ao aumento da produção na fase 3, que corresponde ao pico de lactação, seguido pela queda de produção, nas fases 4 e 5 (Figura 1). A grande variabilidade no volume de produção entre as fêmeas pode explicar a ausência de diferença no volume de produção entre as fases, pois não foi realizada análise individual dos animais. Segundo Gonzalo et al. (1994), o baixo volume de produção das fêmeas do presente estudo pode ser explicado pelo número de partos, pois há efeito significativo no volume de produção, no teor de proteína e na contagem de células somáticas do leite. Mesmo que as fêmeas utilizadas no experimento tenham sido da raça Lacaune e puras de grau de sangue, em sua maioria eram primíparas.

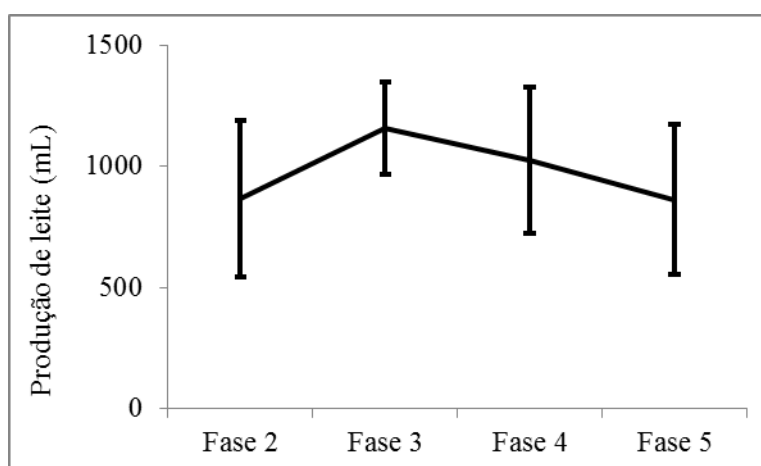


Figura 1: Volume total de produção de leite diária média (mL) dos animais nas diferentes fases de lactação.

Os valores médios de gordura, proteína, lactose, extrato seco total (EST) e desengordurado (ESD) são apresentados na tabela 1. Houve variação significativa ($P < 0,05$) nos teores de gordura, proteína e ESD nas diferentes fases de lactação.

A gordura do leite foi maior na fase 2, apresentando redução nas fases subsequentes e o teor de proteína aumentou com o avanço da lactação. A gordura do leite pode apresentar maior concentração no início da lactação, devido ao menor volume de leite produzido nessa fase (Sevi et al., 2004), corroborando os resultados obtidos no presente estudo. Segundo Pugliese et al. (2000), os teores de gordura e proteína tendem a aumentar no final da lactação, devido à diminuição no volume de produção e à consequente concentração dos componentes no leite. Contudo, no presente estudo o teor de gordura apresentou tendência à diminuição. Tal fato pode ser explicado pela influência da alimentação dos animais na produção e composição do leite. Segundo Auld (1998), os teores de proteína e a gordura do leite não são afetados pelo estágio de lactação, mas pela disponibilidade de forragem. Além da nutrição, fatores climáticos também devem ser levados em consideração (Maria-Levrino, 1990), pois em temperaturas ambientais elevadas há diminuição da produção de leite, causando o efeito de concentração dos componentes afetando, principalmente, teores de gordura e proteína (Sevi et al., 2004). Nos meses de estudo, a temperatura ambiente não se apresentou elevada, pois correspondeu às estações de outono e inverno no país.

Tabela 1: Valores médios (\pm desvio-padrão) de gordura, proteína, lactose, extrato seco total (EST) e desengordurado (ESD) no leite de ovelhas da raça Lacaune, nas diferentes fases de lactação (FL).

FL	Gordura (%)	Proteína (%)	Lactose (%)	EST (%)	ESD (%)
Fase 2	8,11 \pm 0,96 ^a	4,21 \pm 0,21 ^a	4,53 \pm 0,17	17,72 \pm 0,97	9,62 \pm 0,32 ^a
Fase 3	6,90 \pm 0,54 ^b	4,52 \pm 0,30 ^{ab}	4,69 \pm 0,16	17,12 \pm 0,63	10,22 \pm 0,33 ^b
Fase 4	7,08 \pm 1,00 ^b	4,70 \pm 0,29 ^b	4,53 \pm 0,24	17,39 \pm 0,91	10,28 \pm 0,38 ^{bc}
Fase 5	6,38 \pm 0,9 ^b	4,82 \pm 0,43 ^b	4,67 \pm 0,26	17,07 \pm 1,21	10,67 \pm 0,51 ^c

*valores seguidos de letras diferentes na coluna diferem significativamente ($p < 0,05$).

O ESD apresentou aumento gradativo de acordo com o estágio de lactação, sendo influenciado pela mesma variação dos teores de proteína do leite. Devido à diminuição no volume de produção e consequente concentração dos componentes, tal fato era esperado, visto que os teores de proteína apresentaram o mesmo

comportamento. No mesmo ciclo de produção, o ESD apresenta variação inversa à curva de produção de leite (Kitchen, 1981).

A lactose é o componente menos variável no leite (Alais, 1985; Ordóñez, 2005), não apresentando variações nas diferentes fases de lactação no presente estudo, com média de 4,61%. A curva de produção de lactose é similar à curva de produção de leite, visto que esse é o componente osmótico do leite e sua síntese é o principal responsável pela extração de água (Alais, 1985; Mahieu, 1991).

O conteúdo de EST não variou de forma significativa durante as fases de produção, apresentando média de 17,33%. Tal resultado pode ser explicado pelo comportamento inverso dos teores de gordura e proteína, apresentando diminuição e aumento, respectivamente, no decorrer da lactação. Valores superiores foram encontrados em estudo com a mesma raça, no Rio Grande do Sul (Fava et al, 2014), avaliando leite de conjunto.

A contagem de células somáticas no leite não apresentou diferença significativa entre as fases de lactação, apresentando média de 5,42 \log_{10} células.mL⁻¹ (Figura 2).

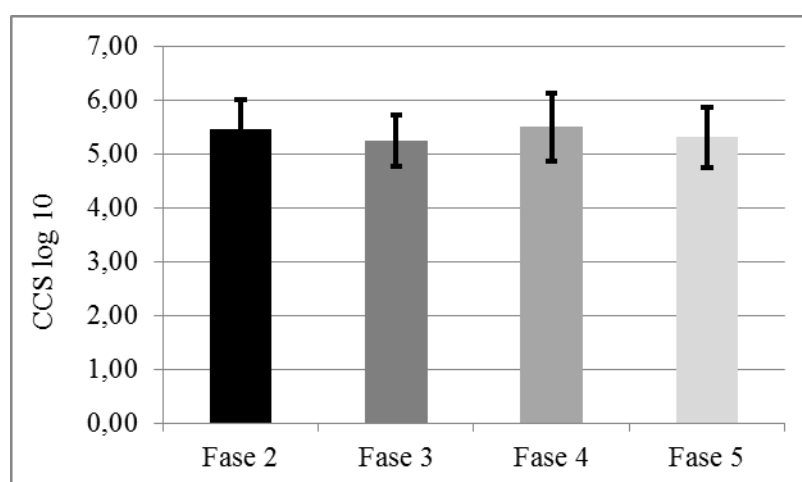


Figura 2: Contagem de células somáticas (CCS log 10) no leite de ovelhas da raça Lacaune nas diferentes fases de lactação.

Segundo Fthenakis (1996), o número de partos não influencia a CCS até a segunda lactação e o estágio de lactação exerce influência significativa, havendo aumento na contagem com o avançar da lactação. Tal fato pode ser explicado pela diminuição do volume de produção no final da lactação e o consequente efeito de concentração das células (Fthenakis, 1996; Pugliese et al., 2000) e, também, devido à involução da glândula mamária e o aumento do fluxo de macrófagos para remoção dos

componentes do leite por fagocitose e proteção contra infecções neste período (Fthenakis, 1996). Contudo, no presente estudo não foi observada diferença na CCS do leite entre as diferentes fases de lactação, podendo ser explicado pelo fato de não ter ocorrido diminuição significativa no volume de produção com o avançar da lactação, não ocorrendo o esperado efeito de concentração das células. Além disso, como a maioria das fêmeas utilizadas eram primíparas, o número de partos não exerceu influência sobre a CCS.

A CCS considerada normal para a espécie ovina é inferior a $0,5 \times 10^6$ células.mL⁻¹ (Gonzalo et al., 2002; Bergonier & Berthelot, 2003; Blagitz et al., 2008; Nunes et al., 2008; Souza et al., 2012). Segundo Nunes et al. (2008), o valor logarítmico de corte que prediz a presença bacteriana é de 5,699, sendo superior à média encontrada no presente estudo, o que pode indicar boa saúde do úbere das fêmeas acompanhadas no estudo.

