

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS**

**EFEITO DA SAZONALIDADE E DO NÍVEL  
TECNOLÓGICO DE UNIDADES PRODUTORAS NA  
QUALIDADE E POTENCIALIDADE NUTRACÊUTICA  
DO LEITE BOVINO**

**TESE DE DOUTORADO**

**Diego Prado de Vargas**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2015**

**EFEITO DA SAZONALIDADE E DO NÍVEL  
TECNOLÓGICO DE UNIDADES PRODUTORAS NA  
QUALIDADE E POTENCIALIDADE NUTRACÊUTICA  
DO LEITE BOVINO**

**Diego Prado de Vargas**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de concentração Qualidade de  
Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como  
requisito parcial para obtenção do Grau de  
**Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

**Orientador Prof. Dr. José Laerte Nörnberg**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2015**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Prado de Vargas, Diego

Efeito da sazonalidade e do nível tecnológico de unidades produtoras na qualidade e potencialidade nutracêutica do leite bovino / Diego Prado de Vargas.- 2015.

129 p.; 30cm

Orientador: José Laerte Nörnberg

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2015

1. Ácido linoleico conjugado (CLA) 2. Agrotóxicos 3. Alimentos funcionais 4. Perfil de ácidos graxos 5. Qualidade do leite I. Nörnberg, José Laerte II. Título.

---

©2015

Todos os direitos autorais reservados a Diego Prado de Vargas. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Rua 5, Parque Alto da Colina, n.73, Bairro Camobi, Santa Maria, RS. CEP: 97110-775

E-mail: diegodevargas@hotmail.com

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado**

**EFEITO DA SAZONALIDADE E DO NÍVEL  
TECNOLÓGICO DE UNIDADES PRODUTORAS NA  
QUALIDADE E POTENCIALIDADE NUTRACÊUTICA  
DO LEITE BOVINO**

elaborada por:  
**Diego Prado de Vargas**

como requisito parcial para obtenção do Grau de  
**Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**José Laerte Nörnberg, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

---

**Gilmar Roberto Meinerz, Dr. (UFFS)**

---

**Jorge Schafhäuser Júnior, Dr. (EMBRAPA)**

---

**Lucas Carvalho Siqueira, Dr. (UNICRUZ)**

---

**Roger Wagner, Dr. (UFSM)**

**Santa Maria, 16 de dezembro de 2015.**

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Fapergs), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio e auxílio financeiro prestados.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos (PPGCTA) pela oportunidade.

À Indústria de laticínios pesquisada, por toda a receptividade encontrada, desde o início do projeto, pelas informações cedidas e ao suporte técnico prestado, tornando possível a realização deste trabalho.

Aos meus pais Manoel e Ilca Jussara, os mais profundos agradecimentos, por suas sábias lições, pelo amor e alegria compartilhados, ensinando-me a importância da persistência na realização dos sonhos.

À minha querida irmã Luciane, pelo exemplo de determinação e disciplina. É sempre bom ter alguém em quem se espelhar.

À minha noiva Vanessa, por ser a minha maior incentivadora, pela compreensão, pelo conforto nos momentos mais difíceis e pelo amor incondicional e carinho de sempre.

Aos meus amigos caninos, Ícaro, Robinho, Douglas e Anestésica, meus sinceros agradecimentos podem-se resumir em uma frase: *"O próprio homem não pode expressar o amor e humildade por sinais externos, tão claramente como um cachorro, quando ele encontra seu amado mestre."* Charles Darwin.

Agradecimento especial ao meu orientador Prof. Dr. José Laerte Nörnberg, antes de qualquer coisa, pela paciência que teve comigo nestes anos de parceria na pesquisa, pela forma de orientar, pelos ensinamentos, pela disponibilidade em ajudar, por suas sugestões sempre pertinentes, pelos comentários de incentivo e, principalmente por ser uma referência profissional e de competência, um exemplo que vou seguir durante minha vida pessoal e profissional. Laerte, muito obrigado por ser um exemplo de que é possível ser um amigo orientador.

Aos amigos Prof. Dr. Renius de Oliveira Mello e Prof. Dr. Roger Wagner, pela parceria na pesquisa, apoio e inspiração no amadurecimento dos meus conhecimentos e conceitos que me levaram à execução e conclusão desta tese, além de serem exemplos que quero seguir, de profissionais dedicados e determinados.

À família NIDAL, incluindo mestrandos, doutorandos, estagiários, funcionários e professores, foi muito bom ter trabalhado com todos vocês, obrigado pelo aprendizado e pela agradável convivência durante tantos anos, o incentivo e ajuda de vocês foi imprescindível para a conclusão deste trabalho.

Em especial, meus sinceros agradecimentos aos amigos Luciano Antônio Ritt, Rudolf Brand Scheibler, Fábio Antunes Rizzo e Jorge Shafhäuser Júnior pela amizade cultivada, grande parceria formada na pesquisa e pelos tantos anos que virão.

A todos meus amigos e amigas, em especial à “Patota”, pela verdadeira amizade e parceria cultivada desde o início da faculdade de Medicina Veterinária.

Muito obrigado!

*“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.*  
*(Leonardo da Vinci).*

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos  
Universidade Federal de Santa Maria

### **EFEITO DA SAZONALIDADE E DO NÍVEL TECNOLÓGICO DE UNIDADES PRODUTORAS NA QUALIDADE E POTENCIALIDADE NUTRACÊUTICA DO LEITE BOVINO**

Autor: Diego Prado de Vargas  
Orientador: Prof. Dr. José Laerte Nörnberg

Foi avaliada a influência de níveis tecnológicos de sistemas de produção e estações do ano na qualidade microbiológica (contagem de células somáticas e contagem bacteriana total) e química do leite (gordura, proteína, potencialidade nutracêutica em relação ao perfil de ácidos graxos e agrotóxicos), além de avaliar a eficiência dos tratamentos térmicos industriais (pasteurização e ultrapasteurização) na degradação ou eliminação dos agroquímicos presentes no leite cru refrigerado. Através de técnicas estatísticas multivariadas, reduziu-se a dimensionalidade de 1.541 unidades produtoras de leite (UPL) referentes a 15 municípios do Rio Grande do Sul, Brasil, a 15 grupos homogêneos, sendo avaliadas três UPL por quadrante do plano cartesiano, nas distintas estações climáticas, as quais foram caracterizadas em quatro níveis de especialização: altamente especializado, especializado, semiespecializado e não especializado. Posteriormente foram coletadas amostras de leite de cada propriedade, para análise da qualidade microbiológica e química do leite, incluindo o perfil de ácidos graxos e índices de avaliação da fração lipídica, destacando-se o índice proposto pelo estudo, denominado índice nutracêutico (IN); e ainda, à inocuidade do leite em relação a 93 resíduos de agrotóxicos e a eficácia de degradação ou eliminação destes praguicidas frente aos tratamentos térmicos industriais. Através dos resultados deste estudo, observa-se que os sistemas de produção e as estações do ano interferem de forma conjunta no perfil de ácidos graxos, e de forma isolada na qualidade química e microbiológica do leite. As maiores contagens de células somáticas e os menores conteúdos de proteína foram observados no verão, e o grau de especialização das unidades produtivas esteve indiretamente relacionado com a contagem bacteriana total no leite. No inverno, sistemas não especializados produziram leite com melhor IN, com os maiores teores de ácidos graxos poli-insaturados, ácido rumênico (CLA, 18:2n7 - c9, t11) e ácido t10,c12-octadecadienoico (CLA, 18:2n6 – t10, c12). Em adição, com a elevação dos níveis de especialização das UPL e principalmente na primavera, verão e outono aumentaram-se os valores de resíduos de agroquímicos no leite. No entanto, os tratamentos térmicos industriais mostraram-se eficientes para degradar ou eliminar os agrotóxicos presentes no leite cru refrigerado, evidenciando-se a importância destes distintos binômios de tempo e temperatura para a inocuidade do leite consumido.

**Palavras-chave:** ácido linoleico conjugado, agrotóxicos, alimentos funcionais, perfil de ácidos graxos, qualidade do leite



## ABSTRACT

Thesis of Doctor's Degree  
Post-Graduation in Food Science and Technology Program  
Universidade Federal de Santa Maria

### **EFFECT OF SEASONALITY AND TECHNOLOGICAL LEVEL IN QUALITY AND NUTRACEUTICAL POTENTIAL OF MILK COW**

Author: Diego Prado de Vargas  
Adviser: Prof. Dr. José Laerte Nörnberg

The effect of technological levels of production systems and seasons in the microbiological (somatic cell count and total bacterial count) and chemical quality of milk (fat, protein, nutraceutical potentiality in relation to the fatty acids profile and pesticides) was evaluated. Through multivariate statistical techniques, it was reduced dimensionality of 1,541 units producing milk (UPM) for the 15 municipalities in the Rio Grande do Sul, Brazil, 15 homogeneous groups and evaluated three UPL per quadrant of the Cartesian plane, in different seasons, which were characterized in four levels of specialization: highly specialized, specialized, partially specialized, and not specialized. After, milk samples from each farm were collected for analysis of microbiological quality and milk chemistry, including the fatty acid profile and index for evaluating the quality lipid fraction, especially the index proposed by the study, called nutraceutical index (NI); and also, the safety of the milk in respect of 93 pesticide residues and efficacy of degradation or elimination of these pesticides front of industrial heat treatments. The production systems and the seasons jointly interfere in the fatty acids profile, and singly interfere in chemical and microbiological quality of the milk. The lowest somatic cell count and the highest protein content were observed in summer, and the specialization level of production units had inverse relationship with total bacterial count. During winter, not specialized systems produced milk with the best nutraceutical index, with the highest values of polyunsaturated fatty acids, rumenic acid (CLA, 18:2n7 - c9, t11) and t10, c12 – octadecadienoic acid (CLA, 18:2n6 – t10, c12). In addition, with increasing levels of specialization of UPM and especially in the spring, summer and autumn were increased agrochemical residue levels in the milk. However, the industrial heat treatments were effective to degrade or eliminate the pesticides present in refrigerated raw milk, highlighting the importance of these different binomials of time and temperature for the safety of the milk consumed.

**Keywords:** conjugated linoleic acid, pesticides, functional foods, fatty acid profile, milk quality

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**Tabela 1.** Características dos sistemas de produção de leite altamente especializado (AE), especializado (ES), semiespecializado (SE) e não especializado (NE).....44

### MANUSCRITO I

**Tabela 1.** Número de produtores (Nº de produtores) e, médias dos teores de gordura, proteína, lactose, minerais, sólidos não gordurosos (SNG), sólidos totais (ST), contagem bacteriana total (CBT) e contagem de células somáticas (CCS), com seus respectivos coeficientes de variação (CV) e desvios-padrão dos grupos formados na análise de agrupamento.....55

### MANUSCRITO II

**Tabela 1.** Características dos sistemas de produção de leite altamente especializado (AE), especializado (ES), semiespecializado (SE) e não especializado (NE).....62

**Tabela 2.** Caracterização do perfil de ácidos graxos (g por 100 g do total de ácidos graxos), dos principais constituintes da dieta recebida pelos animais, nos sistemas de produção altamente especializado (AE), especializado (ES), semiespecializado (SE) e não especializado (NE).....66

**Tabela 3.** Fator de resposta experimental (FRE), teórico (FRT) e de erro (FE) dos ácidos graxos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) e poli-insaturados (AGPI) analisados em cromatógrafo gasoso Agilent Technologies®, modelo 6890 Plus<sup>+</sup>.....67

**Tabela 4.** Porcentagem do valor experimental (VE), valor teórico (VT) do material certificado BCR® - 163 e da recuperação (R%) dos ácidos graxos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) e poli-insaturados.....68

**Tabela 5.** Média±erro-padrão dos teores de proteína total, gordura, sólidos totais, contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) do leite bovino, nos sistemas de produção altamente especializado (AE), especializado (ES), semiespecializado (SE) e não especializado (NE), nas diferentes estações climáticas.....70

**Tabela 6.** Média±erro-padrão dos teores de ácidos graxos (mg g<sup>-1</sup>) saturados, e somatório dos ácidos graxos saturados (ΣAGS) no leite bovino, nos sistemas de produção altamente especializado (AE), especializado (ES), semi-especializado (SE) e não especializado (NE) nas diferentes estações climática.....71

**Tabela 7.** Média±erro-padrão dos ácidos graxos (mg g<sup>-1</sup>) monoinsaturados, somatório dos ácidos graxos monoinsaturados (ΣAGMI), atividade da enzima delta 9 dessaturase, índice de aterogenicidade, índice de trombogenicidade, razão de ácidos graxos hipocolesterolêmico e hipercolesterolêmico (h/H), ácidos graxos desejáveis e índice nutracêutico do leite bovino, nos sistemas de produção altamente especializado (AE), especializado (ES), semi-especializado (SE) e não especializado (NE), nas diferentes estações climáticas.....72

**Tabela 8.** Média±erro-padrão dos ácidos graxos (mg g<sup>-1</sup>) poli-insaturados, somatório dos ácidos graxos ômega 3 (Σn3), dos ácidos graxos ômega 6 (Σn6), da relação ômega 6 e ômega 3 (Σn6:n3) e do total de ácidos graxos poli-insaturados (ΣAGPI) do leite bovino, nos sistemas produtivos altamente especializado (AE), especializado (ES), semiespecializado (SE) e não especializado (NE), nas distintas estações do ano.....73

## MANUSCRITO III

<b>Tabela 1.</b> Características dos sistemas de produção de leite altamente especializado (AE), especializado (ES), semiespecializado (SE) e não especializado (NE).....	83
<b>Tabela 2.</b> Limites de detecção (LOD <sub>m</sub> ), quantificação (LOQ <sub>m</sub> ) e máximos de resíduos (LMR) dos agrotóxicos organofosforados.....	88
<b>Tabela 3.</b> Limites de detecção (LOD <sub>m</sub> ), quantificação (LOQ <sub>m</sub> ) e máximos de resíduos (LMR) de agrotóxicos organoclorados.....	89
<b>Tabela 4.</b> Limites de detecção (LOD <sub>m</sub> ), quantificação (LOQ <sub>m</sub> ) e máximos de resíduos (LMR) dos agrotóxicos Dinitroanilina, Piretróides, Neonicotinóide e, Carbamatos e derivados.....	90

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1.** Estrutura dos isômeros de ácido linoleico conjugado (CLA) (1 e 2) e ácido linoleico (3): 1) 18:2n6-t10,c12; 2) 18:2n7- c9,t11; e 3) 18:2n6-c9,c12.....28
- Figura 2.** Localização no plano cartesiano, utilizado como critério básico para obtenção dos sistemas de produção altamente especializado, especializado, semiespecializado e não especializado.....44

### MANUSCRITO I

- Figura 1.** Três projeções bidimensionais (CP1xCP2, CP1xCP3 e CP2xCP3) dos “escores” dos diferentes grupos formados na análise de agrupamento e as “cargas” (correlações existentes entre as variáveis e os componentes principais) das variáveis gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST), escore linear de células somáticas (ECS) e o logaritmo natural da contagem bacteriana total (Log CBT).....54

### MANUSCRITO II

- Figura 1.** Projeção bidimensional dos escores das diferentes combinações entre os sistemas de produção – altamente especializado (AE), especializado (ES), semiespecializado (SE) e não especializado (NE) – e as diferentes estações do ano – primavera, PRIM; verão, VER; outono, OUT; e inverno, INV –, além das cargas (correlações entre as variáveis e os componentes principais) das variáveis: ácido vacênico, total de ácidos graxos monoinsaturados ( $\Sigma$ AGMI), poli-insaturados ( $\Sigma$ AGPI), relação dos ácidos graxos ômega 6 e ômega 3 (N6/N3) e os isômeros de ácido linoleico conjugado (CLA), ácido rumênico e ácido t10,c12-octadecadienoico (18:2n6-t10,c12).....76

### MANUSCRITO III

- Figura 1.** Localização da amostragem. As amostras de leite foram obtidas entre as latitudes 29°15'16" e 29°29'13"S; e longitudes 51°31'52" e 51°59'50"W do estado do Rio Grande do Sul, no sul do Brasil.....83
- Figura 2.** Projeção bidimensional dos “escores” das doze unidades produtoras de leite aninhadas nos níveis produtivos altamente especializado (AE), especializado (ES), semiespecializado (SE) e não especializado (NE), e as “cargas” (correlações existentes entre as variáveis e os componentes principais) dos agrotóxicos encontradas no leite de seus tanques de refrigeração.....91
- Figura 3.** Projeção bidimensional dos “escores” das combinações entre as estações do ano primavera (PRIM), verão (VER), outono (OUT) e inverno (INV) com os tratamentos térmicos industriais, pasteurização (PAST) e esterilização comercial (EST) e as “cargas” (correlações existentes entre as variáveis e os componentes principais) dos agrotóxicos encontradas no leite.....94