4. Conclusão

No decorrer de cinco meses de lactação de fêmeas da raça Lacaune, apesar de ser observada uma curva padrão de produção de leite, incluindo todas as fases de produção, não houve diferença significativa no volume total de leite produzido nas diferentes fases, indicando boa persistência de lactação. A média de CCS encontrada no presente estudo aliada à composição química do leite podem indicar boa saúde do úbere das fêmeas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Cabanha Chapecó (Santa Catarina – Brasil), seus técnicos e membros, por permitirem a realização do presente estudo.

Referências

Alais, C., 1985. Ciencia de la leche - Principios de técnica lechera. 4. ed. Barcelona: Editorial Reverté, S.A., 873 p.

Auldist, M.J., Walsh, B.J., Thomson, N.A., 1998. Seasonal and lactational influences on bovine milk composition in New Zealand. J. Dairy Sci. 65, 401–411.

Anderson, D. E.; Hull, B. L.; Pugh, D. G., 2005. Enfermidades da glândula mamária. In: PUGH, D. G. Clínica de ovinos e caprinos. São Paulo: Roca. 513 p.

Assenat, L., 1991. Leche de oveja. In: LUQUET, F.M. Leche y productos lacteos: vaca – oveja – cabra. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A. V. 1, Parte II, p. 275 – 339.

Barbosa, D.A. et al., 2012. Contagem automática e microscópica direta de células somáticas do leite de ovelhas Santa Inês, utilizando como corantes o Broadhurst-Palley e a hematoxilina-eosina. *Ciência Animal*, v. 22, n. 3, p. 17-23.

Barillet, F. et al., 2001. The French Lacaune dairy sheep breed: use in France and abroad in the last 40 years. *Livestock Production Science*, v. 71, p. 17–29.

Behmer, M.L.A., 1980. Tecnologia do leite. 10. ed. São Paulo: Nobel, 322 p.

Bergonier, D., Berthelot, X., 2003. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. *Livestock Production Science*, Volume 79, Issue 1, January 2003, Pages 1–16.

Bencini, R., Pulina, G., 1997. The quality of sheep milk: a Review. *Wool Technology and Sheep Breeding*, v.45, p.182-220.

Blagitz, M.G. et al., 2008. Perfil celular e microbiológico do leite de ovelhas Santa Inês no período lactante e pós-desmame. *Pesq. Vet. Bras.* 28(9):417-422.

Blagitz, M.G. et al., 2013. Variações metodológicas na contagem de células somáticas do leite de ovelhas da raça Santa Inês. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.43, n.4, p.668-671.

Brito, M.A. et al., 2006. Composição do sangue e do leite em ovinos leiteiros do sul do Brasil: variações na gestação e na lactação. *Ciência Rural*, v. 36, n.3, p.942-948. 2006.

Fava, L.W., Külkamp-Guerreiro, I.C., Pinto, A.T., 2014. Evaluation of physico chemical characteristics of fresh, refrigerated and frozen Lacaune ewes' milk. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, n.6, p.1924-1930.

FAOSTAT, 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QL/E>. Acesso em: 21 out. 2016.

Fthenakis, G.C., 1996. Somatic cell counts in milk of Welsh-Mountain, Dorset-Horn and Chios ewes throughout lactation. *Small Ruminant Research*, 20,155 - 162.

Fuertes, J.A. et al., 1998. Parameters of Test Day Milk Yield and Milk Components for Dairy Ewes. *Journal of Dairy Science* Vol. 81, No. 5.

Gomes, V. et al., 2008. Avaliação dos métodos de contagem de células somáticas (CCS) para diagnóstico de infecção mamária em ovelhas da raça Lacaune. *Ensaios e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde* Vol. XII, Nº. 2, Ano 2008.

Gonzalo, C. et al., 2002. Mammary pathogens and their relationship to somatic cell count and milk yield losses in dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, 85(6):1460-7.

Gonzalo, C. et al., 1994. Factors Influencing Variation of Test Day Milk Yield, Somatic Cell Count, Fat, and Protein in Dairy Sheep. *Journal of Dairy Science* Vol. 77, No. 6.

Kitchen, B.J., 1981. Review of progress of dairy science; bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. *Journal of Dairy Research*, 48: 167.

Larrosa, J.R.; Kremer, R., 1990. Leche ovina y caprina – Una nueva alternativa agroindustrial. Montevideo: Editorial Hemisferio Sur, 172 p.

Mahieu, H., 1991. Factores que influyen na la composición de la leche. In: LUQUET, F.M. *Leche y productos lacteos: vaca – oveja – cabra*. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A., 1991. v. 1, Parte I, Cap. 3 p. 117 – 179.

Maria-Levrino, G., Gabina, D., 1990. Environmental effects on milk production of milking sheep. *J. Dairy Sci.* 73 (Suppl. 1), 1251.

Moraes, C.R., 2015. Contagem de células somáticas e isolamento bacteriano em leite de ovelhas no estado do Rio Grande do Sul – Brasil. 73f. (Tese) Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

National Research Council – NRC, 2007. Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. Washington, DC.: National Academy Press, 384p.

Nunes, G.R. et al., 2008. Avaliação de indicadores inflamatórios no diagnóstico da mamite ovina. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.75, n.3, p.271-278.

Ordóñez, J.A., 2005. Características gerais do leite e componentes fundamentais. In: _____. *Tecnologia de Alimentos – Alimentos de Origem Animal*. Porto Alegre: Artmed, v. 2, cap. 1, p. 13 – 37.

Pavić, V. et al., 2002. Influence of stage of lactation on the chemical composition and physical properties of sheep milk. *Czech J. Anim. Sci.*, 47 (2): 80–84.

Pugliese, C. et al., 2000. Evolution of chemical composition, somatic cell count and renneting properties of the milk of Massese ewes. *Small Ruminant Research* 35, 71- 80.

Ramos, M.; Juarez, M., 2011. Sheep Milk. In: FUQUAY, J.W.; FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. *Encyclopedia of dairy sciences*. 2. ed. Elsevier, 2011. v. 3, p. 494 – 502.

Raynal-Ljutovac, K. et al., 2007. Somatic cells of goat and sheep milk: analytical, sanitary, productive and technological aspects. *Small Ruminant Research*, v.68, p. 126-144.

Sevi, A. et al., 2004. Effects of lambing season and stage of lactation on ewe milk quality. *Small Ruminant Research*, 51, 251–259.

Souza, F.N. et al., 2012. Somatic cell count in small ruminants: Friend or foe? *Small Ruminant Research*, 107, 65– 75.

Viana, K.F. et al., 2010. Comparação da contagem de células somáticas em leite cru por quatro métodos de coloração. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.4, n.1, p.5

5 ARTIGO 2**Caracterização físico-química de manteiga produzida com silagem de colostro
ovino**

(Formatado para a revista *Small Ruminant Research*)

Caracterização físico-química de manteiga produzida com silagem de colostro ovino

L.W. Fava ^a, Schmidt ^b, A.T. Pinto ^b

^a Docente no Instituto Federal Catarinense – *campus* Concórdia. Rodovia SC 283, Km 8, Vila Fragosos. CEP: 89703-720. Concórdia, SC, Brasil. Fone: 55 49 3441.4872.

Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, RS, Brasil.

^b Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Medicina Veterinária, Departamento de Medicina Preventiva. Av. Bento Gonçalves, 9090, CEP: 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil. Fone: 55 51 3308.7858

Resumo

A produção de silagem de colostro baseia-se na sua fermentação anaeróbia, sendo fornecida na alimentação de bezerros, mantendo suas características físico-químicas. As alterações decorrentes do processo tornam o produto seguro do ponto de vista microbiológico. O objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade tecnológica da silagem de colostro ovino para a produção de manteiga. Foram coletados 10 litros de colostro de terceiro dia de ovelhas da raça Lacaune, sendo realizadas sua caracterização química e física a partir da determinação do teor de gordura, densidade relativa, acidez titulável e pH. A silagem foi produzida através do armazenamento em garrafas pet pelo período de 30 dias em temperatura ambiente (20°C). A camada de gordura utilizada para a produção de manteiga foi pesada em balança analítica e analisada quanto ao teor de gordura e a manteiga foi produzida através da batida em batedeira doméstica. A manteiga foi pesada em balança analítica e foram realizadas as análises de determinação da gordura e acidez titulável, determinação da atividade de água, do teor de umidade, análise colorimétrica e avaliação da oxidação da amostra pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBA) modificado. O colostro de terceiro dia apresentou 8,75% de gordura, 7,12% de proteína, 3,90% de lactose e 21,11% de extrato seco total (EST). Os valores de pH, acidez titulável e densidade relativa do colostro foram de 6,38, 27,17°D e 1,038 g.mL⁻¹, respectivamente. O teor de gordura obtido na camada gordurosa destinada à produção de manteiga foi de 27,33 ± 2,3%, o peso total foi de 2.235,6 Kg e o peso da manteiga produzida foi de 1.125,2 Kg. A manteiga apresentou 59 ± 0,00% de gordura, 2,56 ± 0,32% de acidez titulável, 0,96 ± 0,00 de atividade de água e índice de TBA de 0,13 ± 0,02 mg MA.Kg⁻¹. Na análise colorimétrica, os parâmetros de cor L*, a* e b*

foram de $89,66 \pm 1,50$, $-1,98 \pm 0,27$ e $11,41 \pm 0,36$, respectivamente. A silagem de colostro ovino apresentou viabilidade tecnológica para produção de manteiga.