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C – graus Celsius  
°C min<sup>-1</sup> – graus Celsius por minuto  
µg L<sup>-1</sup> – micrograma por litro  
4:0 – ácido butírico  
6:0 – ácido caproico  
8:0 – ácido caprílico  
10:0 – ácido cáprico  
12:0 – ácido láurico  
14:0 – ácido mirístico  
14:1n5-c9 – ácido miristoleico  
16:0 – ácido palmítico  
16:1n7-c9 – ácido palmitoleico  
18:0 – ácido esteárico  
18:1n5-t12 – ácido trans – 13 octadecenóico  
18:1n6-t12 – ácido trans – 12 octadecenóico  
18:1n7-t11 – ácido trans vacênico  
18:1n9-c9 – ácido oleico  
18:1n9-t9 – ácido elaídico  
18:2n6-c9,c12 – ácido linoleico  
18:2n6-t10,c12 – ácido t10,c12-octadecadienoico  
18:2n7- c9,t11 – ácido rumênico  
18:3n3-c9,c12,c15 – ácido α-linolênico  
18:3n6-c6,c9,c12 – ácido gama-linolênico  
20:0 – ácido araquídico  
20:4n6-c5,c8,c11,c14 – ácido araquidônico  
20:5n3-c5,c8,c11,c14,c17 – ácido timnodônico ou eicosapentaenóico  
22:6n3-c4,c7,c10,c13,c16,c19 – ácido docosahexaenóico  
AE – Altamente especializado  
AGD – Ácidos graxos desejáveis  
AGI – Ácidos graxos insaturados  
AGMI – Ácidos graxos monoinsaturados  
AGPI – Ácidos graxos poli-insaturados  
AGPI:AGS – Razão entre ácidos graxos poli-insaturados e saturados  
AGS – Ácidos graxos saturados  
ANOVA – Análise de variância univariada  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
CCC – Coeficiente de correlação cofenética  
CCS – Contagem de células somáticas  
céls mL<sup>-1</sup> – células por mililitros  
CH<sub>3</sub>COOH – Ácido acético  
CH<sub>3</sub>COONa – Acetato de sódio  
CLA – Ácido linoleico conjugado  
DL50 – Dose letal 50  
DPR – Desvio padrão relativo  
ES – Especializado  
EUA – Estados Unidos da América  
eV – Eletrovolt

FAME – Éster metílico de ácidos graxos  
FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura  
FE – Fator de erro  
FRE – Fator de resposta experimental  
FRT – Fator de resposta teórico  
g 100 g<sup>-1</sup> – gramas por 100 gramas  
g L<sup>-1</sup> – gramas por litro  
GC – Cromatógrafo gasoso  
GC-FID – Detector de ionização de chama  
GC-FPD – Detector por Fotométrico de Chama  
h/H – Razão entre ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos  
HDL – Lipoproteína de alta densidade  
IA – Índice de aterogenicidade  
IL-6 – Interleucina 6  
IN – Índice nutracêutico  
IN51 – Instrução Normativa N°51  
IN62 – Instrução Normativa N°62  
INV – Inverno  
IT – Índice de trombogenicidade  
LDL – Lipoproteína de baixa densidade  
LOD – Limite de detecção  
LOQ – Limite de quantificação  
MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento  
MeCN – Cianeto de metila ou acetonitrila  
mg g<sup>-1</sup> – miligramas por grama  
MgSO<sub>4</sub> – Sulfato de magnésio  
min – minuto  
mL – mililitro  
mM – milimolar  
MS – Matéria seca  
n-3 – Ácidos graxos ômega 3  
n-6 – Ácidos graxos ômega 6  
n6:n3 – Razão entre ácidos graxos ômega 6 e ômega 3  
NE – Não especializado  
OUT – Outono  
PCA – Análise de componentes principais  
PI – Padrão interno  
PNCRC – Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes  
PRIM – Primavera  
PSA – Sorvente amina primária-secundária  
R – Recuperação  
SARLE – Serviço de Análises de Rebanhos Leiteiros  
SE – Semiespecializado  
SNG – Sólidos não gordurosos  
SPE – Extração em fase sólida  
ST – Sólidos totais  
UE – União Europeia  
UFC mL<sup>-1</sup> – unidades formadoras de colônia por mililitros  
UPL – Unidades produtoras de leite  
VER – Verão

WHO – Organização Mundial da Saúde

$\Delta$ 9-dessaturase – delta 9 dessaturase

$\Sigma$ AGMI – Somatório dos ácidos graxos monoinsaturados

$\Sigma$ AGPI – Somatório dos ácidos graxos poli-insaturados

## LISTA DE APÊNDICES

<b>APÊNDICE A.</b> Artigo publicado na Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB): Qualidade e potencial nutracêutico do leite bovino em diferentes sistemas de produção e estações do ano.....	117
---	-----



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>1.1 Objetivos geral e específicos</b> .....	<b>20</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1 Qualidade-química e microbiológica do leite</b> .....	<b>21</b>
<b>2.2 Perfil de ácidos graxos e sua relação com a saúde humana</b> .....	<b>23</b>
2.2.1 Ácidos graxos saturados (AGS) .....	23
2.2.2 Ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) .....	24
2.2.3 Ácidos graxos essenciais: poli-insaturados ômega 6 e ômega 3 .....	25
2.2.4 Ácido linoleico conjugado (CLA) .....	27
2.2.5 Biossíntese de ácido linoleico conjugado (CLA) via bio-hidrogenação ruminal e enzima delta 9 dessaturase .....	29
2.2.6 Índices de qualidade nutricional da fração lipídica .....	31
<b>2.3 Efeitos sazonal e nutricional no perfil de ácidos graxos do leite</b> .....	<b>33</b>
2.3.1 Efeito das pastagens sobre o perfil de ácidos graxos do leite.....	33
2.3.2 Efeito de forragens conservadas sobre o perfil de ácidos graxos do leite .....	35
2.3.3 Efeito da relação volumoso:concentrado sobre o perfil de ácidos graxos do leite.....	36
<b>2.4 Agrotóxicos e contaminação do leite</b> .....	<b>37</b>
2.4.1 Efeitos de tratamentos térmicos industriais na presença de resíduos de agrotóxicos no leite .....	41
2.4.2 Limite máximo de resíduos (LMR) de agrotóxicos.....	121
<b>3 DESENVOLVIMENTO</b> .....	<b>43</b>
<b>3.1 Descrição do desenvolvimento da tese</b> .....	<b>43</b>
<b>3.2 MANUSCRITO I: Formação de sistemas homogêneos de produção a partir da composição química e microbiológica do leite</b> .....	<b>45</b>
<b>3.3 MANUSCRITO II: Qualidade e potencial nutracêutico do leite bovino em diferentes sistemas de produção e estações do ano</b> .....	<b>59</b>
<b>3.4 MANUSCRITO III: Efeito de sistemas de produção, estações do ano e tratamentos térmicos industriais na presença de agrotóxicos no leite do Rio Grande do Sul, Brasil.</b>	<b>80</b>
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>100</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>102</b>
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>116</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é tradicionalmente um grande produtor de leite. A atividade que começou com características extrativistas, já ocupa posição de destaque no cenário econômico internacional, enquadrando-se na quarta posição no âmbito da produção mundial, totalizando cerca de 34,1 milhões de toneladas (FAO, 2013).

Considerando o crescimento da demanda por leite no mercado mundial e, a potencialidade do Brasil em atender grande parte desse mercado, torna-se de extrema importância atingir o padrão de qualidade do leite exigido internacionalmente.

Em termos de qualidade, do ponto de vista legal e prático, consideram-se dois aspectos principais, um deles, é a composição centesimal do leite, incluindo os teores de proteína, gordura, sólidos totais (ST) e sólidos não gordurosos (SNG) e outro é o aspecto higiênico sanitário, incluindo requisitos essenciais adotados internacionalmente, como a contagem de células somáticas (CCS) e a contagem bacteriana total (CBT).

Com a maior divulgação e acesso à informação sobre o papel dos alimentos na saúde, o conceito de qualidade tem-se tornado mais abrangente, levando em consideração aspectos ligados à composição de produtos, relacionando-a com uma alimentação mais adequada. Estas perspectivas são dirigidas a uma nova classe de alimentos, denominada de “alimentos nutraceuticos”, que são aqueles capazes de proporcionar benefícios à saúde, que incluem prevenção e/ou tratamento de doenças. Os produtos lácteos também passam por estas mudanças e os consumidores questionam os seus efeitos sobre a sua saúde.

Entre os componentes do leite, a gordura esteve durante anos associada a uma variedade de doenças, devido a seu alto conteúdo de ácidos graxos saturados (AGS). Porém, sabe-se hoje que não apenas o conteúdo global de AGS, monoinsaturados (AGMI) ou poli-insaturados (AGPI) é importante, mas também, a presença de alguns ácidos graxos específicos, com efeitos benéficos ou maléficos, podendo contribuir para a prevenção de muitas doenças crônicas em humanos (BERTOLINO et al., 2006). Assim, com foco nos possíveis efeitos que alguns ácidos graxos exercem sobre a saúde tem-se buscado a diminuição dos teores de AGS de cadeia média, como láurico (12:0), mirístico (14:0) e palmítico (16:0), elevação de AGPI e, aumento da concentração do ácido oleico (18:1n9 - c9) e ácido trans vacênico (18:1n7 - t11), que é o precursor da síntese endógena na glândula mamária do principal isômero de ácido linoleico conjugado (CLA) no leite, o ácido rumênico (CLA, 18:2n7 - c9, t11) (DEWHURST et al., 2006).

O cenário atual da produção de alimentos também revela o grande interesse da sociedade quanto à inocuidade dos produtos consumidos, especialmente no que concerne aos resíduos de agrotóxicos (DAMALAS; ELEFTHEROHORINOS, 2011). Quando aplicados de forma inadequada, estes agroquímicos podem contaminar cursos de água, além de gerarem resíduos em produtos agrícolas, que ao serem destinados ao consumo dos animais, podem contaminar o leite (KAMPIRE et al., 2011). Além disso, por ser um alimento bastante perecível e de fácil deterioração, o leite é submetido a tratamentos térmicos industriais (pasteurização e ultrapasteurização), a fim de estender o seu período de conservação, porém não é conhecido se estes processos conferem segurança para o consumo quanto à presença de agroquímicos (KAMPIRE et al., 2011).

Contribuindo para esta problematização, a cadeia produtiva brasileira está distribuída por todo o território nacional, com expressiva heterogeneidade de sistemas de produção em todas as unidades federativas (ALEIXO et al., 2007), sendo representada por um reduzido número de produtores mais especializados (cerca de 20%) e um elevado número de pequenos produtores (cerca de 80%) (HOUSTIOU et al., 2006; YAMAGUCHI et al., 2006). Assim, conhecer essa diversidade e a sua interação com as acentuadas variações sazonais existentes, torna-se cada vez mais importante para se ter eficácia nas intervenções junto aos produtores rurais, no sentido de contribuir para a melhoria da qualidade do leite nacional, item inexorável a um país exportador (HOSTIOU; DEDIEU, 2012). Segundo Aleixo et al. (2007), as ferramentas constituídas pelas técnicas de análise multivariada de dados, sobretudo, a análise de componentes principais combinada com a análise de agrupamento, possuem grande potencial para a elucidação desses problemas.

Este estudo avaliou a potencialidade nutracêutica do leite bovino, através da criação do índice nutracêutico (IN), e diagnosticou condições naturais de manejo nas distintas estações climáticas e diferentes tratamentos térmicos industriais (pasteurização e ultrapasteurização), que favorecem a produção de um leite mais adequado à alimentação humana.

## 1.1 Objetivos geral e específicos

### ➤ **Objetivo Geral:**

- Avaliar de que forma o nível tecnológico e as estações do ano influenciam a qualidade microbiológica (CCS e CBT) e química do leite (gordura, proteína, potencialidade nutracêutica em relação ao perfil de ácidos graxos e agrotóxicos), além de avaliar a eficiência dos tratamentos térmicos industriais (pasteurização e ultrapasteurização) na degradação ou eliminação dos agroquímicos presentes no leite cru refrigerado.

### ➤ **Objetivos específicos:**

- Determinar o perfil de ácidos graxos do leite bovino em função das estações climáticas e distintas estratégias de manejo, nas condições de produção do Rio Grande do Sul, Brasil.
- Sugerir um novo índice de qualidade da fração lipídica do leite, incluindo ácidos graxos com potencialidade nutracêutica reconhecida, denominando-o índice nutracêutico (IN).
- Determinar em qual estação e sistema de produção obtém-se o leite com maior índice nutracêutico (IN).
- Determinar a qualidade química do leite bovino nas diferentes estações climáticas e distintas estratégias de manejo utilizadas no Rio Grande do Sul, Brasil, e se estes estão de acordo com requisitos estabelecidos pelo setor normativo nacional (IN62, MAPA).
- Determinar as características microbiológicas do leite bovino nas diferentes estações climáticas e distintas estratégias de manejo utilizadas no Rio Grande do Sul, Brasil, e se estes estão de acordo com requisitos estabelecidos pelo setor normativo nacional (IN62, MAPA).
- Determinar situações, em função das estações climáticas e distintas estratégias de manejo adotadas no Rio Grande do Sul, Brasil, que favoreçam a obtenção de um leite mais adequado à alimentação quanto à presença de 93 agrotóxicos.
- Determinar o comportamento de 93 agrotóxicos frente aos tratamentos térmicos usualmente empregados nas indústrias lácteas (pasteurização e ultrapasteurização).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Qualidade química e microbiológica do leite

Em termos de qualidade, do ponto de vista legal e prático, consideram-se dois aspectos principais. Um deles é a composição centesimal do leite, incluindo os teores de proteína, gordura, lactose, minerais, ST e SNG e outro é o aspecto higiênico sanitário, incluindo requisitos essenciais adotados internacionalmente, como a CCS e CBT. O setor normativo, na figura do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), segundo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite Cru Refrigerado (IN62, Instrução Normativa N°62, de 30/12/2011, MAPA), regulamenta estes requisitos de qualidade.

O leite cru resfriado deve apresentar gordura mínima de 3,0 g 100 g<sup>-1</sup>, proteína mínima de 2,9 g 100 g<sup>-1</sup> e SNG mínimo de 8,4 g 100 g<sup>-1</sup> (BRASIL, 2011). Além disso, a regulamentação dos padrões de identidade e qualidade do leite cru refrigerado está em processo de implantação gradativa quanto a CCS e CBT. Através da IN62, estes índices higiênicos sanitários, que podiam chegar respectivamente a 750.000 céls mL<sup>-1</sup> e 750.000 UFC mL<sup>-1</sup>, na extinta Instrução Normativa 51 (IN51), passaram a ter como limite máximo, 600.000 céls mL<sup>-1</sup> para CCS e 600.000 UFC mL<sup>-1</sup> para CBT.

Atualmente, a norma brasileira estabelece como critério, desde o dia 30 de junho de 2014, estendendo-se até 30 de junho de 2016, os limites de 500.000 céls mL<sup>-1</sup> e 300.000 UFC mL<sup>-1</sup>, para CCS e CBT, respectivamente, e posteriormente, a partir de 1° de julho de 2016 atenderá os padrões internacionais de CCS, igualando-se ao limite de 400.000 céls mL<sup>-1</sup>, dos países membros da União Europeia (UE), Nova Zelândia e Austrália, e propondo limites inferiores aos designados pelo Canadá e Estados Unidos da América (EUA), que são de 500.000 céls mL<sup>-1</sup> e 750.000 céls mL<sup>-1</sup>, respectivamente, enquanto que, para CBT, igualará aos limites legais, de 100.000 UFC mL<sup>-1</sup>, dos países membros da UE, EUA, Austrália e Nova Zelândia e ficará acima do limite proposto para o Canadá, que é de 50.000 UFC mL<sup>-1</sup> (SANTOS, 2006; PHILPOT; NICKERSON, 2002).

O cenário atual da produção de alimentos também revela o grande interesse da sociedade quanto à inocuidade dos produtos consumidos, especialmente no que concerne aos resíduos de agrotóxicos (DAMALAS; ELEFTHEROHORINOS, 2011). Quando aplicados de forma inadequada, os agrotóxicos podem contaminar cursos de água além de gerarem resíduos em produtos agrícolas que, quando destinados ao consumo dos animais, pode contaminar o leite (KAMPIRE et al., 2011).

Atualmente, órgãos governamentais competentes têm atualizado sua legislação e seus mecanismos de controle específicos, através do estabelecimento de limites máximos para resíduos de agrotóxicos (LMR) no leite e outros alimentos.

Em âmbito mundial, o *Codex Alimentarius*, organismo vinculado à Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura/Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO), e a Comunidade Europeia, através da Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (*European Food Safety Authority*, EFSA) estabelece os LMR em leite. Entretanto, em nível nacional, o monitoramento destes agrotóxicos, é realizado nos produtores e indústrias lácteas, através do Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), desenvolvido pelo MAPA e, cabe à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão do Ministério da Saúde, a fiscalização do produto final nos pontos de venda direta ao consumidor.

Conhecer a relação entre os parâmetros de qualidade do leite com a diversidade da cadeia produtiva e a sua interação com acentuadas variações sazonais existentes, e se estes traduzem os valores requeridos pelo setor normativo nacional e internacional, torna-se cada vez mais importante para se ter eficácia nas intervenções junto aos produtores rurais e contribuir para a melhoria da qualidade do leite nacional (HOSTIOU; DEDIEU, 2012).

Com a maior divulgação e acesso à informação sobre o papel dos alimentos na saúde, o conceito de qualidade tem-se tornado mais abrangente, levando em consideração aspectos ligados à composição de produtos. Nesse contexto, a gordura, que esteve durante anos associada a uma variedade de doenças, devido a seu alto conteúdo de AGS, passou a ser vista não apenas pelo conteúdo global de AGS, AGMI ou AGPI, mas também pela presença de alguns ácidos graxos específicos, com efeitos benéficos, podendo contribuir para a prevenção de muitas doenças crônicas em humanos (BERTOLINO et al., 2006). Assim, com foco nos possíveis efeitos que alguns ácidos graxos exercem sobre a saúde, tem-se buscado a diminuição dos teores dos AGS de cadeia média, como láurico (12:0), mirístico (14:0) e palmítico (16:0), elevação de AGPI e, aumento da concentração do ácido oleico e ácido trans vacênico, que é o precursor do ácido rumênico (CLA, 18:2n7 - c9, t11) na síntese endógena da glândula mamária (DEWHURST et al., 2006).

Além disso, por ser um alimento bastante perecível e de fácil deterioração, o leite é usualmente submetido a tratamentos térmicos industriais (pasteurização e ultrapasteurização), a fim de estender o seu período de conservação, porém faltam informações se estes processos conferem segurança para o consumo quanto à presença de agrotóxicos.

Conhecimentos sobre o perfil de ácidos graxos e sua relação com a saúde humana, sobre os índices de qualidade nutricional da fração lipídica, processo de biossíntese de CLA, e os possíveis efeitos sazonais e nutricionais que os influenciam, bem como conhecimentos sobre os agrotóxicos e contaminação do leite, tornam-se de extrema importância para esclarecer este emergente conceito de qualidade do leite.

## **2.2 Perfil de ácidos graxos e sua relação com a saúde humana**

### **2.2.1 Ácidos graxos saturados (AGS)**

Devido à toxicidade de certos ácidos graxos, especialmente os AGPI, aos microrganismos ruminais, estes desenvolveram um mecanismo de autodefesa denominado de bio-hidrogenação ruminal, que consiste na conversão de ácidos graxos insaturados (AGI) em AGS, que por sua vez apresentam menor toxicidade. Este processo metabólico é preponderante para a característica saturada da gordura proveniente de produtos derivados de ruminantes.

Mais da metade dos ácidos graxos do leite são saturados, correspondendo cerca de 19 g L<sup>-1</sup> (FAO, 2013). O elevado conteúdo de AGS na gordura láctea tem sido relacionado a diversas doenças em humanos, associadas ao perfil aterogênico e ao aumento do risco de doenças cardiovasculares. Contudo, estudos sobre os efeitos individuais dos ácidos graxos na saúde vêm sendo intensamente pesquisados, evidenciando-se que apenas três AGS mostram propriedades de aumentar o colesterol sérico, são eles, o ácido láurico (12:0), mirístico (14:0) e palmítico (16:0).

Sri-Tarino et al. (2010), em estudo de metanálise, mostraram que se comparado a carboidratos, o ácido láurico (12:0) é o que mais aumenta o LDL-colesterol, seguido do mirístico (14:0) e do palmítico (16:0). Já o esteárico (18:0) pode provocar pequena redução no LDL-colesterol. Corroborando com essas evidências, Baer et al. (2004) mostraram que o ácido esteárico (18:0) afeta infimamente o LDL-colesterol, entretanto, esses mesmos autores evidenciaram que ele pode aumentar as concentrações de fibrinogênio, o que eleva o risco de doenças cardiovasculares. No mesmo estudo metanalítico, Sri-Tarino et al. (2010), em relação ao HDL-colesterol, na mesma comparação com carboidratos, os ácido láurico (12:0), mirístico (14:0) e palmítico (16:0) aumentam esta fração lipídica, enquanto o esteárico (18:0) provoca um pequeno aumento nesta lipoproteína específica.

Constata-se que entre os AGS, o ácido esteárico (18:0) é aquele que tem menor influência na colesterolemia. Isto se deve possivelmente à rápida velocidade de

desidrogenação desse ácido graxo, que é mais veloz que o seu alongamento de cadeia, fazendo com que seja mais rapidamente convertido em ácido oleico no fígado, por meio das dessaturases. Por outro lado, o ácido mirístico (14:0) apenas se alonga, sendo mais rapidamente incorporado a triglicérides celulares, o que explica a importante relação deste ácido graxo com a elevação da colesterolemia (SRI-TARINO et al., 2010).

Apesar do indício que alguns AGS são prejudiciais à saúde, em outro estudo de metanálise, Nestel et al. (2008) não relacionaram o leite ao aumento do risco de doenças cardiovasculares. Provavelmente, isto se deve à sua composição lipídica, que além da presença de AGS, possui em seu perfil, compostos benéficos a saúde, como os AGPI e ácido trans vacênico, que é o precursor do CLA na síntese endógena da glândula mamária.

### 2.2.2 Ácidos graxos monoinsaturados (AGMI)

O ácido oleico é o AGMI mais abundante na natureza, representando cerca de 40% das gorduras alimentares, sendo acompanhado nas gorduras vegetais e, sobretudo nas gorduras de animais marinhos, de um homólogo do ácido palmítico (16:0), o ácido palmitoleico (16:1n7 - c9). No leite, está presente em grandes concentrações, compreendendo cerca de 9 g L<sup>-1</sup> (FAO, 2013).

A presença do ácido oleico na dieta é elevada em diversas populações, sendo o segundo ácido graxo mais consumido no mundo, possuindo no leite e seus derivados uma grande fonte para sua alta ingestão. O ácido oleico é um AGMI cuja presença na dieta diminui os níveis de LDL-colesterol e triglicérido sérico e, em substituição aos AGS, reduz o risco de doenças coronarianas (MENSING et al., 2003).

Corroborando com essas evidências, Baer et al. (2004) em estudo com 50 homens consumindo dietas controladas por 5 semanas, onde as dietas experimentais foram substituídas em relação a dieta controle em 8% de energia das gorduras ou dos ácidos graxos, demonstraram que a substituição por ácido oleico promove redução significativa das concentrações de interleucina 6 (IL-6), quando comparado àquelas substituídas por gorduras saturadas e ácidos graxos trans. Além disso, neste estudo não houve diferença nos níveis de outros marcadores inflamatórios após ingestão de dieta com ácido oleico (39% gordura) e da dieta controle (30% gordura). Estes resultados sugerem que o consumo de dieta hiperlipídica rica em ácido oleico não resulta no desencadeamento de processo inflamatório, conforme observado em resposta ao consumo de dietas hiperlipídicas ricas em gordura saturada e ácidos graxos trans, sendo então, um ácido graxo com potencialidades funcionais na redução do risco



de doenças cardiovasculares, pois o aumento da concentração de IL-6 está associado ao aumento do risco de infarto do miocárdio em indivíduos clinicamente saudáveis.

Sobre a possível funcionalidade do ácido oleico no sistema cardiovascular, este é mais estável à oxidação lipídica que os ácidos graxos ômega-3 (n-3) e ômega-6 (n-6), podendo substituí-los parcialmente nos triglicerídeos e nos lípidos da membrana celular. Assim, pela sensibilidade que a enzima lecitina colesterol acil-transferase tem ao estresse oxidativo, as maiores concentrações de ácido oleico, possibilitaria que esta enzima desenvolvesse seu importante papel no transporte reverso do colesterol, além de diminuir a concentração de LDL-colesterol oxidado, importante inibidor da enzima lecitina colesterol acil-transferase (HAUG et al., 2007), o que sugere uma maior proteção contra aterosclerose e doenças cardiovasculares do que dietas ricas somente em AGPI.

Além do ácido oleico, outros AGMI merecem atenção especial, tais como os isômeros do ácido graxo 18:1 trans, onde no leite é maior representado pelo ácido trans vacênico. Estes ácidos graxos, por sua conformação geométrica, poderiam exercer ação prejudicial à saúde, porém Fuente et al. (2006), constataram que o ácido trans vacênico também pode ser convertido em humanos à ácido rumênico, isômero de CLA com comprovada funcionalidade e potencialidade nutracêutica.

Estudos mostram que ácidos graxos trans de origem animal apresentam comportamento metabólico distinto dos produzidos quimicamente (industrialmente), portanto sem risco de causar doenças cardiovasculares (TRICON et al., 2006). Nesse sentido, Wang et al. (2008) não detectaram nenhum resultado prejudicial à saúde de ratos, magros ou obesos que receberam alimentação em curto prazo, de 1,5% de ácido trans vacênico e, a sua suplementação na dieta levou a diminuição significativa da concentração plasmática de triglicerídeos.

### 2.2.3 Ácidos graxos essenciais: poli-insaturados ômega 6 (n-6) e ômega 3 (n-3)

No fim da década de 20, alguns pesquisadores, ao observarem alterações fisiológicas em pessoas que não consumiam gorduras na sua dieta, constataram que havia compostos presentes na composição lipídica dos alimentos, que eram essenciais para a funcionalidade do organismo. Esses constituintes foram classificados como ácidos graxos essenciais, ou seja, são aqueles que o organismo não consegue sintetizar e, desta forma, devem ser oriundos exclusivamente da dieta.

A essencialidade ocorre pela incapacidade enzimática do metabolismo humano de inserir duplas ligações além da posição delta 9, papel das enzimas delta 12 e delta 15 dessaturases, responsáveis respectivamente, pela formação dos ácidos graxos essenciais, ácido linoleico (18:2n6 - c9, c12) e alfa linolênico (18:3n3 - c9, c12, c15) (NAKAMURA; NARA, 2004).

O ácido linoleico é o principal precursor do ácido gama linolênico (18:3n6 - c6, c9, c12), que posteriormente é convertido em ácido araquidônico (20:4n6 - c5, c8, c11, c14), enquanto o alfa linolênico é o mais importante antecessor metabólico do ácido eicosapentaenóico (20:5n3 - c5, c8, c11, c14, c17) e do ácido docosahexaenóico (22:6n3 - c4, c7, c10, c13, c16, c19) (NAKAMURA; NARA, 2004).

Os ácidos graxos essenciais estão subdivididos em dois grandes grupos, o ácido linoleico e seu derivado ácido araquidônico, pertencentes à família n-6, enquanto o alfa linolênico e os seus sucessores ácido eicosapentaenóico e ácido docosahexaenóico, à família n-3 (PERINI et al., 2010).

Os ácidos graxos n-6 e n-3 apresentam insaturações separadas apenas por um carbono metilênico, com a primeira insaturação no sexto e terceiro carbono, respectivamente, enumerado a partir do grupo metil terminal (MARTIN et al., 2006). Estes AGPI vêm despertando grande interesse, pois apresentam diversas funções biológicas, como a manutenção da integridade das células endoteliais, prevenindo aterosclerose e alterações cardiovasculares, estimulando a liberação de insulina, inibindo a vasoconstrição e agregação plaquetária, participando no desenvolvimento normal da placenta, do crescimento fetal e do desenvolvimento neuronal e participando nas funções imunomoduladoras (PERINI et al., 2010). Os AGPI também afetam as propriedades físicas das membranas, como fluidez, estabilidade e suscetibilidade ao dano oxidativo, associados ou não a outros fatores dietéticos (MARTIN et al., 2006). Além disso, o ácido araquidônico e o ácido eicosapentaenóico, derivados das famílias n-6 e n-3, respectivamente, são precursores de eicosanóides, os quais atuam como moduladores químicos em diversos processos biológicos (MARTIN et al., 2006).

É importante ressaltar que essas duas famílias de ácidos graxos competem pelas mesmas enzimas envolvidas na dessaturação e alongamento de suas cadeias e, dessa maneira, a razão entre ômega 6 e ômega 3 (n-6:n-3) na dieta assume grande importância na nutrição humana, resultando em várias recomendações que têm sido estabelecidas por autores e órgãos de saúde, em diferentes países.

Estima-se que com o processo de industrialização e conseqüente mudança de hábitos alimentares, a n-6:n-3 na dieta populacional aumentou drasticamente, ao ponto de resultar em

relações entre 10:1 a 20:1, ocorrendo registros de até 50:1 (SIMOPOULOS et al., 2006), resultados preocupantes, ao considerar as razões de 2:1 a 4:1 recomendadas por alguns autores, pois evidencia-se uma maior conversão do ácido alfa linolênico em ácido docosahexaenóico, que alcança o seu valor máximo em torno de 2,3:1 (SIMOPOULOS et al., 2006).

Assim, as razões entre 2:1 e 4:1 têm maior importância para pessoas com hábitos alimentares que resultam em uma baixa ingestão de ácido eicosapentaenóico e ácido docosahexaenóico, podendo servir como parâmetro para a necessidade de diminuição da n-6:n-3 das dietas modernas.

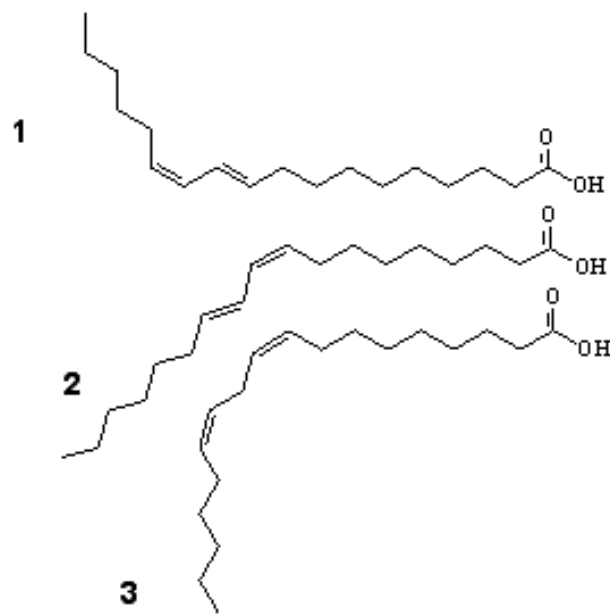
#### 2.2.4 Ácido linoleico conjugado (CLA)

A definição mais adequada para o termo CLA refere-se àquela que o considera como uma mistura de isômeros geométricos (combinações de cis-cis, trans-cis, cis-trans e trans-trans) e posicionais (dupla ligação nas posições 8 e 10, 9 e 11, 10 e 12 ou 11 e 13) do ácido linoleico, em que as insaturações são conjugadas, ou seja, separadas por simples ligação carbono-carbono (BESSA et al., 2000; COLLOMB et al., 2006) (FIGURA 1).

Os CLA foram descobertos em estudos desenvolvidos entre o final da década de 70 e meados da década de 80, quando Pariza et al. (1979) sugeriram que a carne bovina grelhada possuía um componente carcinogênico. No intuito de identificar este composto, Pariza et al. (1983) observaram que extratos cárneos bovinos apresentavam componentes mutagênicos e antimutagênicos independente do processo de cocção, ao contrário do que se afirmava anteriormente. Posteriormente, Pariza e Hargraves (1985) demonstraram que o extrato de carne bovina era capaz de mitigar a progressão de tumores de células epiteliais em camundongos. Dois anos depois, Ha et al. (1987) isolaram e caracterizaram esse componente mutagênico da fração lipídica da carne, através de técnicas cromatográficas e espectrofotométricas. Dessa maneira, esses autores constataram que a fração isolada continha quatro isômeros derivados do ácido linoleico com um sistema de dupla ligação conjugada, denominando-os de CLA.

Nos últimos anos, diversas pesquisas têm traçado estratégias para se elevar as concentrações dos CLA, especialmente o ácido rumênico, principal isômero presente no leite bovino, cujas propriedades anticarcinogênicas, antiaterogênicas, antidiabetogênicas (diabetes do tipo II) e imunomodulatórias têm sido constantemente demonstradas (DEWHURST et al., 2006).

O aumento da concentração do ácido trans vacênico também é preconizado, pois há evidências de conversão em humanos deste ácido graxo em ácido rumênico (19% de conversão) (TURPEINEN et al., 2002; WIJLEN; COLOMBANI, 2010). Além disso, para haver maior conteúdo de ácido rumênico no leite bovino é necessário que o ácido trans vacênico atinja a glândula mamária, uma vez que a ação da enzima delta 9 dessaturase é a principal via de síntese deste isômero (COLLOMB et al., 2006).



**Figura 1.** Estrutura dos isômeros de ácido linoleico conjugado (CLA) (1 e 2) e ácido linoleico (3): 1) 18:2n6-t10,c12; 2) 18:2n7- c9,t11; e 3) 18:2n6-c9,c12.

Os diferentes isômeros de CLA têm distintos efeitos fisiológicos, sendo já comprovada a atividade biológica de dois de suas principais conformações geométricas, o ácido rumênico e o ácido trans-10, cis-12-octadecadienoico (FUENTE et al., 2006).

Entre os efeitos atribuídos aos isômeros de CLA, diversos resultados os relacionam com o câncer, estresse oxidativo e metabolismo lipídico, e sua relação com a composição corporal.

Os primeiros estudos de investigação das propriedades anticarcinogênicas do CLA data do princípio da década de 90 e, diversas pesquisas evidenciaram que este ácido graxo possui efeito inibitório sobre o crescimento de diversas células cancerígenas, como as responsáveis pelo câncer mamário, de cólon, próstata e gástrico, além de células leucêmicas.

Trabalhos apontam tanto o ácido rumênico como o ácido trans-10, cis-12-octadecadienoico, por mecanismos distintos, como possuidores de efeito antiproliferativo sobre estes tipos de cânceres, mecanismos estes que envolvem controle do ciclo celular, indução da apoptose e controle do metabolismo celular (FUENTE et al., 2006).

O efeito do CLA sobre o processo de autoxidação lipídica tem sido bastante estudado nos últimos anos, com resultados um tanto quanto contraditórios, os quais não permitem ainda conclusões claras a respeito de sua ação antioxidante. A presença de duplas ligações na configuração trans em isômeros do CLA contribui para a estabilidade do mesmo à oxidação, no entanto, ao considerar que a conjugação das duplas ligações é um dos primeiros passos da autoxidação lipídica, e que a partir daí se iniciam as irrefreáveis reações em cadeia do processo oxidativo, o CLA poderia atuar como pró-oxidante (SANTOS-ZAGO et al., 2008).