Palavras-chave: colostro ovino, silagem de colostro, manteiga.

1. Introdução

O colostro é uma secreção da glândula mamária produzida antes do parto e 24 a 48 horas após o nascimento dos cordeiros, posteriormente transformando-se em leite (Pavlíková et al., 2010). Entretanto, por definição, apenas a secreção da primeira ordenha após o parto pode assim ser denominada e as secreções subsequentes são consideradas leite de transição, pois nesse período há substituição gradual pela secreção de leite (Azevedo et al., 2013). Considerado fundamental no desenvolvimento do filhote, não somente devido à transmissão de imunidade passiva (Georgiev, 2008), o colostro é fonte de nutrientes essenciais e componentes biologicamente ativos, como moléculas antimicrobianas, hormônios e fatores de crescimento (Odle et al., 1996). Difere do leite pela alta concentração de proteínas, minerais, vitaminas, gordura e sólidos totais (Kehoe et al., 2007). O elevado teor proteico está relacionado às proteínas do soro, especialmente imunoglobulinas (Georgiev, 2008).

Com o aumento crescente da população mundial, faz-se necessário o aproveitamento máximo dos alimentos, entretanto, o potencial nutritivo dos produtos alimentícios não é totalmente aproveitado (Saalfeld et al., 2012). Dessa forma, o leite colostrado pode ser utilizado tanto como alimento, como suplemento nutricional ou imunológico, pois é considerado um alimento que promove a saúde (Uruakpa et al., 2002). Em muitos países o colostro bovino é utilizado de diversas formas na alimentação humana (Saalfeld et al., 2012). Além disso, a suplementação com colostro bovino associada ao exercício físico resulta em aumento da massa muscular (Antonio et al., 2001), melhora na performance do exercício (Coombes et al., 2002) e na posterior recuperação (Buckley et al., 2002), além da sua capacidade tamponante sobre os efeitos acidificantes do exercício (Brinkworth et al., 2002). Seu mecanismo de ação não está bem determinado, mas sugere-se que provoca aumento da absorção de nutrientes (Mero et al., 1997; Coombes et al., 2002; Kuipers et al., 2002).

A fermentação anaeróbica do colostro mantém as características físico-químicas encontradas no colostro *in natura*, sendo o produto resultante denominado de silagem de colostro (Saalfeld et al., 2012). Apesar de muitas bactérias patogênicas, incluindo *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*, serem encontradas no

colostro e, conseqüentemente, transmitidas através do seu consumo, após 21 dias de fermentação o produto torna-se microbiologicamente seguro, devido às condições ácidas do meio. Acredita-se que bactérias do gênero *Lactobacillus* spp. são responsáveis pelo processo de fermentação e pela supressão do crescimento de bactérias deteriorantes e patogênicas, permanecendo viáveis no produto fermentado (Saalfeld et al., 2013).

No Brasil não é permitido o beneficiamento do colostro para fins alimentícios (Brasil, 2017). Porém, por ser uma alternativa na produção de alimentos e suplementos alimentares ou imunológicos, o objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade tecnológica da silagem de colostro ovino para a produção de manteiga.

2. Materiais e métodos

Ovelhas no período de três dias após o parto foram ordenhadas mecanicamente para obtenção do colostro, em uma propriedade localizada em Chapecó/SC. A coleta não foi realizada em período anterior, devido às propriedades imunológicas do colostro e sua utilização na propriedade para alimentação dos recém-nascidos.

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (número 28225).

2.1 Análises físico-químicas do leite colostrado

Uma alíquota foi destinada para análise de composição química (radiação infravermelha) e outra para as análises de teor de gordura (método Gerber), densidade relativa, acidez titulável e pH (Brasil, 2006).

As análises de teor de gordura, densidade relativa, acidez titulável e pH foram realizadas em triplicata.

2.2 Produção e análise da silagem de colostro

A silagem foi produzida com 10 litros de colostro, através do armazenamento em garrafas pet de dois litros, produzindo ambiente favorável para a fermentação anaeróbica (Saalfeld, 2008), pelo período de 30 dias.

Após o período de fermentação, a camada de gordura que ascendeu e separou-se do restante dos componentes do leite colostrado nas garrafas, utilizada para a produção de manteiga, foi colhida e pesada em balança analítica e analisada quanto ao teor de gordura (Brasil, 2006).

2.3 *Produção e análise de manteiga*

A manteiga foi produzida através da batida da camada de gordura formada na silagem, em batedeira doméstica, até a formação dos grãos de manteiga e expulsão do leite. Após sucessivas lavagens com água gelada e drenagem do leite, o produto obtido foi armazenado e congelado em freezer vertical a -80°C até o momento das análises.

A manteiga foi pesada em balança analítica e foram realizadas as análises de determinação da gordura e acidez titulável (Brasil, 2006); determinação da atividade de água, utilizando analisador da marca Labmaster[®] (Aw-Novasina AG CH-8853); análise colorimétrica, utilizando colorímetro (Minolta[®] Color Reader, CR400, Japão); e avaliação da oxidação da amostra pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBA) modificado (Vargas Jr., 2014), sendo os valores expressos em miligramas de malonaldeído por quilograma de amostra (mg MA.Kg^{-1}). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Na análise colorimétrica, os parâmetros de cor L^* , a^* , b^* foram determinados pelo instrumento. O parâmetro L^* indica a luminosidade e se refere à capacidade do objeto em refletir ou transmitir luz, variando em uma escala de zero a 100. O parâmetro a^* refere-se à contribuição das cores verde (-) / vermelha (+), ou seja, a intensidade da cor vermelha, e o parâmetro b^* às cores azul (-) / amarela (+), ou seja, a intensidade da cor amarela.

3. **Resultados e discussão**

O colostro de terceiro dia apresentou 8,75% de gordura, 7,12% de proteína, 3,90% de lactose e 21,11% de extrato seco total (EST). Valores semelhantes foram encontrados por Fernandes et al. (2013), os quais analisaram leite colostrado de ovelhas da raça Santa Inês, 48 horas após o parto, obtendo valores médios de gordura, proteína e EST de $5,79\% \pm 3,37$, $8,10\% \pm 2,43$ e $18,07\% \pm 1,41$, respectivamente. Em estudo realizado no México (Nieto et al., 2015), o colostro de ovelhas da raça Rambouillet, coletado e analisado imediatamente após o parto, apresentou 14,3% de proteína, 8,9% de gordura e 1,2% de lactose.

O colostro ovino obtido na primeira ordenha após o parto contém, aproximadamente, 3% de gordura, 11,8% de proteína, 3,3% de lactose, 0,9% de minerais e 28,9% de sólidos totais (Ramos & Juarez, 2011). Comparando-se ao leite, o colostro contém elevados níveis de proteína, especialmente, imunoglobulinas, devido à

sua função imunológica (Blum & Baumrucker, 2002). Do contrário, os conteúdos de lactose e caseína são mais baixos. A alteração mais consistente que ocorre na transição de colostro para leite é a redução no teor de proteína, especialmente no terceiro dia após o parto, devido à acentuada diminuição nas frações de imunoglobulinas (Ontsouka et al., 2003).

Os valores de pH, acidez titulável e densidade relativa a 15°C do colostro foram de 6,38, 27,17°D (0,2717% de ácido láctico) e 1,038 g.mL⁻¹, respectivamente. Valores superiores de densidade (1,041 g.mL⁻¹) e acidez titulável (0,6507% de ácido láctico) foram encontrados em estudo realizado com colostro de terceiro dia de ovelhas da raça Awassi na Turquia. No mesmo estudo, demonstrou-se a diminuição gradual da acidez titulável até a produção de leite, chegando a valores de 0,234% de ácido láctico (Karaca & Ocak, 2016). Tal fato pode ser explicado pelo maior teor de proteína encontrado no colostro, pois o teor proteico influencia a acidez titulável (Walstra et al., 2006).

Após a fermentação de 30 dias, produzindo silagem de colostro, houve separação das camadas de gordura e proteína, com ascensão da camada gordurosa. A camada gordurosa colhida pesou 2.235,6 g e apresentou teor de gordura de 27,33 ± 2,3%.

O peso da manteiga produzida foi de 1.125,2 g, havendo um rendimento de 50,33% na produção. A manteiga apresentou 59 ± 0,00% de gordura, 2,56 ± 0,32% de acidez titulável, 0,96 ± 0,00 de atividade de água e índice de TBA de 0,13 ± 0,02 mg MA.Kg⁻¹. Na análise colorimétrica, os parâmetros de cor L*, a* e b* foram de 89,66 ± 1,50, -1,98 ± 0,27 e 11,41 ± 0,36, respectivamente.

Houve concentração da gordura, através da batidura e malaxagem da amostra e consequente expulsão do leitelho. Contudo, o teor de matéria gorda ficou abaixo dos valores estabelecidos para manteiga, sendo de, no mínimo, 82% para manteiga sem sal (Brasil, 1996), quando produzida com creme de leite.

Apesar da acidificação que ocorre no processo fermentativo da silagem, a acidez titulável da manteiga produzida não se apresentou elevada, pois o máximo estabelecido para manteiga é de 3%. Em estudo realizado na Arábia Saudita (Sawaya et al., 1984), foi produzida manteiga com leite de ovelhas das raças Najdi e Nuaimi, obtendo-se acidez média de 1,05% e 0,96%, respectivamente. Os valores obtidos no presente estudo foram superiores devido à utilização da silagem para a produção, uma matéria-prima com maior acidez que o leite.

A oxidação lipídica gera sabores indesejáveis nos produtos, sendo desenvolvida durante a estocagem (Wedding & Deeth, 2009). As modificações oxidativas são quantificadas através dos produtos secundários da degradação. As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico são um bom indicador do grau de deterioração nas características organolépticas como resultado da oxidação (Crackel et al., 1988). Valores inferiores a $0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$ são considerados baixos ou indicadores de nenhuma rancificação, valores entre 0,6 e $1,4 \text{ mg.Kg}^{-1}$ indicam produtos levemente rançosos e valores superiores a 1,5 representam produtos rançosos e inaceitáveis sensorialmente (Ke et al., 1984). No presente estudo, o valor médio encontrado foi de $0,1352 \text{ mg.Kg}^{-1}$, indicando que o produto não apresentou rancificação, mesmo com seu elevado teor lipídico. Esse fato pode estar associado ao processo fermentativo da silagem, pois a anaerobiose necessária para a produção de silagem inibe os processos bioquímicos oxidativos que causam a deterioração (Oetterer, 1999). Do processo de oxidação dos lipídios por oxigênio resultam compostos como peróxidos, aldeídos, cetonas e ácidos, responsáveis pelas alterações organolépticas, nutricionais e físico-químicas, influenciando diretamente na vida-de-prateleira dos alimentos (Tamine, 2009).

A cor é um dos principais parâmetros de qualidade e influencia na aceitação dos produtos alimentícios por parte dos consumidores (Dias et al., 2012). Na análise colorimétrica, quanto maior o valor de L^* , mais clara é a amostra. No presente estudo, a amostra analisada apresentou alta luminosidade, com predominância do componente amarelo (b^*) sobre o componente verde (a^*), sendo que esse último não contribuiu de forma significativa na formação da cor, por apresentar valores muito baixos. A coloração indicativa da amostra foi branco amarelada, sendo mais clara que as manteigas encontradas no mercado. Em estudo realizado por Brandão et al. (2015), a manteiga produzida a partir de leite bovino apresentou parâmetros de cor L^* , a^* e b^* de 85,218; - 2,726 e 32,006 respectivamente. Houve semelhança na luminosidade da manteiga, porém pode-se observar grande diferença na intensidade da cor amarela, quando comparado ao presente estudo, o que diferencia a coloração amarelo clara da coloração branco amarelada. Apesar de desempenhar papel importante na aceitação, a coloração da manteiga raramente é um problema na indústria, pois há a opção da adição de corantes ao produto, sendo a cor natural influenciada pelo teor de β -caroteno na matéria-prima (Walstra et al., 2006).

4. Conclusão

A silagem de colostro ovino apresentou viabilidade tecnológica para produção de manteiga, pois apesar da acidificação ocorrida no processo, o produto produzido não apresentou acidez elevada, nem indicação de rancificação. Além disso, sua produção poderia agregar valor ao produto, pois há utilização de matéria-prima não convencional. Mais estudos devem ser desenvolvidos para avaliar a aptidão tecnológica do colostro para a produção de derivados, além de realização de análise sensorial dos produtos para verificação da aceitação por parte dos consumidores.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Cabanha Chapecó (Santa Catarina – Brasil), seus técnicos e membros, por permitirem a realização do presente estudo.

Referências

Antonio, J.; Sanders, M.S.; Van Gammeren, D., 2001. The effects of bovine colostrum supplementation on body composition and exercise performance in active men and women. *Nutrition*, 17, 243–7.

Azevedo, R.A. et al., 2013. Desempenho de bezerros alimentados com silagem de leite de transição. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.48, n.5, p.545-552.

Blum, J. W.; Baumrucker, C. R., 2002. Colostral and milk insulin-like growth factors and related substance: Mammary gland and neonatal (intestinal and systemic) targets. *Domestic Animal Endocrinology*, 23, No 1-2, 101–110.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto Nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. *Diário Oficial da União*, 29 mar. 2017.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 146 de 7 de março de 1996. *Diário Oficial da União*, 11 mar. 1996.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 68 de 12 de Dezembro de 2006. Diário Oficial da União, 14 dez. 2006. Seção 1, p. 8.

Brinkworth, G.D. et al., 2002. Oral bovine colostrum supplementation enhances buffer capacity but not rowing performance in elite female rowers. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 12, 349–63.

Buckley, J.D. et al., 2002. Bovine colostrum supplementation during endurance running training improves recovery, but not performance. *J Sci Med Sport*, 5, 65–79.

Crackel, R.L. et al., 1988. Some further observations on the TBA test as an index of lipid oxidation in meats. *Food Chemistry*, V.28, Issue 3, 187-196.

Coombes, J. et al., 2002. Dose effects of oral bovine colostrum supplementation on physical work capacity in cyclists. *Med Sci Sports Exerc*, 34, 1184–8.

Dias, N.A.A. et al., 2012. Influence of color on acceptance and identification of flavor of foods by adults. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 32(2), 296-301.

Fava, L.W.; Kulkamp-Guerreiro, I.C.; Pinto, A.T., 2014. Evaluation of physico-chemical characteristics of fresh, refrigerated and frozen Lacaune ewes' milk. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, n.6, p.1924-1930.

Fernandes, S. et al., 2013. Efeitos da nutrição, idade a desmama e mastite sobre a qualidade do colostro e leite de ovelhas. *Vet. e Zootec.*, 20(4), 615-623.

Georgiev, I.P., 2008. Alterations in chemical composition of colostrum in relationship to post-partum time. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* v.8, n.1, p.35-39.

Karaca, O.B.; Ocak, S., 2016. Changes in composition of awassi and saanen colostrum during postpartum. In: *International Conference on Tropical Animal Science and Production (TASP 2016)*, I, 2016, Bangkok, Proceedings, 335 – 339.

Ke, P.J.; Cervantes, E.; Robles-Martinez, C., 1984. Determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in fish tissue by an improved distillation–spectrophotometric method. *Journal of the Science of Food on Agriculture*, v. 35, p. 1248 – 1254.

Kehoe, S.I. et al., 2007. A survey of bovine colostrum composition and colostrum management practices on Pennsylvania dairy farms. *J Dairy Sci*, v.90, p.4108-4116.

Kuipers, H. et al, 2002. Effects of oral bovine colostrum supplementation on serum insulin-like growth factor-I levels. *Nutrition*,18, 566–7.

Mero, A. et al., 1997. Effects of bovine colostrum supplementation on serum IGF-1, IgG, hormone and saliva IgA during training. *J Appl Physiol*, 83, 1144–51.

Nieto, C.A.R. et al., 2015. Effects of vitamin E supply during late gestation and early lactation upon colostrum composition, milk production and quality nutritional restricted ewes. *Small Ruminant Research*, 133, 77–81.

Odle J., Zijlstra R., Donovan S., 1996. Intestinal effects of milk borne growth factors in neonates of agricultural importance. *J Anim Sci*,74, 2509–22.