Quanto ao efeito do CLA no metabolismo lipídico e sua relação com a composição corporal, o ácido trans-10, cis-12-octadecadienoico tem sido apontado como um potente inibidor da síntese de gordura no leite e também responsável pela redistribuição da gordura do músculo, sendo capaz de diminuir a massa gorda e aumentar a massa magra, reciprocamente (FUENTE et al., 2006). Além disso, segundo Santos-Zago et al. (2008), a administração de CLA, sob as mais diversas maneiras e concentrações, parece ser responsável pela melhora do perfil lipídico sanguíneo, pela redução da aterosclerose, e ainda, pela melhora da resistência à insulina.

Frente a estes resultados, torna-se de extrema importância o desenvolvimento de estratégias que promovam um aumento de CLA nos produtos derivados de ruminantes e, conseqüentemente o seu consumo, com a finalidade de promover uma alimentação mais adequada à saúde humana.

#### 2.2.5 Biossíntese de ácido linoleico conjugado (CLA) via bio-hidrogenação ruminal e enzima delta 9 dessaturase

Parodi (1977) foi o primeiro a estabelecer o ácido rumênico como o principal isômero de CLA presente na fração lipídica do leite bovino. Antes disso, Kepler et al. (1966) identificaram este composto como o primeiro intermediário da bio-hidrogenação ruminal do ácido linoleico, pela bactéria *Butyrivibrio fibrisolvens*.

Até recentemente, a bio-hidrogenação ruminal foi considerada como a única fonte biossintética de CLA no leite e carne de ruminantes, no entanto, atualmente são aceitas duas origens metabólicas diferentes, além da bio-hidrogenação ruminal é admitida a via endógena, por meio da ação da enzima delta 9 dessaturase.

O processo de bio-hidrogenação consiste na adição de íons hidrogênio em uma dupla ligação, resultando na conversão de AGI em seus AGS correspondentes. Como exemplo, a maioria dos AGI que têm 18 carbonos (ácido oleico, linoleico e alfa linolênico) ou 16 carbonos (ácido palmitoleico) serão convertidos a ácido esteárico (18:0) e palmítico (16:0), respectivamente. Esta é uma das principais razões pela alta natureza saturada dos lipídios nos ruminantes. No entanto, é importante ressaltar que o processo de bio-hidrogenação não é 100% eficiente para todos os AGI, dessa maneira, alguns destes, como o ácido linoleico, alfa linolênico e produtos intermediários deste processo biológico, tais como o CLA e o ácido trans vacênico, alcançam o duodeno e são absorvidos para a corrente sanguínea, sendo secretados no leite. Além disso, o ácido trans vacênico é endogenamente dessaturado na glândula mamária e tecido adiposo, pela ação da enzima esteroil-CoA dessaturase ou delta 9 dessaturase, à CLA (GRIINARI et al., 2000).

O processo de bio-hidrogenação ruminal é mais bem caracterizado pela bio-hidrogenação do ácido linoleico. Tal processo envolve uma isomerização que converte o ácido linoleico em CLA, catalisada por isomerasas provenientes principalmente da bactéria ruminal *Butyrivibrio fibrisolvens*. Segundo Destailats et al. (2005) a bio-hidrogenação do ácido alfa linolênico, predominante em forragens, ocorre de maneira semelhante, porém consiste na formação dos conjugados trienóicos 18:3 c9, t11, c15 e 18:3 c, t13, c15, na proporção de 4:1, respectivamente, como os primeiros intermediários após a isomerização inicial deste ácidos graxos. Ao final das sequências reducionais, também há formação de ácido trans vacênico e de ácido trans-13 octadecenoico (18:1n5 - t13), como intermediários monoenóicos, sendo o primeiro o mais abundante.

Vale ressaltar que o ácido trans vacênico é um metabólito intermediário comum entre a bio-hidrogenação do ácido linoleico e do ácido alfa linolênico e, que o ácido rumênico não é um intermediário na bio-hidrogenação do ácido alfa linolênico.

Para verificar se o ácido trans vacênico produzido no rúmen, poderia ser convertido em CLA na glândula mamária, pela ação da enzima delta 9 dessaturase, Griinari et al. (2000) infundiram no abomaso de vacas em lactação, uma mistura de ácido trans vacênico e ácido trans-12 octadecenoico (18:1n6 - t12) (50%-50%), verificando um aumento na concentração de ácido rumênico no leite secretado, e a consequente existência de uma via de síntese endógena ativa deste metabólito. Estes mesmos autores, em outro experimento, com o intuito de constatarem qual a contribuição da síntese endógena de CLA via delta 9 dessaturase, administraram óleo de esterculina (potente inibidor da delta 9 dessaturase) no abomaso de vacas em lactação, verificando a ocorrência de uma diminuição na concentração da gordura

do leite e outros produtos resultantes da ação desta enzima, os quais ficaram evidenciadas por um aumento de duas a três vezes na relação dos ácidos graxos 14:0:14:1, 16:0:16:1 e 18:0:18:1. Para estimar a inibição da delta 9 dessaturase os autores utilizaram a proporção de 14:0:14:1 como indicador e, verificaram que 64% do CLA na gordura do leite de ruminantes tinha como origem a síntese endógena. Corroborando com estes dados, Corl et al. (2001), suplementaram vacas em lactação com óleo de esterculina, ocorrendo uma redução de 60 a 65% no CLA e, reduções de 84%, 59% e 46% para os ácidos graxos miristoleico (14:1n5 - c9), palmitoleico (16:1n7 - c9) e oleico (18:1n9 - c9), respectivamente. Através destes resultados, estes autores demonstraram que a síntese endógena de CLA, via delta 9 dessaturase é mais importante que a síntese pela bio-hidrogenação ruminal.

### 2.2.6 Índices de qualidade nutricional da fração lipídica

Baseados em estudos científicos foram desenvolvidos índices que auxiliam na avaliação da qualidade nutricional da fração lipídica dos alimentos, destacando-se os índices de aterogenicidade (IA), índice de trombogênicidade (IT), a razão de ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos (h/H) e os ácidos graxos desejáveis (AGD).

Os índices de qualidade da fração lipídica consideram a atividade funcional dos ácidos graxos no metabolismo das lipoproteínas de transporte do colesterol plasmático, cujo tipo e quantidade estão relacionados com o aparecimento de aterosclerose e trombose coronariana, bem como à incidência de doenças cardiovasculares (ULBRICHT; SOUTHGATE, 1991; SANTOS-SILVA et al., 2002).

O IT considera os ácidos mirístico (14:0), palmítico (16:0) e esteárico (18:0) como trombogênicos, e os AGPI n-6 e n-3 e AGMI como antitrombogênicos. No entanto, entre estes últimos, é imputado maior efeito antitrombogênico aos ácidos graxos ômega-3 (ULBRICHT; SOUTHGATE, 1991), como segue:

$$IT = \frac{(14:0 + 16:0 + 18:0)}{[(0,5 \cdot \sum AGMI) + (0,5 \cdot \sum n6) + (3 \cdot \sum n3) + (\sum n6 : n3)]}$$

Da mesma maneira, o IA atribui efeito aterosclerótico aos ácidos mirístico (14:0), palmítico (16:0) e esteárico (18:0), sendo creditada ao primeiro, a maior contribuição na formação da placa aterosclerótica. Por outro lado, este índice estabelece ação anti-aterosclerótica, aos AGMI e, aos pertencentes às séries n-6 e n-3 (ULBRICHT; SOUTHGATE, 1991), como segue:

$$IA = \frac{[(12:0) + (4.14:0) + 16:0]}{\sum AGMI + \sum n6 + \sum n3}$$

Os alimentos de origem animal possuem IA em faixas bem estabelecidas, assim, a gordura da carne possui valores entre 0,5 e 1,0, enquanto a gordura do leite possui valor ao redor de 2,0 (BOBE et al., 2004). Esta diferença se relaciona aos distintos perfis de ácidos graxos destes alimentos, visto que, o leite possui concentração maior de ácidos graxos de cadeia curta (4:0 a 10:0) e média (12:0 a 16:0), enquanto nos tecidos musculares de ruminantes são observados ácidos graxos de cadeia média e longa (NUERMBERG et al., 2008). Entretanto, não há valores recomendados para os IA e IT em produtos lácteos, portanto, considera-se que quanto menor for o valor destes índices, mais favorável é o perfil de ácidos graxos à saúde humana (SOUSA BENTES et al., 2009).

No decorrer das últimas décadas, diversos pesquisadores utilizaram a razão entre os AGPI e os AGS (AGPI:AGS) para avaliar a qualidade nutricional da fração lipídica dos alimentos. Em 1994 o Departamento de Saúde e Segurança Social (DHSS, 1994) recomendou que a razão AGPI:AGS para a dieta humana fosse superior a 0,45.

Em discordância, SILVA et al. (2002), afirmaram que esta relação não é a mais adequada para tal julgamento, pois não estão sendo considerados o efeito hipocolesterolêmico dos AGMI e a não associação do ácido esteárico (18:0) ao colesterol, que quando ingerido, é metabolizado a ácido oleico. Assim, estes autores sugerem a utilização da h/H, como segue:

$$h/H = \frac{(18:1n9 + 18:2n6 + 20:4n6 + 18:3n3 + 20:5n3)}{(14:0 + 16:0)}$$

No entanto, é importante ressaltar que não há um padrão de referência para tal no leite e seus derivados, todavia, como este índice possui em seu numerador somente AGS de cadeia média e longa, pode-se considerar o valor mínimo de 2,0, utilizado para produtos cárneos (SANTOS-SILVA et al., 2002).

Também para avaliar a adequação do perfil de ácidos graxos à alimentação humana, COSTA et al. (2008) propõem a utilização de um índice que leva em consideração os AGMI, AGPI e o ácido esteárico (18:0), nomeando-os como AGD, como segue:

$$AGD = \sum AGMI + \sum AGPI + 18:0$$

Há de se considerar que este parâmetro de avaliação, considera a totalidade de grupos específicos de ácidos graxos e não somente àqueles com reconhecida capacidade de proporcionar benefícios médicos e de saúde, que incluem prevenção de doenças em humanos.



Assim, evidencia-se a falta de um índice que mencione ácidos graxos que possuam potencial nutracêutico, como os CLA e ácido trans vacênico.

Devido à representatividade e o embasamento científico dos índices supracitados, estes são de extrema importância para a avaliação da qualidade nutricional da fração lipídica dos alimentos, porém ressalta-se a falta de uma equação que contemple ácidos graxos com potencialidade nutracêutica no leite, o que facilitaria a determinação de qual perfil de ácidos graxos é mais adequado à alimentação humana.

### **2.3 Efeitos sazonal e nutricional no perfil de ácidos graxos do leite**

O perfil de ácidos graxos na gordura do leite pode variar mediante diversos fatores, porém segundo Reis et al. (2004), o efeito da dieta de vacas em lactação é o fator que assume maior influência.

Nos últimos anos pesquisas foram realizadas no intuito de alterar a composição lipídica do leite, tornando-a mais adequada ao consumo humano, com foco na redução dos teores dos AGS de cadeia média, como láurico (12:0), mirístico (14:0) e palmítico (16:0), e o incremento na concentração do CLA, cujo principal isômero no leite bovino é o ácido rumênico, bem como de seu precursor para síntese endógena na glândula mamária, o ácido trans vacênico (DEWHURST et al., 2006).

A quantidade de ácidos graxos encontrados na maioria das rações animais é relativamente baixa, além disso, o tipo varia consideravelmente. O ácido graxo predominante nas plantas forrageiras é o ácido alfa linolênico, enquanto em grãos e seus subprodutos ou co-produtos, o mais comum é o ácido linoleico.

As fontes lipídicas utilizadas na dieta dos ruminantes são provenientes de plantas forrageiras e concentrados (grãos e seus subprodutos ou co-produtos), e os seus perfis lipídicos influenciam diretamente no perfil de ácidos graxos do leite.

#### **2.3.1 Efeito das pastagens sobre o perfil de ácidos graxos do leite**

Entre as fontes lipídicas utilizadas na dieta de ruminantes, nos países temperados, as gramíneas frescas contêm de 1 a 3% de ácidos graxos na matéria seca (MS), sendo que na primavera e outono são observadas as maiores concentrações (CHILLIARD et al., 2001). O ácido alfa linolênico (18:3n3 – c9, c12, c15), corresponde de 55 a 65% destes ácidos graxos, enquanto, em pastagens tropicais, este composto representa de 15 a 40% do total de ácidos graxos (CHILLIARD et al., 2002).

Trabalhando com vacas manejadas em pastagens de diferentes gramíneas de clima tropical, suplementadas com diferentes níveis de concentrado, com baixos teores de ácido alfa linolênico e ácido linoleico, Lopes et al. (2011) observaram o potencial destas forrageiras na produção de leite com perfil de ácidos graxos mais adequado à nutrição humana. Os autores relataram concentrações médias dos ácido rumênico e ácido trans vacênico, respectivamente, de 1,01 e 1,79 g 100 g<sup>-1</sup> de ácidos graxos totais, valores estes, dentro da faixa de variação relatada por Dewhurst et al. (2006), no leite de vacas que receberam forrageiras de clima temperado (fornecidas frescas ou conservadas). Estes autores encontraram de 0,72 a 2,64 g 100 g<sup>-1</sup> para o ácido rumênico e de 0,27 a 0,68 g 100g<sup>-1</sup> de ácidos graxos totais, para o ácido trans vacênico. Da mesma maneira, Fuke et al. (2012) observaram valores médios de 0,72 g 100 g<sup>-1</sup> para o ácido rumênico e 2,95 g 100 g<sup>-1</sup> de ácidos graxos totais, para o ácido trans vacênico.

Valores de CLA encontrados na gordura do leite australiano e neozelandês são frequentemente 2 a 3 vezes maiores que os valores encontrados em produtos americanos equivalentes. Este fato deve-se ao maior acesso as pastagens frescas e ricas em AGPI nos países da Oceania (PARODI, 1999).

Diversas pesquisas têm mostrado um aumento nas quantidades de CLA na gordura do leite de vacas sob pastejo. Neste contexto, Chilliard et al. (2001) e Chilliard et al. (2002) compararam dietas mistas com pastagens frescas de inverno, verificando um aumento significativo nas concentrações do ácido esteárico (18:0) (+2 g 100 g<sup>-1</sup> de ácidos graxos totais), ácido linoleico (+8 g 100 g<sup>-1</sup> de ácidos graxos totais), ácido alfa linolênico (+1 g 100 g<sup>-1</sup> de ácidos graxos totais) e ácido rumênico (+0,6 g 100 g<sup>-1</sup> de ácidos graxos totais) e, diminuição nas concentrações de AGS entre 10 e 16 carbonos (-13 g 100 g<sup>-1</sup> de ácidos graxos totais). Corroborando com estes autores, Dewhurst et al. (2006) observaram que vacas alimentadas em pastagens aumentam significativamente (P<0,05) as concentrações de ácido alfa linolênico e CLA (+0,5 e +0,9 g 100 g<sup>-1</sup> de ácidos graxos totais, respectivamente) quando comparadas com dietas mistas de inverno.

Quando ocorre um aumento da participação das pastagens frescas na dieta, observam-se aumentos lineares no ácido alfa linolênico, ácido trans vacênico e ácido rumênico e, decréscimos nos AGS que possuem entre 10 e 16 carbonos (COUVREUR et al., 2006). Assim, estes autores relataram que com a elevação da oferta de pastagens de 33 para 100% da dieta total, o ácido alfa linolênico e o ácido rumênico aumentaram, respectivamente, 0,3 e 1,1 g 100 g<sup>-1</sup> de ácidos graxos totais.

Efeitos consistentes encontrados na literatura, quanto ao efeito de pastagens frescas nos teores dos ácido alfa linolênico, ácido trans vacênico e ácido rumênico está relacionado com o elevado teor de ácido alfa linolênico que a maioria das pastagens apresentam, o qual é parcialmente bio-hidrogenado no rúmen à ácido trans vacênico e, em parte absorvido intacto pela corrente sanguínea, no intestino delgado, chegando a glândula mamária, onde pode ser diretamente secretado na sua forma original, ou sofrer dessaturação pela enzima delta 9 dessaturase, formando o CLA. Consistente com isto, o leite de vacas sob pastejo com gramíneas de inverno é mais rico em ácido trans vacênico (intermediário na bio-hidrogenação ruminal do ácido alfa linolênico), do que dietas mistas de inverno (0,5 a 0,8 vs <0,1 g 100 g<sup>-1</sup> de ácidos graxos totais) (FERLAY et al., 2006).