Oetterer, M. 1999. Produtos fermentados de pescado. In: OGAWA, M; MAIA, E.L. *Manual de pesca- ciência e tecnologia do pescado*. São Paulo:Varela, v.1,p. 353-359.

Ontsouka, C. E.; Bruckmaier, R. M.; Blum. J. W., 2003. Fractionized milk composition during removal of colostrum and mature milk. *Journal of Dairy Science*, 86, 2005–2011.

Pavlíková, E. et al., 2010. Variation in fatty acid composition of ewes' colostrum and mature milk fat . *International Dairy Journal*, 20, 637 - 641.

Ramos, M., Juarez, M., 2011. Sheep Milk. In: Fuquay, J.W.; Fox, P.F.; Mcsweeney, P.L.H. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2 ed. Elsevier. Vol. 3, p. 494 – 502.

Saalfeld, M. H. 2008. Uso da silagem de colostro como substituto do leite na alimentação. *A Hora Veterinária*, Porto Alegre, ano 27, n. 162, p. 59-62, mar./abr.

Saalfeld, M.H. et al., 2012. Colostro: A redescoberta de um alimento saudável, nutritivo e com potencial probiótico. *Agroecologia e Desenv. Rural Sustentável*, v. 5, n. 2, p. 18-24.

Saalfeld, M.H. et al., 2013. Anaerobically fermented colostrum: an alternative for feeding calves. *Ciência Rural*, v.43, n.9, p.1636-1641.

Tamine, A.Y. *Dairy fats and related products*, 2009. Oxford: Wiley – Blackwell, 326p.

Uruakpa, F.O.; Ismond, M.A.H.; Akobundu, E.N.T., 2002. Colostrum and its benefits: a review. *Nutrition Research*, 22, 755–767.

Vargas Jr, A., 2014. Blendas de polietileno-amido duo-funcionais: ações antioxidante e antimicrobiana em produto cárneo. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. 132 pg.

Walstra, P.; Wouters, J.T.M.; Geurts, T.J., 2006. *Dairy science and technology*. 2. ed. Taylor & Francis, 763 p.

Wedding, B.B.C.; Deeth, H.C., 2009. Trouble Shooting. In: TAMINE, A.Y. *Dairy Fats and Related Products*. The Society of Dairy Technology. Wiley-Blackwell, p. 286 – 311.

6 ARTIGO 3**Avaliação da atividade da fosfatase alcalina no leite ovino submetido a tratamento
térmico**

(Formatado para a revista Ciência Rural)

Avaliação da atividade da fosfatase alcalina no leite ovino submetido a tratamento térmico

Evaluation of alkaline phosphatase activity in sheep milk submitted to heat treatment

L.W. Fava^I, V. Schmidt^{II}, A.T. Pinto^{II}

^I Instituto Federal Catarinense – *campus* Concórdia. Rodovia SC 283, Km 8, Vila Fragosos. CEP: 89703-720. Concórdia, SC, Brasil. Fone: 55 49 3441.4872.

Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: luisa.fava@ifc.edu.br.

^{II} Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Medicina Veterinária, Departamento de Medicina Preventiva. Av. Bento Gonçalves, 9090, CEP: 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil. Fone: 55 51 3308. 7858.

RESUMO

A enzima Fosfatase Alcalina é utilizada para rápida validação do processo de pasteurização do leite, baseando-se nas suas características de inativação térmica. Os níveis da enzima no leite variam consideravelmente entre as espécies, além de variar de acordo com o teor de gordura, estação do ano, período de lactação, idade e estado de saúde do animal. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade da fosfatase alcalina no leite ovino submetido a tratamento térmico, através de espectrofotometria UV VIS (578 nm), a partir do kit de reagentes para fosfatase alcalina (K 019/Bioclin®), empregando fórmula específica. Para avaliar a atividade da enzima no leite foi utilizada uma amostra de leite cru, aquecendo posteriormente a 63 - 65°C em intervalos específicos até alcançar 30 minutos, totalizando 18 alíquotas. Para análise dos dados foi realizada estatística descritiva e foi estimado o coeficiente de correlação de Pearson para avaliar a relação entre o tempo empregado no processo e a atividade da enzima. O valor médio de atividade da enzima no leite cru foi de 822,619 U/L e após 30 minutos sob temperatura de 63 – 65°C a atividade caiu para 330,238 U/L. O tempo empregado no processo e a atividade da enzima apresentaram correlação negativa moderada. Tendo em vista a pouca correlação, afirma-se que o teste empregado no presente estudo pode não ser aplicável a espécie ovina, devido à elevada atividade da enzima após o tratamento térmico utilizado e ao elevado teor de gordura do leite ovino. São

necessários mais estudos a fim de avaliar o limite específico para o leite de cada espécie.

Palavras-chave: Fosfatase alcalina, leite ovino, tratamento térmico, espectrofotometria.

ABSTRACT

Alkaline phosphatase is an enzyme used for rapid validation of milk pasteurization process, based on its thermal inactivation characteristics. The levels of the enzyme in milk vary considerably among species, as well as according to the fat content, season, lactation period, age and health status of the animal. The objective of the present study was to evaluate the activity of alkaline phosphatase in sheep milk submitted to thermal treatment using UV VIS spectrophotometry (578 nm) from the reagent kit for alkaline phosphatase (K 019 / Bioclin ®) using a specific formula. To evaluate the activity of the enzyme in milk, one sample of raw milk was heated at 63-65 °C up to 30 minutes in specific time intervals, totaling 18 aliquots. For data analysis, descriptive statistics were performed and the Pearson correlation coefficient was estimated to evaluate the relationship between the time spent in the process and the activity of the enzyme. The average activity of the enzyme in raw milk was 822.619 U/L. After 30 minutes at temperature of 63-65°C the activity fell to 330,238 U/L. The time spent in the process and enzyme activity showed moderate negative correlation. In view of the low correlation, it is stated that the test used in the present study may not be applicable to sheep because of the high activity of the enzyme after the heat treatment used and the high fat content of the sheep milk. Further studies are needed to evaluate the specific limit for the milk of each species.

Key words: Alkaline phosphatase, sheep milk, heat treatment, spectrophotometry.

INTRODUÇÃO

O leite *in natura* deve ser tratado termicamente para garantir a segurança microbiológica, através da eliminação de microrganismos patogênicos não formadores de esporos, além de aumentar sua vida de prateleira, devido à redução de microrganismos deteriorantes (LUDIKHUYZE et al, 2000; RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2007), com alterações físico-químicas e organolépticas mínimas no produto (RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2007).

A enzima Fosfatase Alcalina endógena do leite é utilizada em muitos países para rápida validação do processo de pasteurização, baseando-se nas suas características de

inativação térmica (WALSTRA et al., 2006; RANKIN et al., 2010). As condições atuais de tempo e temperatura empregadas no processo de pasteurização do leite levam em consideração a termorresistência da *Coxiella burnetii* e do *Mycobacterium tuberculosis*, microrganismos patogênicos não esporulados mais resistentes ao calor encontrados no leite cru (HOLSINGER et al., 1997; LUDI KHUYZE et al., 2000; LEITE et al., 2006; WALSTRA et al., 2006; RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2007). Sendo a fosfatase alcalina ligeiramente mais resistente ao calor do que esses microrganismos, sua inativação após a pasteurização indica que o processo foi empregado de forma correta, tornando o leite seguro para o consumo humano (SHAMSI et al., 2008).

A maior parte da enzima encontra-se na membrana dos glóbulos de gordura, sendo que em torno de 50% da enzima é encontrada no creme e o restante disperso na fração de leite desnatado, provavelmente associado a lipoproteínas (PAINTER & BRADLEY, 1997). Sendo assim, os níveis de fosfatase alcalina são dependentes do teor de gordura do leite (PAINTER & BRADLEY, 1997; MOATSOU, 2010), mas também variam com outros parâmetros, como a espécie, estação do ano, período de lactação, idade e estado de saúde do animal (PAINTER & BRADLEY, 1997; LORENZEN et al., 2010).

Há variações consideráveis na atividade da enzima entre as diferentes espécies produtoras de leite (RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2007). O leite ovino cru possui maiores níveis de fosfatase alcalina, quando comparado ao leite bovino e caprino, sendo o último o que possui os menores níveis (ANIFANTAKIS & ROSAKIS, 1983). Contudo, apesar dessa diferença, já foi descrito que a inativação da enzima é mais rápida no leite de ovelha (ASSIS et al., 2000; VAMVAKAKI et al., 2006).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade da fosfatase alcalina no leite ovino submetido a tratamento térmico através de espectrofotometria, utilizando kit de reagentes para teste colorimétrico.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada uma coleta de leite, diretamente do tanque de resfriamento por expansão direta em uma propriedade situada em Chapecó/SC, possuindo, em média, 200 fêmeas em lactação da raça Lacaune.