### 2.3.2 Efeito de forragens conservadas sobre o perfil de ácidos graxos do leite

No processo de fenação e em menor extensão na ensilagem podem ocorrer perdas oxidativas de AGPI, principalmente do ácido alfa linolênico (DEWHURST et al., 2006), que nas plantas forrageiras é o principal substrato lipídico para a formação do ácido trans vacênico via processo de bio-hidrogenação ruminal (BARGO et al., 2006; ELGERSMA et al., 2006). Isto resulta em menores concentrações (até 75%) de ácido alfa linolênico em fenos que silagens de gramíneas (DOREAU; PONCET, 2000; SHINGFIELD et al., 2005). Além disso, as gramíneas geralmente são colhidas mais tardiamente para fenação que para silagem, o que poderia, pelo estágio de maturação da planta, contribuir para este decréscimo de ácido alfa linolênico no feno (CHILLIARD et al., 2007). No entanto, segundo Shingfield et al. (2005), o leite de vacas que receberam feno como principal volumoso da dieta podem apresentar maiores teores de ácido linoleico e linolênico do que aqueles provenientes de vacas que receberam silagem, apesar da menor ingestão desses ácidos graxos. Segundo estes autores, isto se deve provavelmente a eficiência da transferência da dieta para o leite, que é maior no feno (29%, para o ácido linoleico, e 17%, para o ácido alfa linolênico) que na silagem (15%, para o ácido linoleico, e 3%, para o ácido alfa linolênico). Estes resultados podem ser explicados pelos resultados encontrados por Doreau et al. (2005), em ovinos, onde a bio-hidrogenação ruminal foi menor para o feno que para gramíneas frescas ou silagens de gramíneas.

O leite de vacas, cujo principal volumoso ofertado são forrageiras frescas, apresenta maior relação de AGI e AGS, e maiores concentrações totais de AGPI e de CLA (em

particular o ácido rumênico), quando comparados com o leite de vacas onde o principal volumoso disponibilizado são forrageiras conservadas (ELGERSMA et al., 2006).

Quando o processo de fenação é realizado sob abrigo de luz, às perdas por oxidação lipídica são diminuídas, e a concentração de ácido alfa linolênico continua alta, permitindo a produção de leites com teores semelhantes ou até superiores deste ácido graxo que pastagens, e maiores concentrações de ácido trans vacênico e ácido rumênico que silagens de gramíneas (CHILLIARD et al., 2001).

Na maior parte do mundo, em que as vacas de leite são mantidas em sistemas confinados, a silagem de milho tem sido o primeiro, ou o segundo volumoso em quantidade na dieta, salvo nos EUA, que este alimento divide espaço com outras silagens e fenos.

A silagem de milho (que geralmente contém 30 a 40% de grãos) apresenta altos teores de ácido linoleico e oleico e baixo em ácido alfa linolênico. Chilliard et al. (2001) em revisão sobre o efeito de diferentes fontes dietéticas na composição de ácidos graxos do leite, compararam dietas à base de silagem de milho (seis ensaios com mais de 60% de silagem de milho) com silagens de gramíneas (cinco ensaios com mais de 58% de silagens de gramíneas), verificaram aumento na relação n6:n3 no leite de vacas que receberam silagem de milho como base da dieta, no entanto não observaram alterações de ácido oleico e esteárico (18:0).

Em comparação com uma dieta à base de feno, uma dieta rica em silagem de milho e concentrado diminui a concentração de gordura no leite e ácidos graxos de cadeia ramificada, como, 18:2 t11, c15 e alguns isômeros de CLA (18:2n5 t11, c13; 18:2n5 - t11, t13; 18:2n4 - t12, t14) e aumenta a concentração de ácido 7-octadecenoico (18:1n7 - c11), ácido 6-octadecenoico (18:1n6 - c12) e alguns isômeros de CLA (18:2n9 - t7, c9; 18:2n8 - t8, c10; 18:2n7 - t9, c11 e 18:2n6 - t10, c12) (ROY et al., 2006). Parte deste aumento ou decréscimo deve-se ao fato que estes isômeros são intermediários da bio-hidrogenação ruminal do ácido linoleico ou ácido linolênico e, provavelmente são resultados das diferenças dietéticas destes ácidos graxos.

### 2.3.3 Efeito da relação volumoso:concentrado sobre o perfil de ácidos graxos do leite

O efeito do aumento na porcentagem de concentrado na dieta sobre o conteúdo de gordura do leite é dependente da relação volumoso:concentrado. Quando o concentrado não excede 50-60% da dieta o teor de gordura não varia significativamente, ao passo que uma diminuição significativa é observada com valores acima de 60% (LOCK; SHINGFIELD, 2004).

Os efeitos sobre a composição de ácidos graxos do leite também varia de acordo com esta relação. Isto se reforça nos resultados reportados por Bargo et al. (2006), que em ensaio com animais em pastejo, quando aumentou-se o teor de concentrado de 0 para 1 kg/4kg de leite, estes autores observaram como principais efeitos, o aumento de ácidos graxos de cadeia curta e no total de AGS e decréscimo de ácidos graxos de cadeia longa, isômeros trans do 18:1, e ainda do ácido rumênico. Por outro lado, em experimento com animais submetidos a uma dieta onde o principal volumoso era o feno, com um aumento de 35 para 65% de concentrado na dieta, os autores relataram aumento em todos os isômeros trans do 18:1, do ácido rumênico e diminuição de AGS (LOOR et al., 2005).

Parece que com o aumento de concentrado em relação ao volumoso na dieta, porém sem exceder os valores limites desta relação, há um favorecimento do processo de bio-hidrogenação ruminal e da síntese “de novo ácidos graxos”, aumentando os ácidos graxos de cadeia curta e os AGS, com uma diminuição nos isômeros trans do 18:1 e do ácido rumênico. Por outro lado, quando há um aumento de concentrado na dieta, de maneira que comprometa os limites da relação volumoso:concentrado, ocorre claramente um decréscimo da bio-hidrogenação ruminal dos ácidos graxos de cadeia longa e uma inibição na etapa final deste processo, onde os isômeros trans do 18:1 são convertidos a ácido esteárico (18:0), resultando na depressão da gordura do leite e de um aumento nos teores de ácidos graxos trans, de ácido linoleico e ácido rumênico e mitigação nos teores de AGS entre 14 a 18 carbonos.

Griinari et al. (1998), demonstraram que o aumento de 18:1 trans 10 na gordura do leite estava associado a sua depressão e que, tanto o baixo pH ruminal quanto o alto consumo de AGI, eram necessários para se obter a formação deste isômero. Além disso, sabe-se hoje, que o ácido trans-10, cis-12-octadecadienoico (isômero do CLA) é poderoso inibidor da síntese de gordura no leite, no entanto, ele está presente em concentrações muito baixas, e alterações em seus valores não estão associadas ao grau de depressão.

Evidencia-se, pela grande quantidade de isômeros de ácidos graxos trans formados no rúmen, que mais de um tipo pode estar associado à depressão da gordura do leite, e que este processo está relacionado com o fornecimento de rações com baixo teor de fibra, alto teor de amido e à ingestão de grande quantidade de gorduras insaturadas, ocasionando um decréscimo do pH e conseqüente mitigação na bio-hidrogenação ruminal.

Assim, a manutenção do baixo pH no rúmen, mediante dieta com alto concentrado, pode ser usada como alternativa para elevar-se a potencialidade nutracêutica do leite bovino, pois inibiria a bio-hidrogenação ruminal, aumentando-se o conteúdo de ácidos graxos desejáveis.

## 2.4 Agrotóxicos e contaminação do leite

Agrotóxicos, defensivos agrícolas, praguicidas, pesticidas e biocidas, são denominações dadas a substâncias químicas que são utilizadas para prevenir, destruir ou controlar alguma peste, incluindo vetores de doenças humanas ou de animais e/ou espécies não desejadas de plantas ou animais que causam danos ou interferem na produção, estocagem, transporte ou comercialização de alimentos. Estão incluídos também neste conceito os reguladores de crescimento de plantas, desfolhantes, desseccantes ou agentes para prevenção da queda prematura dos frutos, ou ainda, substâncias utilizadas antes e após a colheita, para prevenir a deterioração durante a estocagem ou transporte (WHO, 2009).

A Lei Federal Brasileira nº 7.802, de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002, define agrotóxicos e afins como “produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores de crescimento” (BRASIL, 2002).

A utilização dos agrotóxicos na agricultura iniciou-se na década de 1920, época em que eram pouco conhecidos quanto a sua toxicologia. O seu uso tornou-se mais importante para a humanidade no decorrer dos anos trinta, quando foram patenteados, o herbicida dinitro-ortocresol na França (1932) e nos EUA (1934), o primeiro fungicida do grupo dos ditiocarbamatos, o Thiram (TRAPÉ, 1995).

Atualmente existem mais de 800 compostos, pertencentes à cerca de 100 classes químicas diferentes, registrados como ingredientes ativos de produtos comercializados como agrotóxicos no mundo todo. Se forem incluídos metabólitos destes compostos, o número supera 1500 substâncias. A aplicação de praguicidas aumentou em 50% no mundo, desde 1950. Atualmente, a produção industrial de agrotóxicos é de  $2,5 \times 10^9$  kg ao ano (KOVALCZUK et al., 2008; CAJKA et al., 2008).

Os pesticidas normalmente são classificados de acordo com sua toxicidade, organismo alvo e estrutura química.

Em relação à toxicidade intrínseca de cada composto, são classificados de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO). Esta toxicidade é expressa pela dose letal 50

(DL50) aguda, por via oral ou dérmica para ratos. A DL50 é o valor estimado da dose necessária, em  $\text{mg Kg}^{-1}$  de peso corpóreo, que irá levar a morte de 50% dos animais em experimentação (HENAO; COREY, 1986; ALBERT, 1988; FAIT, 1994).

Quanto ao organismo alvo, os agrotóxicos podem ser classificados em inseticidas (combatem os insetos), herbicidas (combatem as plantas daninhas), fungicidas (combatem os fungos), acaricidas (combatem os ácaros), moluscocidas (combatem os moluscos), rodenticidas (combatem os roedores), bactericidas (combatem as bactérias), entre outros (BAIRD; CANN, 2011).

Outra classificação dada aos pesticidas refere-se a sua estrutura química. Nesse sentido, são subdivididos em organoclorados, organofosforados, carbamatos, triazinas e piretróides. Na classe dos organofosforados destacam-se principalmente os inseticidas e alguns herbicidas, entre os carbamatos, os herbicidas e fungicidas, nas triazinas os herbicidas e nos piretróides os inseticidas (McKINLAY et al., 2008).

Organofosforados podem ser compostos fosforados derivados do ácido fosfórico ou pirofosfórico; tiofosforados derivados do ácido tionofosfórico ou ditionofosfórico; ou clorofosforados, quando possuem átomos de cloro em sua molécula. Os carbamatos são derivados do ácido carbâmico ou do ácido N-metilcarbâmico (DELL'OMO et al., 2003).

Estas classes são inibidoras da enzima acetilcolinesterase (agentes anticolinesterásicos), que é importante para o adequado funcionamento do sistema nervoso, pois sua inibição resulta em aumento da atividade da acetilcolina (HEINZOW; ANDERSEN, 2006).

Organofosforados e carbamatos são amplamente utilizados no controle de pragas em plantações. O uso inadequado desses compostos podem deixar resíduos na alimentação animal e, quando metabolizados, podem contaminar produtos destinados ao consumo humano. Nesse sentido, diversos relatos evidenciam a presença de resíduos destes agrotóxicos no leite (NERO et al., 2004; PAGLIUCA et al., 2006; NERO et al., 2007; MELGAR et al., 2010). Na Europa, Pagliuca et al. (2006) e Melgar et al. (2010) encontraram respectivamente 35% e 8,7% de amostras de leite contaminadas com organofosforados. Em estudos brasileiros, Nero et al. (2004) e Nero et al. (2007), acharam respectivamente 74,4% e 93,8% das amostras com algum resíduo de organofosforados e/ou carbamatos.

Os maiores índices encontrados no leite brasileiro refletem a falta de rigidez do seu Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da ANVISA, onde no seu último relatório, publicado em 2012, foram analisadas apenas 13 alimentos (leite e

derivados não foram contemplados), ou seja, cerca de 5% do que é avaliado pelos EUA (Food and Drug Administration-FDA) e Europa (European Food Safety Authority-EFSA).

Os agrotóxicos organoclorados foram banidos do comércio mundial a partir da década de 60. Apesar de sua alta persistência no meio ambiente (MOR et al., 2010; GOVARTS et al., 2012), em estudo realizado por Melgar et al. (2010) já se observa índices bastante baixos de organoclorados (8,7%). Isto evidencia uma substituição destes compostos, principalmente por organofosforados, sendo um indício que o processo de controle e exclusão dos organoclorados do comércio mundial de agrotóxicos (GOVARTS et al., 2012), começa a diminuir a sua bioacumulação na cadeia alimentar.

Os Piretróides são uma das classes mais empregadas de inseticidas. Após o rígido controle dos organoclorados em grande parte do mundo, a utilização deste composto tornou-se bastante importante no controle de vetores de doenças em regiões de clima tropical (NEAL et al., 2010).

Os efeitos da intoxicação por piretróides estão relacionados à sua estrutura química. Os inseticidas sintéticos podem ser estruturalmente divididos em dois grupos segundo a ausência (tipo I) ou presença (tipo II) de um grupamento ciano (-CN) na porção fenoxibenzil (LATUSZYNSKA et al., 2003). Esta classe de agrotóxicos exerce nos insetos e vertebrados um efeito significativo sobre os canais de sódio neural, interferindo na sua abertura e fechamento, prolongando o tempo de entrada dos íons  $\text{Na}^+$  para o interior da célula (DEJONCKHEERE et al., 1981; NARAHASHI, 1996; SPENCER et al., 2001). Em concentrações relativamente altas, os piretróides do tipo II agem sobre o complexo receptor inotrópico do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), ou seja, ligam-se aos receptores do GABA bloqueando os canais de cloro e sua ativação. O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC) de vertebrados, e a ausência de inibição sináptica leva a uma hiperexcitabilidade do SNC (MANNA et al., 2004).

Porém, os piretroides apresentam baixa toxicidade em mamíferos, baixo impacto ambiental e efetividade contra um largo espectro de insetos, necessitando baixas concentrações de aplicação para exercerem sua função. Assim, os piretróides tiveram seu uso difundido como alternativa aos organoclorados, muito persistentes no ambiente, aos carbamatos e organofosforados que são, em sua maioria, muito tóxicos, especialmente ao SNC (NARAHASHI, 1996). Nesse sentido, os piretróides são, atualmente, uma das classes de inseticidas mais utilizadas na pecuária leiteira (MEDEIROS et al., 2009), o que pode contribuir ainda mais para a contaminação do leite de consumo.



A descoberta dos inseticidas do grupo dos neonicotinoides foi um marco no controle químico a partir de agrotóxicos, pois representa o principal inseticida lançado nas últimas três décadas (NAUEN; BRETSCHEIDER, 2002). Estes pesticidas atuam no SNC dos insetos, como agonistas da acetilcolina nos receptores nicotínicos pós-sinápticos (NAUEN et al., 2001). Porém, é importante ressaltar a alta seletividade deste composto à classe Insecta, não sendo prejudicial aos mamíferos (TOMIZADA; CASIDA, 2005).

Assim, é de extrema importância ter conhecimento sobre os efeitos de tratamentos térmicos industriais e, sobre o limite máximo de resíduos (LMR) de diferentes agrotóxicos, para obtermos um leite mais adequado à alimentação humana.

#### 2.4.1 Efeitos de tratamentos térmicos industriais na presença de resíduos de agrotóxicos no leite

Por ser um alimento bastante perecível e de fácil deterioração, o leite de consumo é submetido a tratamentos térmicos industriais (pasteurização e ultrapasteurização), a fim de estender o seu período de conservação, porém não é conhecido se estes processos conferem segurança para consumo quanto à presença de agrotóxicos, já que em ensaio realizado com este objetivo, as amostras pasteurizadas e ultrapasteurizadas não eram referentes ao leite cru inicialmente analisado (KAMPIRE et al., 2011), portanto não é adequado fazer afirmações quanto à eficiência dos distintos tratamentos térmicos, pois estes resultados podem ser decorrentes das particularidades de manejos de produção e momento da coleta.

Melgar et al. (2010) pesquisaram a presença de resíduos de organofosforados empregados no controle de ectoparasitas em gado ou na ração animal, em 312 amostras, dividindo-se em 70 de alimentos infantis à base de leite e 242 de leite “in natura”, sendo que nas amostras de alimentos infantis, que utilizavam leites submetidos a tratamentos térmicos industriais, não foram detectados resíduos de agrotóxicos.

Da mesma maneira, Kampire et al. (2011) analisaram 50 amostras de leite cru e 47 de leite pasteurizado, constatando-se que a pasteurização é capaz de degradar e/ou eliminar os resíduos de organoclorados no leite.

Por outro lado, Mezcua et al. (2007) analisaram 25 amostras de leite em pó, nas quais foram detectados resíduos de  $\alpha$ -Endosulfan,  $\beta$ -Endosulfan, Chlorphyrifos e Bifenthrin, o que pode estar relacionado a uma contaminação pós tratamento térmico do leite, já que outros resultados mostram a capacidade de eliminação destes resíduos de pesticidas com a pasteurização inicial do leite.

#### 2.4.2 Limite máximo de resíduos (LMR) de agrotóxicos no leite

A legislação busca assegurar, pelo estabelecimento de limites máximos de resíduos (LMRs), que os consumidores não sejam expostos a esses praguicidas em concentrações potencialmente perigosas à sua saúde (KENNEDY et al., 2000).

Em nível mundial, o *Codex Alimentarius*, organismo vinculado à FAO/WHO e a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (*European Food Safety Authority*, EFSA) estabelecem os limites máximos de resíduos de agrotóxicos em leite (Codex Alimentarius, 2015; EFSA, 2015). Estes limites são estabelecidos para proteger o consumidor, devido a exposição crônica diária, do risco potencial que estes agrotóxicos podem causar em decorrência da aplicação agrícola. Em função disto, vários países possuem programas de monitoramento dos níveis de resíduos de agrotóxicos, a fim de garantir a segurança alimentar e ambiental.