A atividade da fosfatase alcalina foi determinada por espectrofotometria, a partir do kit de reagentes para fosfatase alcalina (K 019/Bioclin®). Para avaliar a atividade da enzima no leite foi utilizada uma amostra de leite cru, aquecendo posteriormente a 63 –

65°C. Ao atingir a temperatura, foram colhidas alíquotas de leite aos 10, 20 e 30 segundos, depois a cada 30 segundos até alcançar 2,5 minutos e subsequentemente intervalos de 2,5 minutos até alcançar 30 minutos, totalizando 18 alíquotas. As alíquotas foram resfriadas rapidamente em banho de gelo a fim de impedir a continuação da inativação a enzima após o tempo definido. A quantificação da enzima foi realizada em espectrofotômetro UV VIS, determinando a absorvância das amostras em 578 nm, conforme protocolo recomendado no kit de reagentes. As leituras foram feitas em triplicata. Os resultados foram expressos em U/L, de acordo com a fórmula a seguir:

$$\text{Fosfatase alcalina (U/L)} = \frac{\text{Absorbância da amostra} \times 40}{\text{Absorbância padrão}}$$

Para análise dos dados foi realizada estatística descritiva e calculado o coeficiente de correlação de Pearson para avaliar a relação entre o tempo empregado no processo e a atividade da enzima, considerando o nível de significância de 5%. É considerada correlação positiva forte valores entre 0,7 a 1, moderada de 0,3 a 0,7 e fraca 0 a 0,3; e correlação negativa forte valores entre -0,7 a -1, moderada -0,3 a -0,7 e fraca 0 a -0,3 (BARBETTA, 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O valor médio de atividade da enzima no leite cru foi de 822,619 U/L e após 30 minutos sob temperatura de 63 – 65°C a atividade caiu para 330,238 U/L. Segundo VAMVAKAKI et al. (2006) a redução percentual da atividade da enzima é grande em ovinos e no presente estudo, com apenas dez segundos de aquecimento houve redução de 49,26% da atividade, alcançando o valor médio de 405,238 U/L. Os valores médios da quantidade da enzima no leite ovino cru variam de 722 a 2.691 U/L (VAMVAKAKI et al., 2006; LORENZEN et al., 2010) e há variações consideráveis na atividade no leite cru das diferentes espécies, incluindo a bovina, caprina e ovina. Além disso, dentro da mesma espécie, há variações entre diferentes raças e individuais, dependendo do estado de saúde dos animais e do estágio de lactação em que eles se encontram (LORENZEN et al., 2010). A atividade da enzima é maior no leite mastítico e possui correlação negativa com a produção diária de leite (ANIFANTAKIS & ROSAKIS, 1983). Em estudo realizado por VAMVAKAKI et al. (2006), amostras de leite submetidas a 59°C por 5, 10, 20, 40 e 80 minutos obtiveram redução da enzima de 78,5%, 17,6%, 7,4%, 3,1%, 0,7% e 0,3%, respectivamente.

Os Estados Unidos e a União Europeia estabelecem 0,350 U/L como limite máximo da atividade da fosfatase alcalina residual no leite bovino após aplicação de tratamento térmico adequado, o que torna o produto seguro para o consumo (LORENZEN et al., 2010). Contudo, no presente estudo, apesar de haver um rápido declínio até os dez minutos de aquecimento, observou-se posteriormente uma elevação na quantidade de enzima presente na amostra, com queda subsequente, porém sem alcançar o valor exigido (figura 1). Após 30 minutos de aquecimento sob temperatura de 63 – 65°C, o que corresponde à pasteurização lenta (BRASIL, 2017), a amostra apresentou atividade de 330,238 U/L. Em estudo realizado por LORENZEN et al. (2010), a atividade da enzima no leite cru ovino foi de 1.702 ± 24 U/L e após aplicação do mesmo binômio tempo – temperatura do presente estudo a amostra apresentou $0,593 \pm 0,01$ U/L. Mesmo não alcançando os valores exigidos pela legislação de leite bovino, o valor foi bem inferior quando comparado ao presente estudo.

A fosfatase alcalina demonstra ser mais estável termicamente em espécies não bovinas, podendo não ser inativada ao término da pasteurização (LORENZEN et al., 2010). Segundo MOATSOU (2010) a atividade da enzima apresenta correlação positiva com o conteúdo de gordura, o que explica a elevada quantidade encontrada no leite ovino, sendo superior ao leite bovino e alcançando valores 10 vezes superiores que no leite caprino (RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2007). O teste enzimático utilizado para avaliação da atividade da enzima pode ter sofrido interferência do elevado teor de gordura característico da raça utilizada no presente estudo (LARROSA & KREMER, 1991; FAVA et al., 2014). Entretanto, o desnate do leite para avaliação da atividade da enzima afetaria a eficácia de detecção, pois o teste é menos sensível quando aplicado ao leite desnatado (WALSTRA et al., 2006).

O tempo empregado no processo e a atividade da enzima apresentaram correlação negativa moderada ($r = - 0,3$). Há maior redução percentual da atividade da enzima no leite ovino, porém a quantidade presente no leite após a finalização do processo térmico é maior nessa espécie, quando comparada às espécies bovina e caprina (VAMVAKAKI et al., 2006). Além disso, há diferenças na inativação da enzima de acordo com o método de tratamento térmico empregado e o tipo de leite. Segundo LORENZEN et al. (2010), tanto a pasteurização lenta como a rápida reduzem a atividade da enzima em 99,99% no leite ovino, contudo nas espécies bovina e caprina há variações. No leite de cabra a redução percentual da enzima é maior na pasteurização lenta e no leite bovino, na pasteurização rápida.

CONCLUSÃO

Após a aplicação do binômio tempo e temperatura empregado na pasteurização lenta do leite, não houve a mesma redução da atividade da enzima fosfatase alcalina estabelecida para leite bovino. Como sua detecção pode sofrer influência do teor de gordura, o teste empregado no presente estudo pode não ser aplicável à espécie ovina. Além disso, a enzima é mais estável termicamente em espécies não bovinas, sendo necessários mais estudos a fim de avaliar o limite específico para o leite de cada espécie. Já que no Brasil são utilizados somente testes qualitativos para detecção da enzima, seu emprego deve ser avaliado no leite ovino.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Cabanha Chapecó (Santa Catarina – Brasil), seus técnicos e membros, por permitirem a realização do presente estudo.

REFERÊNCIAS

ANIFANTAKIS, E.M., ROSAKIS, P.S. Alkaline phosphatase activity of sheep's milk and some factors affecting it. *Egypt. J. Dairy Sci.* 11, 173–182, 1983.

ASSIS, G., DE BIVAR ROSEIRO, M.L., BARBOSA, M. Determination of alkaline phosphatase activity in milk from indigenous Portuguese ewe and goat breeds by the fluorometric method. *FIL-IDF Bull.* 351, 33, 2000.

BARBETTA, P.A. *Estatística aplicada às ciências sociais*. 7 ed. Florianópolis: Editora UFSC, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. *Diário Oficial da União*, 2017.

FAVA, L.W., KÜLKAMP-GUERREIRO, I.C., PINTO, A.T. Evaluation of physico chemical characteristics of fresh, refrigerated and frozen Lacaune ewes' milk. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, n.6, p.1924-1930, 2014.

HOLSINGER, V.H., RAJKOWSKI, K.T., STABEL, J.R. Milk pasteurisation and safety: a brief history and update. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 1997,16 (2), 441-451, 1997.

LARROSA, J.R.; KREMER, R. Leche ovina y caprina – Una nueva alternativa agroindustrial. Montevideo: Editorial Hemisferio Sur, 172 p, 1990.

LEITE, Z.T.C., VAITSMAN, D.S., DUTRA, P.B. Leite e alguns de seus derivados – da antiguidade à atualidade. *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 4, 876-880, 2006.

LORENZEN, P, CHR., MARTIN, D., CLAWIN-RÄDECKER, I., BARTH, K., KNAPPSTEIN, K. Activities of alkaline phosphatase, α -glutamyltransferase and lactoperoxidase in cow, sheep and goat's milk in relation to heat treatment. *Small Ruminant Research*, 89, 18–23, 2010.

LUDI KHUYZE, L., CLAEYS, W., HENDRICKX, M. Combined Pressure temperature Inactivation of Alkaline Phosphatase in Bovine Milk: A Kinetic Study. *Journal Of Food Science.*, Vol. 65, No. 1, 155 – 160, 2000.

MOATSOU, G. Indigenous enzymatic activities in ovine and caprine milks. *International Journal of Dairy Technology*, Vol. 63, N. 1, 16 – 31, 2010.