Com a finalidade de verificar a presença de resíduos de agrotóxicos, medicamentos veterinários, poluentes ambientais e contaminantes inorgânicos no leite o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento instituiu pela portaria ministerial nº 51, de 06 de maio de 1986, o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (PNCRC), a qual foi alterada pela instrução normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999.

Contribuindo para esse controle, cabe à ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), órgão do Ministério da Saúde, a fiscalização do produto final nos pontos de venda direta ao consumidor. O PNCRC (BRASIL, 2010), para produtos de origem animal, estabelece os LMRs e os agrotóxicos a serem monitorados em leite.

Na comunidade europeia são monitorados 393 LMR, número expressivamente maior de agrotóxicos legislados, quando comparado aos outros países do mundo, principalmente ao Brasil.

### 3 DESENVOLVIMENTO

#### 3.1 Descrição do desenvolvimento da tese de doutorado:

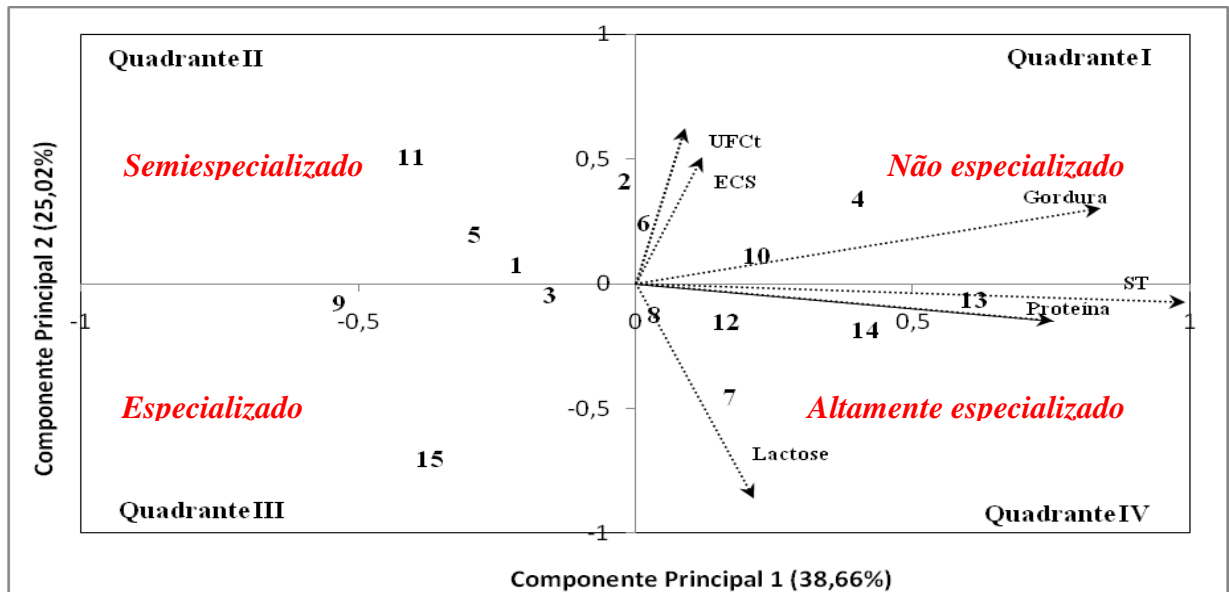
A primeira etapa do estudo possibilitou a confecção do manuscrito intitulado “Formação de sistemas homogêneos de produção a partir da composição química e microbiológica do leite”.

Essa fase consistiu na análise de dados obtidos a partir de laudos oficiais emitidos pelo Laboratório de Serviço de Análises de Rebanhos Leiteiros (SARLE), órgão credenciado junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os quais, após edição, continham 44.089 registros relativos à qualidade do leite, de 1.541 unidades produtoras de leite (UPL), referentes a 15 municípios, localizados no Rio Grande do Sul, Brasil. Para reduzir a dimensionalidade do conjunto original de variáveis com menor perda de informação possível, procedeu-se a análise de componentes principais, seguida da análise de agrupamento das três primeiras dimensões obtidas, o que possibilitou representar a totalidade dos sistemas produtivos em distintos níveis de especialização.

Os três primeiros autovalores dos componentes principais foram significativos pelo teste da razão de verossimilhança, explicando 81,38% da variação total dos dados, no entanto, a obtenção dos distintos extratos produtivos foram centradas nos componentes principais 1 (CP1) e 2 (CP2), totalizando 63,68% (Figura 2).

Além disso, em cada UPL, foi aplicado um questionário para auxiliar na caracterização destas classes, o qual continham informações sobre a produtividade leiteira, manejo nutricional, tipo de ordenha utilizada e utilização de agrotóxicos nas etapas produtivas. Na segunda etapa do estudo, foram avaliadas doze UPL, três de cada quadrante do plano cartesiano, nas diferentes estações do ano, ou seja, representando a totalidade das heterogeneidades dos extratos produtivos frente às diversidades climáticas, as quais foram classificadas em altamente especializado, especializado, semiespecializado e não especializado (Tabela 1).

Após a obtenção dos níveis de especialização, foram desenvolvidos dois manuscritos, denominados: “Qualidade e potencial nutracêutico do leite bovino em diferentes sistemas de produção e estações do ano” e “Efeito de sistemas produtivos, estações do ano e tratamentos térmicos industriais na presença de agrotóxicos no leite do Rio Grande do Sul, Brasil”.



**Figura 2.** Localização no plano cartesiano, utilizado como critério básico para obtenção dos sistemas de produção altamente especializado, especializado, semiespecializado e não especializado.

**Tabela 1.** Características dos sistemas de produção de leite altamente especializado (AE), especializado (ES), semiespecializado (SE) e não especializado (NE).

Sistema	Localização no plano cartesiano	Produção (litros/animal/dia)	Área (ha)	Concentrado (kg/vaca/dia)	Silagem <sup>(1)</sup>	Raça	Ordenha	Local	Refrigeração	Agrotóxicos
AE	Quadrante IV	>20	>15	>10	Sim	Definida	Circuito fechado	Sala própria	Com	Utilização intensiva
ES	Quadrante III	15–20	10–15	4–10	Sim	Definida	Circuito aberto	Sala própria	Com	Utilização intensiva
SE	Quadrante II	10–15	5–10	1–4	Sim	Não definida	Balde ao pé	Galpão	Com	Utilização usual
NE	Quadrante I	5–10	1-5	<1	Não	Não definida	Balde ao pé	Galpão	Sem	Não utilizava

<sup>(1)</sup> Sim, silagem de milho como base do volumoso diário; Não, silagem de milho como parte do volumoso diário.

### **3.2 Manuscrito I:**

## **FORMAÇÃO DE SISTEMAS HOMOGÊNEOS DE PRODUÇÃO A PARTIR DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO LEITE**

**Resumo** - Objetivou-se formar sistemas homogêneos de produção a partir das variáveis químicas e microbiológicas do leite. Os dados utilizados foram de 1.541 unidades produtoras de leite (UPL), referentes a 15 municípios do Rio Grande do Sul, Brasil, totalizando 44.089 amostras analisadas. Os três primeiros autovalores dos componentes principais foram significativos pelo teste da razão de verossimilhança, explicando 81,38% da variação total dos dados. As variáveis que explicaram a variabilidade no CP1 foram gordura, proteína e sólidos totais (ST), ao passo que, no CP2 foram a lactose, contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) e no CP3 a CCS e CBT. Logo, o CP1 associou-se à qualidade química do leite, enquanto o CP2 e o CP3, à qualidade microbiológica. Com a análise conjunta das três projeções bidimensionais (CP1xCP2; CP1xCP3; CP2xCP3), possibilitou-se gradativamente, posicionar os distintos extratos produtivos quanto ao seus atributos de qualidade, identificar os pontos positivos/negativos das características microbiológicas do leite, e por último, identificar os sistemas de produção que mais se destacaram em relação aos distintos parâmetros de qualidade microbiológica. Assim, obteve-se uma redução da dimensionalidade do conjunto de 1.541 UPL em 15 sistemas de produção homogêneos, com menor perda de informação que outros resultados reportados na literatura, otimizando a utilização da base de informações mensais das indústrias lácteas, proporcionando uma metodologia para formação de sistemas homogêneos de produção de leite capaz de representar a totalidade das heterogeneidades presentes na cadeia láctea nacional.

**Palavras-chave:** análise multivariada, componentes principais, classificação hierárquica ascendente, tipologia, unidades produtoras de leite

### **Characterization of homogeneous production systems of milk through technical multivariate statistics**

**Abstract** - This study aimed to forming homogeneous production systems from chemical and microbiological variables of milk. The data used were 1,541 units producing milk (UPM), for the 15 municipalities in southern Brazil, totaling 44,089 samples analyzed. The first three eigenvalues of the main components were significant by the likelihood ratio test, explaining 81.38% of the total variation of the data. The variables that explain the variability in PC1 were fat, protein and total solids (TS), while in PC2 are lactose, somatic cell count (SCC) and total bacterial count (TBC) and CP3 SCC and TBC. Soon, the PC1 was associated with chemical milk quality, while the PC2 and PC3, the microbiological quality. With the pooled analysis of the three projections two-dimensional (PC1xPC2; PC1xPC3; PC2xPC3), if possible gradually, position the different productive statements as to their quality attributes, identify positive / negative aspects of microbiological characteristics of milk, and finally to identify production systems that stood out in relation to the different parameters of microbiological quality . Thus, there was obtained a reduction of dimensionality of the set of 1,541 UPM in 15 homogeneous production systems, with less loss of information other results reported in the literature, optimizing the use of the basic monthly data of dairies, providing a methodology for forming homogeneous production systems suitably all of the heterogeneities present in dairy production systems.

**Keywords:** multivariate analysis, principal components analysis, Hierarchical Ascendant Classification, typology, units producing milk

## Introdução

O Brasil é tradicionalmente um grande produtor de leite. A atividade que começou com características extrativistas, já ocupa posição de destaque no cenário econômico internacional, sendo o país que ocupa a quarta posição no âmbito da produção mundial, totalizando 34,1 milhões de toneladas (FAO, 2013).

Considerando o crescimento da demanda por leite no mercado externo e, a potencialidade do Brasil em atender grande parte dessa procura, torna-se de extrema importância atingir o padrão de qualidade do leite exigido internacionalmente.

Contribuindo para esta problematização, a cadeia produtiva brasileira está distribuída por todo o território nacional, com expressiva heterogeneidade de sistemas de produção em todas as unidades federativas (ALEIXO et al., 2007), representando-se por um reduzido número de produtores mais especializados (cerca de 20%) e um elevado número de pequenos produtores (cerca de 80%) (HOUSTIOU et al., 2006; YAMAGUCHI et al., 2006). Assim, conhecer essa diversidade é cada vez mais importante para se ter eficácia nas intervenções junto aos produtores rurais, e contribuir para a melhoria da qualidade do leite nacional, item inexorável a um país exportador (HOSTIOU; DEDIEU, 2012).

Com o intuito de auxiliar na definição dos preços pagos aos produtores e nas ações de assistência técnica, as indústrias laticinistas contam com uma base de informações mensais das características do leite, contemplando dois aspectos principais, um deles, é a composição centesimal, incluindo os teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST) e sólidos não gordurosos (SNG), e outro, é o aspecto higiênico-sanitário, englobando requisitos essenciais adotados internacionalmente, como a contagem de células somáticas (CCS) e a contagem bacteriana total (CBT). Entretanto, segundo Bodenmüller Filho et al. (2010), a eficiência com que essa base de informações tem sido utilizada tem esbarrado na ausência de ferramentas de análise que simplifiquem o campo de ação.

Segundo Aleixo et al. (2007), as ferramentas constituídas pelas técnicas de análise multivariada de dados, sobretudo, a análise em componentes principais combinada com a análise de agrupamento, possuem grande potencial para a elucidação destes problemas.

A análise dos sistemas de produção de leite e sua tipologia se tornam ferramentas indispensáveis para a atividade leiteira, simplificando o campo de visão do universo de produtores rurais e permitindo que os profissionais definam estratégias mais precisas para a melhoria da qualidade desta matéria-prima.

Diante da escassez de metodologias capazes de formar sistemas homogêneos de produção quanto à qualidade química e microbiológica do leite, objetivou-se agrupar unidades homogêneas de produção através de técnicas estatísticas multivariada, a partir de variáveis químicas e microbiológicas do leite, com a finalidade de auxiliar no direcionamento à assistência técnica ao produtor, para melhorar a qualidade do leite nacional.

### **Material e Métodos**

Os dados utilizados foram obtidos a partir dos laudos oficiais emitidos pelo Laboratório de Serviço de Análises de Rebanhos Leiteiros (SARLE), órgão credenciado junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os quais continham 54.696 registros de gordura, proteína, lactose, sólidos não gordurosos (SNG) e sólidos totais (ST), contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT), obtidos de amostras coletadas mensalmente, em tanque de expansão de 1.706 unidades produtoras de leite (UPL), durante o período de junho de 2008 a dezembro 2011. Com a finalidade de refletir a uniformidade particular de cada UPL foram excluídos da análise estatística os resultados referentes aos tanques de expansão coletivos. Para obtenção da consistência do banco de dados, os registros foram considerados em classes mensais e, excluídos do arquivo, propriedades com menos de quatro controles e com três desvios-padrão acima ou abaixo da média da característica no mês. Após as restrições, foram utilizados nas análises estatísticas 44.089 registros de 1.541 UPL, referentes a 15 municípios, localizados no Rio Grande do Sul, Brasil.

Com o intuito de linearizar os dados, a CCS foi transformada em escore linear de células somáticas  $ECS = [\log_2(CCS/100)] + 3$  (SHOOK, 1993) e a CBT transformada pelo logaritmo natural da CBT normal ( $\log$  da CBT).

A gordura, proteína, lactose, ST e SNG foram determinados por espectrofotometria com radiação infravermelha utilizando equipamento Bentley<sup>®</sup> 2000 (Bentley Instruments), enquanto a CCS e a CBT por citometria de fluxo utilizando equipamento Somacount<sup>®</sup> 300 (Bentley Instruments) e Bactocount<sup>®</sup> IBC (Bentley Instruments), respectivamente.

Para reduzir a dimensionalidade do conjunto original de variáveis com menor perda de informação possível, procedeu-se a análise de variância multivariada pelo procedimento GLM e o comando MANOVA, conforme o modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu_k + H_{ik} + e_{ijk}$$



em que  $Y_{ijk}$  = valor observado da  $k$ -ésima variável, sob a  $i$ -ésima UPL e  $j$ -ésima repetição;  $\mu_k$  = média geral da  $k$ -ésima variável;  $H_{ik}$  = efeito fixo da  $i$ -ésima UPL na  $k$ -ésima variável; e  $e_{ijk}$  = efeito aleatório associado à observação  $Y_{ijk}$ .

As variáveis empregadas na análise multivariada foram gordura, proteína, lactose, ST, log da CBT e ECS. As demais variáveis foram eliminadas do modelo devido às altas correlações existentes entre as mesmas, formando matrizes de dispersão singulares e causando problemas de multicolinearidade ou dependência linear entre as variáveis.

Na análise multivariada para testar a hipótese de que os vetores de médias dos tratamentos (UPL) fossem nulos, ou seja,  $H_0 : \mu_1 = \mu_2 \dots = \mu_{1541}$ , foi realizado o teste de Wilks como segue:

$$\Lambda = \frac{|E|}{|A|}$$

em que:  $|E|$  é o determinante da matriz **E** referente a soma de quadrados e produtos residuais;  $|A|$  é determinante da matriz **A** referente a soma de quadrados e produtos totais.

Após, foi efetuada a análise de componentes principais (*Principal Component Analysis - PCA*), sendo uma técnica de análise multivariada que consiste em redistribuir a variação observada nas variáveis (eixos originais), com o intuito de obter um conjunto ortogonal de eixos não correlacionados, com a menor perda de informação possível, além de permitir o agrupamento de acordo com a similaridade, mediante o exame visual das dispersões gráficas. Salienta-se que a unidade de medida dos componentes principais é uma combinação linear das unidades de medida de cada variável observada, sendo, na maioria das vezes, sem sentido. Por isso, para melhor interpretação dos resultados, foi feita a padronização dos dados de forma que apresentassem média zero e variância igual a um, ou seja, com base na matriz de correlação. A análise de componentes principais foi executada com o procedimento PRINCOMP.

A etapa seguinte do trabalho consistiu em utilizar as três primeiras dimensões dos componentes principais para agrupar as unidades de produção por classificação hierárquica ascendente (análise de agrupamento), utilizando o algoritmo hierárquico aglomerativo de Ward como método de agrupamento e a distância euclidiana quadrática como medida de dissimilaridade. O método de Ward ou da mínima variância, considera a união de todos os possíveis pares de agrupamento e a fusão de dois grupos hipotéticos que resulte no menor incremento da soma de quadrados dos desvios.

A distância euclidiana quadrática entre dois pontos ( $d_{ij}$ ) é definida por:

$$d_{ij} = \sum_{k=1}^p (x_{ik} - x_{jk})^2$$

onde,  $x_{ik}$  denota o  $i$ -ésimo valor do vetor de dados no  $k$ -ésimo agrupamento; e  $x_{jk}$  corresponde ao  $j$ -ésimo valor do vetor de dados no  $k$ -ésimo agrupamento do espaço  $p$ -dimensional.

Com o auxílio estatístico do coeficiente de correlação cofenética (CCC), pseudo-F e pseudo- $t^2$ , foram determinados o número ideal de grupos entre as UPL, expressando-os em relação aos três primeiros componentes principais. A análise de agrupamento foi executada com o procedimento PROC CLUSTER.

As análises estatísticas foram executadas no aplicativo SAS<sup>®</sup> *System for Windows*<sup>™</sup> versão 9.0 (SAS Institute Inc., Cary - NC, USA).

### Resultados e Discussão

Na análise de variância multivariada houve diferença ( $P < 0,05$ ) entre os vetores de médias para as UPL, tanto pelo teste Wilks quanto pelos testes Pillai, Hotelling-Lawley e Roy. Os três primeiros autovalores foram significativos pelo teste da razão de verossimilhança, sendo que o primeiro autovalor explicou 38,66%, o segundo 25,02% e, o terceiro 17,70%. A partir do espaço tridimensional dos componentes principais, as unidades de produção foram agrupadas por classificação hierárquica ascendente (Cluster Analysis), permitindo-se constatar que o número ideal de grupos formados entre as 1.541 UPL foram quinze. Com a utilização concomitante destas ferramentas de análise multivariada, dois novos conjuntos de dados foram gerados, os escores, que trazem informações sobre os grupos, e as cargas que mostram as correlações existentes entre as variáveis e os componentes principais, sendo que a representação destes dois conjuntos de dados foi realizada através de três gráficos bidimensionais (CP1xCP2, CP1xCP3 e CP2xCP3) (Figura 1).

Os componentes principais 1 (CP1) e 2 (CP2), totalizaram uma variabilidade acumulada de 63,68%, evidenciando-se uma redução da dimensionalidade do conjunto original de variáveis com menor perda de informação que outros resultados da literatura, como os reportados por Betancourt et al. (2005), Aleixo et al. (2007) e Bodenmüller filho et al. (2010), que encontraram para os dois primeiros componentes principais uma variabilidade

acumulada de 45,00%, 45,70% e 56,51%, respectivamente. Porém, estes autores centraram suas discussões nos dois primeiros componentes principais, o que pode omitir muitas informações importantes sobre os agrupamentos formados, já que segundo Vicini (2005), o conjunto dimensional utilizado deve acumular uma porcentagem de variância explicada igual ou superior a 70%. Assim, neste estudo as considerações serão em relação aos três primeiros, totalizando-se 81,38% da variabilidade dos dados.

Através da inspeção gráfica visual e conforme Smith et al. (2002), o ângulo entre os vetores das cargas explica correlações existentes entre as variáveis, ou seja, se este for próximo à zero, a correlação é positiva, caso contrário, se estiver próximo de 180°, a correlação será negativa e, finalmente, se o ângulo formado for próximo de 90°, estas variáveis são pouco relacionadas.

Dessa maneira, através da primeira representação bidimensional, evidencia-se que a CCS e a CBT estão diretamente correlacionadas entre si e, por sua vez, inversamente correlacionadas com a lactose (Figura 1). Do mesmo modo, Vargas et al. (2014) e Vargas et al. (2013) observaram este mesmo comportamento para a variável lactose, à medida que se elevaram os valores de CCS e CBT, respectivamente. Em termos de qualidade higiênico-sanitária do leite, do ponto de vista legal e prático, consideram-se dois requisitos essenciais adotados internacionalmente, a CCS e CBT, porém a alta correlação negativa encontrada entre estes indicadores microbiológicos e a lactose, pode ser resultante de distúrbios da glândula mamária, ocorrendo menor biossíntese desse constituinte, ou aumento da permeabilidade da membrana que separa o leite do sangue, ocasionando perda de lactose para corrente sanguínea e ainda, por ação direta destes patógenos mamários que utilizam como principal substrato, este carboidrato (VARGAS et al., 2013; VARGAS et al. 2014). Portanto, além da CCS e CBT, a lactose pode ser considerada uma variável indicativa da qualidade sanitária do leite.

A interpretação de cada componente principal é feita, verificando-se o grau de importância ou influência que cada variável tem sobre o componente. Dessa maneira, nas dimensões do plano cartesiano, as variáveis que explicaram a variabilidade no eixo x (CP1) foram gordura ( $r=0,84$ ;  $P<0,001$ ), proteína ( $r=0,75$ ;  $P<0,001$ ) e ST ( $r=0,99$ ;  $P<0,001$ ), ao passo que as variáveis que explicaram a variabilidade no eixo y (CP2) foram a lactose ( $r=-0,86$ ;  $P<0,001$ ), CCS ( $r=0,50$ ;  $P<0,001$ ) e CBT ( $r=0,62$ ;  $P<0,001$ ) e do eixo z (CP3) a CCS ( $r=0,78$ ;  $P<0,001$ ) e CBT ( $r=-0,67$ ;  $P<0,001$ ). Logo, a partir das correlações existentes, pode-se inferir que o primeiro componente principal (eixo x) está associado à qualidade química do leite, enquanto o segundo (eixo y) e o terceiro (eixo z) com a qualidade microbiológica (Figura 1).

Assim, o primeiro (CP1xCP2) e o segundo plano cartesiano (CP1xCP3), que explicam em maior proporção a variabilidade dos dados (63,68% e 56,36%, respectivamente), possibilitaram situar os agrupamentos em relação aos distintos parâmetros de qualidade do leite, ou seja, em ambas as projeções bidimensionais os grupos 4, 6, 7, 8, 10, 12, 13 e 14 estão localizados no quadrante I e IV, e os 1, 2, 3, 5, 9, 11 e 15 no quadrante II e III, portanto apresentam respectivamente os maiores e menores valores de gordura, proteína e ST (Figura 1). Entretanto, nenhum dos grupos formados está em desconformidade com as normas regulatórias de qualidade química do leite instaurada pela Instrução Normativa Nº 62 (IN 62), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Tabela 1).

Quanto aos indicadores de qualidade microbiológica, ressalta-se a correlação diferencial existente entre a variável CBT com o CP2 e CP3, onde com o primeiro ela está diretamente correlacionada ( $r=0,62$ ;  $P<0,001$ ) e com o segundo inversamente ( $r=-0,67$ ;  $P<0,001$ ). Assim, através da análise conjunta destes planos bidimensionais, podem-se discriminar os pontos positivos e negativos da qualidade microbiológica dos distintos extratos produtivos formados, tornando-se o direcionamento da assistência técnica mais específico, o que culminaria em resultados mais satisfatórios, quando comparados a outros estudos reportados (BETANCOURT et al., 2005; ALEIXO et al., 2007; BODENMÜLLER FILHO et al., 2010), que consideraram para tal tomada de decisão, somente o primeiro plano cartesiano.

Observa-se no CP1xCP2 que os agrupamentos situados no primeiro (4, 6 e 10) e segundo quadrante (1, 2, 5 e 11) apresentam qualidade microbiológica negativa, no entanto, quando dispostos no CP1xCP3, estes grupos distinguem-se quanto a negatividade dos seus padrões higiênico-sanitários, sendo os agrupamentos 1, 5, 6 e 10 considerados inferiores, pelas altas CCS (quadrantes I e II), enquanto o grupo 2, 4 e 11 pelos seus altos valores de CBT (quadrantes III e IV). Assim, aqueles que apresentam valores elevados de CCS (1, 5, 6 e 10), em nível de produtor, para obterem-se as melhorias desejadas, devem-se realizar monitoramentos periódicos e contínuos deste parâmetro em vacas individuais, pois auxiliaria na identificação dos animais responsáveis pelas altas contagens do tanque de expansão e, a partir destes resultados, direcionar-se-iam mais adequadamente as ações aos produtores.

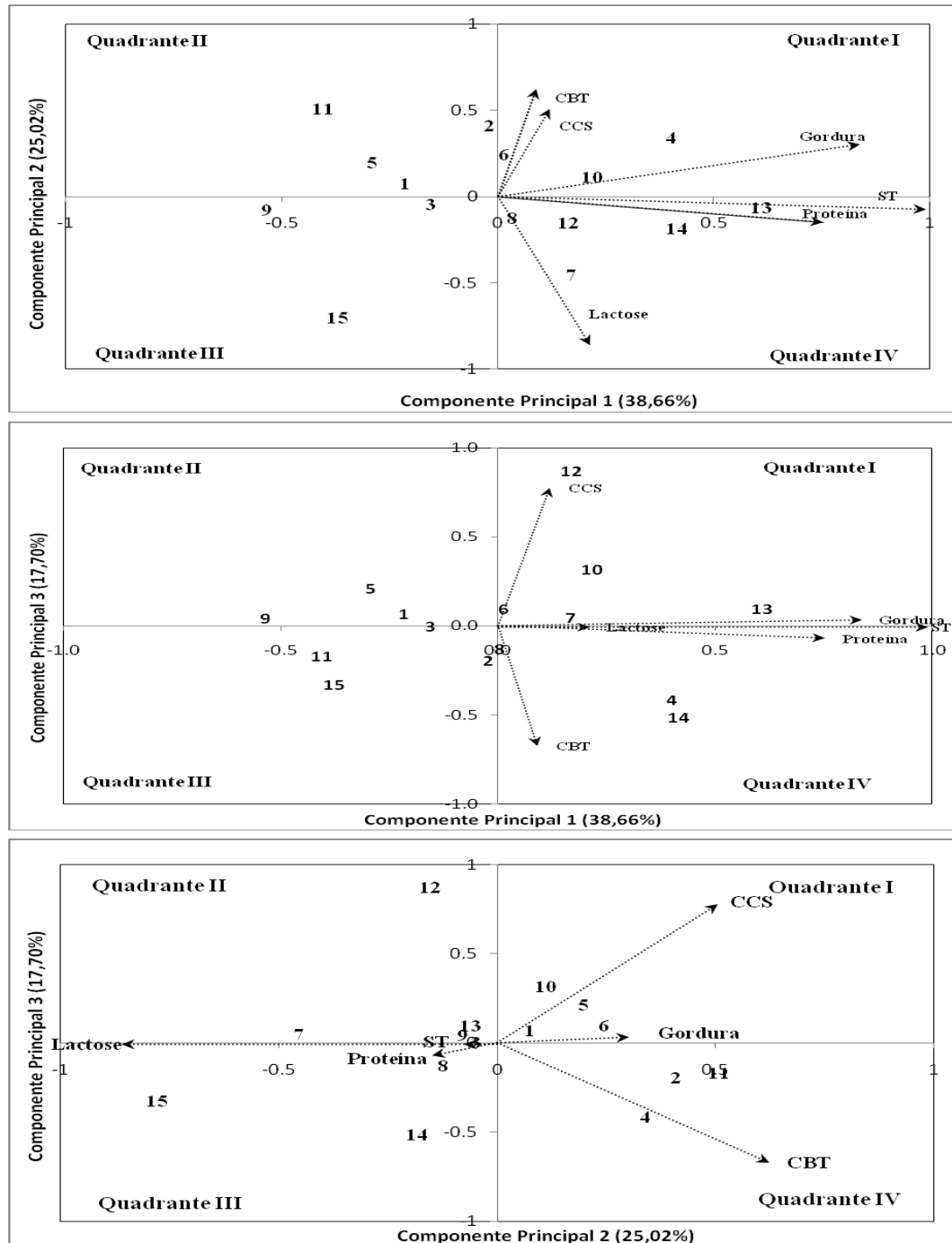
Nesse sentido, segundo Maia et al. (2013), a realização de culturas microbiológicas do leite nas propriedades com altas CCS, possibilitaria a identificação dos patógenos causadores da mastite e, conseqüentemente, auxiliaria na definição das estratégias de tratamento, no qual pode ser realizada através da secagem antecipada de vacas em condições avançadas de lactação e/ou que apresentem altas CCS durante vários meses consecutivos, já que preconiza-se o tratamento da vaca seca, pois é significativamente mais eficaz para o controle da infecção

da glândula mamária e dos patógenos associados à mastite contagiosa, que o tratamento durante a lactação, exceto em condições bastante específicas, como elevada prevalência de mastite por patógenos ambientais.

Entretanto, nos sistemas produtivos 2, 4 e 11, pelos seus altos valores de CBT, para alcançarem as melhorias desejadas, são necessários cuidados quanto à contaminação do leite pela microbiota residente no exterior do úbere. Neste sentido, Winch e Thaler Neto (2009) mostraram que a preparação do úbere antes da ordenha afeta a CBT, evidenciando-se melhores resultados para os produtores que afirmavam fazer pré-imersão das tetas em desinfetantes ( $P < 0,01$ ).

Ressalta-se que além dos efeitos positivos sobre a contaminação bacteriana, os procedimentos de preparação do úbere antes da ordenha têm efeito importante sobre a ocorrência de novas infecções intramamárias, visto que, o risco destas está diretamente associado com a intensidade do efetivo microbiano da extremidade do teto. Além disso, são necessários cuidados quanto à higiene pessoal e treinamento do ordenhador e, com a água que, por sua intensa utilização nas atividades de ordenha, pode também constituir expressiva fonte de bactérias contaminantes do leite. Assim, nas UPL com altas CBT seriam necessárias análises de qualidade da água, para rastrear o possível aumento da proliferação bacteriana do leite.

Os agrupamentos localizados nos quadrantes III (3, 9 e 15) e IV (7, 8, 12, 14 e 13) na projeção bidimensional CP1xCP2, destacam-se pela sua qualidade microbiológica positiva, entretanto discriminam-se quanto a estes parâmetros quando dispostos no CP1xCP3, destacando-se pelos reduzidos valores de CCS, os grupos 8, 14 e 15 (quadrantes III e IV) e, menores de CBT, os grupos 3, 7, 9, 12 e 13 (quadrantes I e II). Entre estes, ao avaliar a projeção bidimensional CP2xCP3 (explica 42,72% da variabilidade dos dados), que retrata unicamente a qualidade microbiológica do leite, observa-se que o grupo 12 e 15 são os que mais se diferenciam em relação aos outros extratos produtivos e, esta distinção deve-se ao primeiro, compreendendo 105 UPL, possuir os menores valores de CBT (maiores escores em relação ao CP3) e o segundo, totalizando 35 UPL, os de CCS (menores escores em relação ao CP2). Portanto, estes extratos produtivos poderiam ser utilizados como referencial positivo para as ações de assistência técnica ao produtor de leite, com a finalidade de melhorar os altos valores de CCS e CBT evidenciados neste estudo.



**Figura 1.** Três projeções bidimensionais (CP1xCP2, CP1xCP3 e CP2xCP3) dos “escores” dos diferentes grupos formados na análise de agrupamento e as “cargas” (correlações existentes entre as variáveis e os componentes principais) das variáveis gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST), escore linear de células somáticas (ECS) e o logaritmo natural da contagem bacteriana total (log da CBT).

Contribuindo para essa problematização, na avaliação da concordância dos parâmetros higiênico-sanitários com a norma vigente e suas gradativas modificações previstas, observa-se

que todos os agrupamentos estão em desacordo com o limite de CCS (500.000 céls mL<sup>-1</sup>) e/ou CBT (300.000 UFC mL<sup>-1</sup>) atuais e, ainda com a última estratificação da IN62, que entrará em vigor a partir de 30 de julho de 2016, onde os parâmetros brasileiros alcançariam os limites propostos por países de destaque na cadeia láctea mundial, como os países membros da União Europeia (UE), Nova Zelândia e Austrália, onde adotam o extremo de 400.000 céls mL<sup>-1</sup> referente a CCS e, 100.000 UFC mL<sup>-1</sup>, para CBT (BULLETIN, 2006). Ademais, é importante destacar, que foram encontrados seis (2, 4, 5, 6, 10 e 11) e treze grupos (1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 e 15), respectivamente, acima dos limites propostos pela extinta Instrução Normativa n°51 (IN51), de 750.000 céls mL<sup>-1</sup> e 750.000 UFC mL<sup>-1</sup> (Tabela 1).

**Tabela 1.** Número de produtores (N° de produtores) e, médias dos teores de gordura, proteína, lactose, minerais, sólidos não gordurosos (SNG), sólidos totais (ST), contagem bacteriana total (CBT) e contagem de células somáticas (CCS), com seus respectivos coeficientes de variação (CV) e desvios-padrão dos grupos formados na análise de agrupamento.

Grupo	N° de produtores	Gordura	Proteína	Lactose	Minerais	ST	SNG	CCS (céls mL <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup>	CBT (UFC mL <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>
1	127	3,46	3,01	4,32	0,94	11,74	8,27	579.000	4.426.712
2	74	3,73	3,07	4,22	0,97	11,99	8,26	792.000	5.473.356
3	74	3,48	3,04	4,41	0,95	11,87	8,40	595.000	1.239.746
4	173	3,96	3,23	4,29	1,00	12,48	8,52	894.000	4.688.176
5	70	3,38	3,00	4,33	0,94	11,65	8,26	889.000	725.000
6	203	3,61	3,08	4,32	0,97	11,98	8,37	897.000	2.580.787
7	43	3,50	3,17	4,52	0,97	12,16	8,66	385.000	2.107.026
8	144	3,55	3,10	4,37	0,97	12,00	8,44	433.000	4.623.804
9	113	3,17	2,96	4,34	0,93	11,39	8,22	547.000	2.663.781
10	89	3,62	3,15	4,40	0,98	12,15	8,53	945.000	819.000
11	123	3,51	2,96	4,18	0,94	11,58	8,08	968.000	4.370.221
12	105	3,45	3,09	4,46	0,96	11,96	8,51	628.000	528.000
13	95	3,88	3,27	4,44	1,02	12,60	8,73	677.000	1.786.089
14	73	3,88	3,23	4,44	1,00	12,55	8,67	423.000	4.114.262
15	35	3,05	3,10	4,46	0,96	11,57	8,51	184.000	3.909.601
<b>Média</b>	-	3,55	3,10	4,37	0,97	11,98	8,43	655.930	2.799.042
<b>Desvio padrão</b>	-	0,25	0,10	0,09	0,03	0,37	0,19	0,02*	0,03*
<b>CV</b>	-	7,05	3,14	2,15	2,64	3,06	2,21	5,17**	7,56**
<b>Total de observações</b>	1.541	44.089	44.089	44.089	44.089	44.089	44.089	44.089	44.089

<sup>(1)</sup>Dados desconvertidos do escore linear de células somáticas (ECS= [log<sub>2</sub>(CCS/100)]+3); <sup>(2)</sup>Dados desconvertidos do logaritmo natural da CBT normal; \*Desvio padrão dos dados transformados; \*\*Coeficiente de variação dos dados transformados.