PAINTER, C.J., BRADLEY JR. Residual alkaline phosphatase activity in milks subjected to various time/temperature treatments. *J. Food Prot.* 60, 525–530, 1997.

RANKIN, S.A., CHRISTIANSEN, A., LEE, W., BANAVARA, D.S., LOPEZ-HERNANDEZ, A. Invited review: The application of alkaline phosphatase assays for the validation of milk product pasteurization. *Journal of Dairy Science* Vol. 93 No. 12, 5538 – 5551, 2010.

RAYNAL-LJUTOVAC, K., PARK, Y.W., GAUCHERON, F., BOUHALLAB, S. Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68, 207–220, 2007.

SHAMSI, K., VERSTEEG, C., SHERKAT, F., WAN, J. Alkaline phosphatase and microbial inactivation by pulsed electric field in bovine milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 217–223, 2008.

VAMVAKAKI, A.N., ZOIDOU, E., MOATSOU, G., BOKARI, M., ANIFANTAKIS, E. Residual alkaline phosphatase activity after heat treatment of ovine and caprine milk. *Small Ruminant Research*, 65, 237–241, 2006.

WALSTRA, P., WOUTERS, J.T.M., GEURTS, T.J. *Dairy science and technology*. 2 ed. Taylor & Francis. 763 p, 2006.

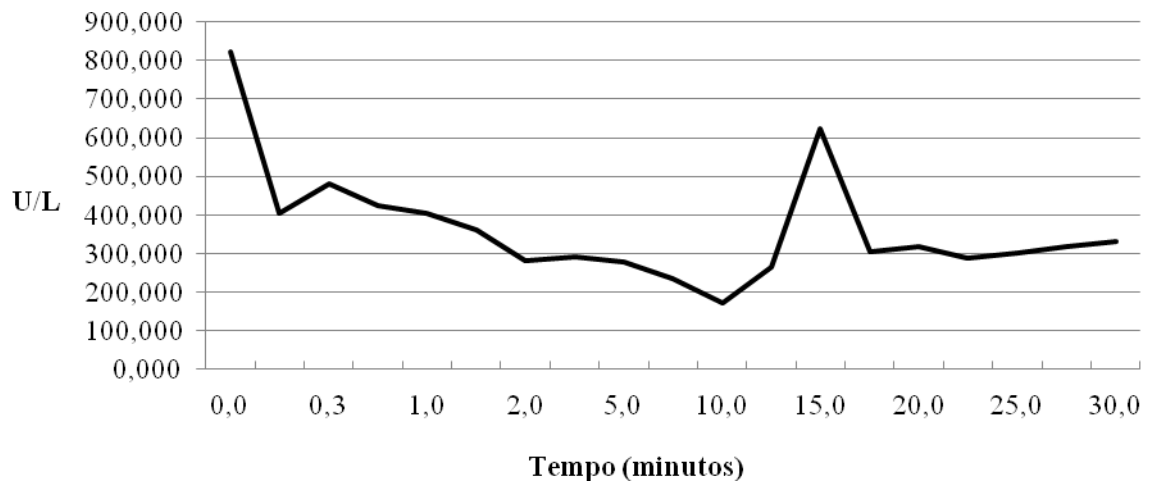


Figura 1: Curva de diminuição da atividade da enzima Fosfatase alcalina (U/L) em leite ovino processado por pasteurização (63-65°C por 30 minutos).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No decorrer de cinco meses de lactação de 15 fêmeas da raça Lacaune não foi observada variação no volume total de leite produzido nas fases crescente (8 a 41 dias de lactação); de pico de lactação (42 a 56 dias); período de queda de produção (57 a 120 dias) e de lactação persistente (acima de 121 dias). O manejo nutricional dos animais pode ter influenciado na diminuição do teor de gordura observada no período de estudo. A CCS média do leite foi de 5,42 \log_{10} células.mL⁻¹, não havendo diferença significativa entre as diferentes fases, podendo indicar boa saúde do úbere dos animais devido à baixa contagem. A realização de CCS microscópica e isolamento bacteriano de amostras de leite individuais, por teto, desses animais demonstrou crescimento de *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) em 29,44% das amostras, porém as contagens de células somáticas foram baixas em ambos os casos – com e sem isolamento bacteriano – não havendo diferença significativa entre eles. Mesmo que esses sejam os microrganismos mais comumente isolados em mastite subclínica de ovinos, no presente estudo sua presença não esteve relacionada com CCS elevada.

A pesquisa da enzima fosfatase alcalina no leite faz-se importante para verificação do emprego adequado do binômio tempo e temperatura do processo de pasteurização. Contudo, no presente estudo, não foi observada a redução da atividade da enzima estabelecida para leite bovino. Não é utilizada no Brasil técnica quantitativa para detecção da atividade da enzima, porém a utilização de kits qualitativos deve ser avaliada no leite ovino, devido às diferenças de composição entre os leites das diferentes espécies leiteiras. A técnica utilizada no presente estudo pode não ser aplicada ao leite ovino, sendo necessários mais estudos para avaliar sua aplicabilidade.

A legislação brasileira não permite a utilização de colostro para fins alimentícios. Entretanto, seu uso como alimento, suplemento nutricional ou imunológico é permitido em outros países. A silagem de colostro ovino demonstrou viabilidade tecnológica para produção de manteiga, resultando em um produto sem rancificação, porém com baixo rendimento, devido à utilização de batedeira doméstica. O emprego de equipamentos industriais na fabricação melhoraria a eficiência na concentração da gordura e expulsão do soro, resultando em aumento no rendimento. A aceitabilidade por parte dos consumidores deve ser avaliada através de análise sensorial.

Mais estudos devem ser realizados para caracterizar o leite ovino, pois a ovinocultura leiteira está crescendo no país e não há legislação específica para o leite

dessa espécie. Raças especializadas estão cada vez mais sendo utilizadas para a produção de leite a nível industrial, sendo assim o leite deve ser julgado segundo suas especificidades, com foco na qualidade e inocuidade dos alimentos. Além disso, produtos derivados de leite ovino agregam valor à produção e despertam a atenção de consumidores em busca de produtos saudáveis e diversificados no mercado.

REFERÊNCIAS

ALAIS, C. Ciencia de la leche - Principios de técnica lechera. 4. ed. Barcelona: Editorial Reverté, S.A., 1985. 873 p.

ANDERSON, D. E.; HULL, B. L.; PUGH, D. G. Enfermidades da glândula mamária. In: PUGH, D. G. Clínica de ovinos e caprinos. São Paulo: Roca, 2005, 513 p.

ASSENAT, L. Leche de oveja. In: LUQUET, F.M. Leche y productos lacteos: vaca – oveja – cabra. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A., 1991. v. 1, Parte II, p. 275 – 339.

ANTONIO, J.; SANDERS, M.S.; VAN GAMMAREN, D. The effects of bovine colostrum supplementation on body composition and exercise performance in active men and women. *Nutrition*, 17, 243–7, 2001

BANCHERO, G.E. et al. Colostrum production in ewes: a review of regulation mechanisms and of energy supply. *Animal*, 2015, vol. 9:5, p. 831 – 837.

BARBOSA, D.A. et al. Contagem automática e microscópica direta de células somáticas do leite de ovelhas Santa Inês, utilizando como corantes o broadhurst-palley e a hematoxilina-eosina. *Ciência Animal* 22(3): 17-23, 2012.

BEHMER, M.L.A. Tecnologia do leite. 10. ed. São Paulo: Nobel, 1980. 322 p.

BENCINI, R., PULINA, G. The quality of sheep milk: a Review. *Wool Technology and Sheep Breeding*, v.45, p.182-220, 1997.

BERGONIER, D. et al. Frequence des differents germes responsables de mammites cliniques et subcliniques chez les petits ruminants laitiers. In: Barillet, F., Zervas, N.P. (Eds.), *Proceedings of the Sixth International Symposium on the Milking of Small Ruminants. Milking and Milk Production of Dairy Sheep and Goats*, Athens, Greece. 1999, Wageningen Pers, Netherlands, pp. 130 – 136.

BERGONIER, D., BERTHELOT, X. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. *Livestock Production Science* 79, 1–16, 2003.

BERGONIER, D. et al. Mastitis of dairy small ruminants. *Veterinary Research*. v.34, p. 689–716. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. *Diário Oficial da União*, 14 de dez. 2006, seção I.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto Nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. *Diário Oficial da União*, 29 mar. 2017.

BRITO, M.A. et al. Composição do sangue e do leite em ovinos leiteiros do sul do Brasil: variações na gestação e na lactação. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 942 – 948, 2006.

BRINKWORTH, G.D. et al. Oral bovine colostrum supplementation enhances buffer capacity but not rowing performance in elite female rowers. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 12, 349–63, 2002.

BUCKLEY, J.D. et al. Bovine colostrum supplementation during endurance running training improves recovery, but not performance. *J Sci Med Sport*, 5, 65–79, 2002.

CASTRO, N. et al. Management effects on colostrogenesis in small ruminants: a review. *Journal of Applied Animal Research*, 2011, vol. 39, p. 85 – 93.

COBUCCI, J.A. et al. Persistência na lactação: uma revisão. *Archivos Latino Americanos de Produccion Animal*, Santa Maria, v. 11, p. 163 – 173. 2003.

CONTRERAS, A. et al. Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research*, 68, 145–153, 2007.

COOMBES, J. et al. Dose effects of oral bovine colostrum supplementation on physical work capacity in cyclists. *Med Sci Sports Exerc*, 34, 1184–8, 2002.

CUNHA, A.P. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, v.73, n.1, p.17-21, 2006.

DELLA LIBERA, A.M.M.P. et al. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from meat-producing ewes with mastitis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2010, v.62, n.6, p.1499-1502.

DUKES, H.H.; SWENSON, H.J. *Fisiologia dos animais domésticos*. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1996, 856p.

FAO. Food and Agriculture Organization, http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-production/dairy-animals/en/#.WPN_hbkxBdw. Acesso em 16 abr. 2017. Dados gerais (1)

FAO. Food and Agriculture Organization. http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Dairy/Documents/FO_Oct_16_DAIRY.pdf Acesso em 16 abr. 2017. Dados Brasil (2)

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QL/E>. Acesso em: 01 dez. 2016.

FAVA, L.W., KÜLKAMP-GUERREIRO, I.C., PINTO, A.T. Evaluation of physico chemical characteristics of fresh, refrigerated and frozen Lacaune ewes' milk. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, n.6, p.1924-1930, 2014.

FOX, P.F. Cheese – Overview. In: FUQUAY, J.W.; FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. *Encyclopedia of dairy sciences*. 2. ed. Elsevier, 2011. v. 1, p. 534 – 543.

FOX, P.F. *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*. 2 ed. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1999. 580 p.

FUERTES, J.A. et al. Parameters of Test Day Milk Yield and Milk Components for Dairy Ewes. *Journal of Dairy Science* Vol. 81, No. 5, 1998.

GRECA, S.P. Produção e composição do leite ovino de diferentes grupos genéticos. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013. 53 p.

GOMES, V. et al. Contagem automática e microscópica direta das células somáticas do leite de ovelhas da raça Lacaune, utilizando como corantes o Rosenfeld e verde de metil pironona-Y. *Ciência Animal Brasileira*, v.11, p.162-167, 2010.

HADJIPANAYIOTOU, M. Composition of ewe, goat and cow milk and of colostrum and goats. *Small Ruminant Research*, 18, 255-262, 1995.

HARTAMAN, M. et al. Efeito da mastite sobre a contagem de células somáticas (CCS) em ovelhas da raça Bergamácia. *Vet. e Zootec.*, p 213 – 220, v.16, n.1, 2009.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2014. http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2014_v42_br.pdf. Acesso em 16 abr. 2017.

KATISIARI, M.C. et al. Manufacture of yoghurt from stored frozen sheep's milk. *Food Chemistry*, 2002, vol. 77, p. 413–420.

KUIPERS, H. et al. Effects of oral bovine colostrum supplementation on serum insulin-like growth factor-I levels. *Nutrition*, 18, 566–7, 2002.

LAFI, S.Q. Use of somatic cell counts and California Mastitis Test results from udder halves milk samples to detect subclinical intramammary infection in Awassi sheep. *Small Ruminant Research* 62, 83–86, 2006.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; BALDINI, S. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, v. 13, n. 1, p. 51-54, 2006.

LARROSA, J.R.; KREMER, R. Leche ovina y caprina – Una nueva alternativa agroindustrial. Montevideo: Editorial Hemisferio Sur, 1990. 172 p.

LÉRIAS, J.R. et al. The mammary gland in small ruminants: major morphological and functional events underlying milk production – a review. *Journal of Dairy Research*, 2014, vol. 81, p. 304–318.

MARNILA, P; KORHONEN, H. Colostrum. In: FUQUAY, J.W.; FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. *Encyclopedia of dairy sciences*. 2. ed. Elsevier, 2011. Vol.3, p. 591 – 597.

MAHIEU, H. Factores que influyen na la composición de la leche. In: LUQUET, F.M. *Leche y productos lacteos: vaca – oveja – cabra*. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A., 1991. v. 1, Parte I, Cap. 3 p. 117 – 179.

MARIA-LEVRINO, G., GABINA, D. Environmental effects on milk production of milking sheep. *J. Dairy Sci.* 73 (Suppl. 1), 1251, 1990.

MCDOUGALL, S. et al. 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, p.245-254, 2001.

MERO, A. et al. Effects of bovine colostrum supplementation on serum IGF-1, IgG, hormone and saliva IgA during training. *J Appl Physiol*, 83, 1144–51, 1997.

ORDEN, J.A. et al. Detection of enterotoxins and TSST-1 secreted by *Staphylococcus aureus* isolated from ruminant mastitis. Comparison of ELISA and immunoblot. *Journal of Applied Bacteriology*, 1992, vol. 72,p. 486-489.

ORDÓÑES, J.A. Características gerais do leite e componentes fundamentais. In: _____. *Tecnologia de Alimentos – Alimentos de Origem Animal*. Porto Alegre: Artmed, 2005. v. 2, cap. 1, p. 13 – 37.

PAAPE, M.J. et al. Milk somatic cells and lactation in small ruminants. *Journal of Dairy Science*, v. 84, E. suppl., 2001.

PAAPE, M.J. et al. Monitoring goat and sheep milk somatic cell count. *Small Ruminant Research*, v.68, p. 114-125. 2007.

PANDYA, A.J.; GHODKE, K.M. Goat and sheep milk products other than cheeses and yoghurt. *Small Ruminant Research*, 2007, vo. 68, p. 193–206.

PAVIĆ, V. et al. Influence of stage of lactation on the chemical composition and physical properties of sheep milk. *Czech J. Anim. Sci.*, 47, 2002 (2): 80–84.

PENGOV, A. The Role of Coagulase Negative Staphylococcus spp. and Associated Somatic Cell Counts in the Ovine Mammary Gland. *Journal of Dairy Science*, Volume 84, Issue 3, Pages 572–574, 2001.

PULINA, G. et al. Non-nutritional factors affecting lactation persistency in dairy ewes: a review. *Italian Journal of Animal Science*, 2007, Vol. 6, p. 115 – 141.

PYÖRALÄ, S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Veterinary Research*, v.34, p.565-578, 2003.

RADOSTITS, O.M. et al. *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats*. 10.ed. Philadelphia: Saunders, 2007. p.673-762.

RAMOS, M.; JUAREZ, M. Sheep Milk. In: FUQUAY, J.W.; FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. *Encyclopedia of dairy sciences*. 2. ed. Elsevier, 2011. v. 3, p. 494 – 502.

RAYNAL-LJUTOVAC, K. et al. Somatic cells of goat and sheep milk: analytical, sanitary, productive and technological aspects. *Small Ruminant Research*, v.68, p. 126-144. 2007.

RIBEIRO, L.A.O. Medicina de ovinos. Porto Alegre: Pacartes, 2011. 198 p.

SAALFELD, M.H. et al. Coloostro: A redescoberta de um alimento saudável, nutritivo e com potencial probiótico. *Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável*, v. 5, n. 2, p. 18-24, 2012.

SAALFELD, M.H. et al. Anaerobically fermented colostrum: an alternative for feeding calves. *Ciência Rural*, v.43, n.9, p.1636-1641, 2013.

SEIXAS, F.N. et al. Comparação de métodos para detecção de fosfatase alcalina e peroxidase em leite. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora*, v. 69, n. 1, p 17-24, 2014.

SEVI, A. et al. Effects of lambing season and stage of lactation on ewe milk quality. *Small Ruminant Research* 51, 251–259, 2004.

SOUZA, F.N. et al. Somatic cell count in small ruminants: Friend or foe? *Small Ruminant Research* 107, 65– 75, 2012.

URUAKPA, F.O.; Ismond, M.A.H.; Akobundu, E.N.T., 2002. Colostrum and its benefits: a review. *Nutrition Research*, 22, 755–767.

VASIL, M. Aetiology of mastites and enterotoxin production by *Staphylococcus* sp. isolated from milk of two sheep herds. *Slovak Journal Animal Science*, 2007, vol. 40 (4), p.: 189 – 19.