Considerando que um dos maiores entraves ao aumento das exportações brasileiras de derivados lácteos estão relacionados à embargos higiênico-sanitários, como a qualidade microbiológica do leite, verifica-se a necessidade, ao nível industrial, de uma revisão dos componentes do sistema de pagamento por qualidade da CCS e CBT, além, em nível de

produtor, de um aumento de ações de extensão com a finalidade de elevar o grau de conhecimento e conscientização, visando uma melhoria na qualidade do leite.

Neste sentido, em nível industrial, com auxílio da localização dos agrupamentos no plano cartesiano, podem-se empregar assistências direcionadas aos produtores rurais e, facilitar a logística de captação de um leite com qualidade química e microbiológica diferenciada junto aos produtores, o que por sua vez, representaria uma diluição nos custos de produção, pois estes indicadores estão diretamente relacionados ao rendimento industrial.

### Conclusões

Os três primeiros autovalores dos componentes principais foram significativos pelo teste da razão de verossimilhança, explicando 81,38% da variação total dos dados, formando-se 15 grupos homogêneos de produção quanto à qualidade química e microbiológica do leite de 1.541 UPL, com menor perda de informação que outros resultados reportados na literatura. Esse estudo aperfeiçoou a utilização da base de informações mensais das indústrias lácteas, proporcionando uma metodologia capaz de direcionar a assistência técnica a nível de produtor e, a nível industrial, facilitar a logística de captação de um leite com qualidade química e microbiológica diferenciada.

### Referências

- ALEIXO, S.S.; SOUZA, J.G.; FERRAUDO, A.S. Técnicas de análise multivariada na determinação de grupos homogêneos de produtores de leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.6, p.2168-2175, 2007 (supl.).
- BETANCOURT, K.; IBRAHIM, M.; VILLANUEVA, C.; VARGAS, B. Caracterización del manejo productivo de sistemas lecheros en la cuenca del río Bulbul de Matiguás, **Livestock Research for Rural Development**, v.17, n.7, 2005.
- BODENMÜLLER FILHO, A.; DAMASCENO, J. C.; PREVIDELLI, I. T. S.; SANTANA, R. G., RAMOS, C. E. C. O.; SANTOS, G. T. Tipologia de sistemas de produção baseada nas características do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.8, p.1832-1839, 2010.
- BRASIL. **Instrução Normativa n. 51 de 18 de setembro de 2002**. Dispões sobre regulamentos técnicos aplicados ao leite cru refrigerado e pasteurizado. Diário Oficial da União, Brasília, 20 set. 2002. Seção 1, n. 183, p.13-22.



BRASIL. **Instrução Normativa n. 62 de 29 de dezembro de 2011.** Dispõe sobre regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, leite Cru refrigerado, leite pasteurizado e do regulamento técnico de coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. Disponível em: <[http://www.sindilat.com.br/gomanager/arquivos/IN62\\_2011\(2\).pdf](http://www.sindilat.com.br/gomanager/arquivos/IN62_2011(2).pdf)> Acesso em: 05/05/2012.

BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J.; NICOLAU, E. S.; OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, J. P.; NEVES, R. B. S.; MANSUR, J. R. G.; THOMAZ, L. W. Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. **Ciência Rural**, v.35, n.4, p.848-854, 2005.

BULLETIN of the International Dairy Federation. Payment systems for ex-farm milk. Brussels: **International Dairy Federation**, 2006. 106 p. Bulletin 403/2006.

HOSTIOU, N. J.; VEIGA, J. B.; TOURRAND, J.F. Dinâmica e evolução de sistemas familiares de produção leiteira em Uruará, frente de colonização da Amazônia brasileira. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v.44, n.2, p.295-311, 2006.

HOSTIOU, N.; DEDIEU, B. A method for assessing work productivity and flexibility in livestock farms. **Animal**, v.6, n.5, p.852-862, 2012.

MAIA, P.V.; MOLINA, L.R.; FACURY FILHO, E.J.; GONÇALVES, R.L.; MOREIRA, L.P.V.; CARVALHO, A.Ú. Vacinação com *Escherichia coli* J5 no pré-parto e ocorrência de mastite e produção de leite de vacas mestiças leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.5, p.1367-1375, 2013.

SHOOK, G.E. Genetic improvement of mastitis through selection on somatic cell count. The Veterinary Clinics of North America: **Food Animal Practice**, v.9, n.3, p.563-581, 1993.

SMITH, R.R.; MOREIRA, L.V.H.; LATRILLE, L.L. Characterization of dairy productive systems in the Tenth Region of Chile using multivariate analysis. **Agricultura Técnica**, v.62, n.3, p.35-395, 2002.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. **The SAS system for windows**. v.9.0 Cary: SAS Institute Inc., 2002.

VARGAS, D. P.; NÖRNBERG, J. L.; MELLO, R. O.; SHEIBLER, R. B.; MILANI, M. P.; MELLO, F. C. B. Correlações entre contagem bacteriana total e parâmetros de qualidade do leite. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.20, n.4, p.241-247, 2013.

WINCK, C.A.; THALER NETO, A. Diagnóstico da adequação de propriedades leiteiras em Santa Catarina às normas brasileiras de qualidade do leite. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.8, n.2, p.164-172, 2009.

YAMAGUCHI, L. C. T.; MARTINS, P. do C.; LEITE, J. L. B.; STOCK, L. A .; ZOCCAL, R.; OLIVEIRA, A. F. de. **Socioeconomia do agronegócio do leite**. In: SANTOS, C. A . dos: CARVALHO, L. de A.; CAMPOS, O . F. de; ARCURI, P. B. (Ed.). Embrapa Gado de Leite: 30 anos de pesquisa e conquistas para o Brasil. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2006. p. 193-212.

**3.3 Manuscrito II:**

**QUALIDADE E POTENCIAL NUTRACÊUTICO DO LEITE  
BOVINO EM DIFERENTES SISTEMAS DE PRODUÇÃO E  
ESTAÇÕES DO ANO**

**Resumo** – O objetivo deste trabalho foi avaliar a interação entre sistemas produtivos e estações do ano na qualidade química e microbiológica do leite bovino, além de propor um índice do potencial nutracêutico do seu perfil de ácidos graxos. Três propriedades foram avaliadas mensalmente, durante as diferentes estações do ano, em quatro graus de especialização dos sistemas de produção: altamente especializado, especializado, semiespecializado e não especializado. Os sistemas de produção e as estações do ano interferem de forma conjunta no perfil de ácidos graxos, e de forma isolada na qualidade química e microbiológica do leite. As maiores contagens de células somáticas e os menores conteúdos de proteína foram observados no verão, e o grau de especialização das unidades produtivas esteve indiretamente relacionado com a contagem bacteriana total no leite. No inverno, sistemas não especializados produziram leite com melhor índice nutracêutico, com os maiores teores de ácidos graxos poli-insaturados, ácido rumênico (CLA, 18:2n7 - c9, t11) e ácido t10,c12-octadecadienoico (CLA, 18:2n6 – t10, c12).

**Palavras-chave:** ácido linoleico conjugado, alimentos funcionais, perfil de ácidos graxos, qualidade do leite bovino.

### **Quality and nutraceutical potential of bovine milk in different production system and seasons**

**Abstract** – This objective of this work was to evaluate the interaction between production systems and seasons in the chemical and microbiological quality of bovine milk, as well as to propose a potential nutraceutical index of its fatty acid profile. Three farms were monthly assessed along the different seasons, in four specialization levels of the production systems: highly specialized, specialized, partially specialized, and not specialized. The production systems and the seasons jointly interfere in the fatty acids profile, and singly interfere in chemical and microbiological quality of the milk. The highest somatic cell count and the lowest protein content were observed in summer, and the specialization level of production units had inverse relationship with total bacterial count. During winter, not specialized systems produced milk with the best nutraceutical index, with the highest values of polyunsaturated fatty acids, rumenic acid (CLA, 18:2n7 - c9, t11) and t10, c12 – octadecadienoic acid (CLA, 18:2n6 – t10, c12).

**Keywords:** conjugated linoleic acid, functional foods, fatty acid profile, quality of cow milk.

## Introdução

O leite é produzido com expressiva heterogeneidade de sistemas de produção, em todo o território brasileiro, com menor número de produtores especializados (sistemas intensivos de produção) e elevado número de produtores com intermediária ou nenhuma especialização (sistemas extrativistas de produção). Esses sistemas diferem, principalmente, pela produtividade leiteira e pelo manejo nutricional e higiênico-sanitário adotado (GABBI et al., 2013).

É de grande relevância, para cadeia láctea mundial, identificar os sistemas de manejo e produção de rebanhos leiteiros que favoreçam a obtenção de leite com maior qualidade, ao longo das diferentes estações do ano (BODENMÜLLER FILHO et al., 2010).

Quanto à qualidade do leite, do ponto de vista legal e prático, consideram-se a composição centesimal, que inclui os teores de gordura, proteína e sólidos totais, e os aspectos higiênico sanitários, que englobam padrões internacionais relacionados, por exemplo, à contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) (VARGAS et al., 2013; VARGAS et al., 2014).

Com o maior acesso à informação sobre o papel dos alimentos na saúde, o conceito de qualidade tem-se tornado mais abrangente. Assim, uma nova classe de alimentos tem surgido, denominada de “alimentos nutracêuticos”, capazes de proporcionar benefícios à saúde do consumidor, que incluem prevenção ou tratamento de doenças (TRIPATHI, 2014).

Com foco na potencialidade nutracêutica de alguns ácidos graxos, tem-se buscado a elevação dos conteúdos de ácido rumênico (CLA, 18:2n7 - c9, t11) e ácido t10,c12-octadecadienoico (CLA, 18:2n6 - t10, c12) no leite, que podem contribuir na prevenção e combate de muitas doenças em humanos, como obesidade, doenças cardiovasculares, diabetes do tipo-2, e alguns tipos de câncer (KRATZ et al., 2013; LAHLOU et al., 2014).

Sistemas de produção e estações do ano podem interferir na qualidade química e microbiologia do leite (GABBI et al., 2013), porém, há pouca informação disponível quanto ao efeito conjunto desses fatores na qualidade e no potencial nutracêutico do leite.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da interação entre sistemas de produção e estações do ano na qualidade química e microbiológica do leite bovino, além de propor um índice de potencial nutracêutico do perfil de ácidos graxos.

## Material e Métodos

Três propriedades foram avaliadas, mensalmente, durante as diferentes estações do ano, em quatro graus de especialização dos sistemas de produção: altamente especializado, especializado, semiespecializado e não especializado (Tabela 1), tendo-se analisado um total de 144 amostras, nas 12 propriedades. As amostras foram retiradas no ano de 2012, em fazendas localizadas em municípios compreendidos desde a Região Central do Rio Grande do Sul, até o início da Serra Gaúcha. Paralelamente, foram coletadas amostras dos alimentos destinados aos animais, para sua caracterização (Tabela 2).

**Tabela 1.** Características dos sistemas de produção de leite altamente especializado (AE), especializado (ES), semiespecializado (SE) e não especializado (NE).

Sistema	Produção (L por animal por dia)	Área (ha)	Concentrado (kg por vaca por dia)	Silagem <sup>(1)</sup>	Raça	Ordenha	Local	Refrigeração
AE	>20	>15	>10	Sim	Definida	Circuito fechado	Sala própria	Com
ES	15–20	10–15	4–10	Sim	Definida	Circuito aberto	Sala própria	Com
SE	10–15	5–10	1–4	Sim	Não definida	Balde ao pé	Galpão	Com
NE	5–10	1-5	<1	Não	Não definida	Balde ao pé	Galpão	Sem

<sup>(1)</sup>Sim, silagem de milho como base do volumoso diário; Não, silagem de milho como parte do volumoso diário.

Os lipídeos foram extraídos das amostras de leite e de alimento – silagem de milho, concentrado e pastagens temperadas (aveia preta, *Avena strigosa* e azevém, *Lolium multiflorum*) e tropicais (capim sudão, *Sorghum Sudanense* e milheto, *Pennisetum glaucum*) conforme Bligh e Dyer (1959). A transesterificação e a metilação seguiram a técnica descrita por Christie (1982).

A análise cromatográfica dos ésteres metílicos dos ácidos graxos (FAME) foi conduzida em um cromatógrafo a gás Agilent Technologies®, modelo 6890 Plus<sup>+</sup>, equipado com detector de ionização de chama (GC-FID), injetor do tipo split/splitless, operando no modo split (razão 1:50), com injetor automático Agilent Technologies®, modelo G4513A e coluna capilar de sílica fundida Supelco®SP-2560 (100m x 0,25mm x 0,20µm). Os parâmetros de operação do forno do cromatógrafo gasoso (GC) foram estabelecidos após melhor condição de resolução e seletividade, principalmente em relação ao padrão interno (PI), tricosanoato de metila (23:0). Assim, a temperatura iniciou-se com uma isoterma de 60°C pelo período de 1 minuto (min), elevando-se a 15°C min<sup>-1</sup> até 170°C, mantendo-se por 15 minutos, seguindo-se por um incremento de 3°C min<sup>-1</sup> até 185°C, conservando-se por 6 minutos. As duas subsequentes rampas de temperatura caracterizaram-se respectivamente, por

uma ascensão de temperatura a  $6^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , até  $210^{\circ}\text{C}$ , fixando-se por 9 minutos e, por último, uma elevação de  $15^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , até atingir  $240^{\circ}\text{C}$ , estabelecendo-se uma isoterma com duração de 8 minutos, totalizando um tempo de análise de 57,50 minutos a uma pressão de 40 psi. A temperatura do injetor e detector foi mantida a  $250^{\circ}\text{C}$ , enquanto a vazão dos gases foi de  $1,0\text{ mL min}^{-1}$ , para o gás de arraste ( $\text{N}_2$ ),  $45\text{ mL min}^{-1}$  para o make-up ( $\text{N}_2$ ) e, 30 e  $300\text{ mL min}^{-1}$  para o hidrogênio e ar sintético da chama, respectivamente.

O volume utilizado para a injeção foi de  $1\mu\text{L}$  e as áreas dos picos dos FAME foram determinadas através do software Agilent ChemStation<sup>®</sup>, versão B.04.03. A identificação dos FAME foi realizada através da comparação dos tempos de retenção dos constituintes da amostra com uma mistura composta de 37 FAME (24056, Supelco<sup>®</sup> 37 Component FAME Mix), padrão do éster metílico do ácido trans vacênico (46905-U, trans-11-Octadecenoic methyl Ester) e ainda com uma mistura dos isômeros do éster metílico do ácido rumênico (18:2n7- c9, t11) e ácido t10,c12-octadecadienoico (18:2n6 - t10, c12) (O5632, Linoleic acid, conjugated methyl ester).

Para avaliar a resposta do DIC foi utilizada a mistura composta de 37 FAME (24056, Supelco<sup>®</sup> 37 Component FAME Mix), em concentrações conhecidas. O fator de resposta experimental (FRE) foi calculado para os FAME do padrão em relação ao PI, também presente. A solução foi injetada em 5 repetições e os FRE foram obtidos, conforme Ackman (1972), como segue:

$$\text{FRE} = \frac{A_{23:0} \cdot C_X}{A_X \cdot C_{23:0}}$$

onde,  $A_X$  = área dos ésteres metílicos dos ácidos graxos (FAME);  $A_{23:0}$  = área do tricosanoato de metila (padrão interno);  $C_{23:0}$  = concentração tricosanoato de metila (padrão interno);  $C_X$  = concentração dos ésteres metílicos dos ácidos graxos (FAME);

A determinação do FRT é baseada no fato de que o GC-FID responde proporcionalmente à porcentagem em massa relativa à cadeia carbônica de um FAME e que durante a combustão, o detector não responde “apreciavelmente” ao carbono do grupo carboxilato (COO), portanto este valor é constante para os diferentes FAME e não pode ser modificado devido a erros instrumentais ou de técnicas. OS FRT em relação ao tricosanoato de metila (23:0) foram obtidos em revisão publicada por VISENTAINER (2012), que aborda os aspectos analíticos da resposta do GC-FID para FAME em biodiesel e alimentos.

Através da relação entre o FRE e FRT, foi calculado o fator de erro (FE), que por sua vez auxiliou na decisão de escolha entre qual fator utilizar no cálculo da concentração dos ácidos graxos, ou seja, quando o FE ficar próximo da unidade, utiliza-se o FRT.

A quantificação dos ácidos graxos do leite em  $\text{mg g}^{-1}$  foi realizada em relação ao PI, tricosanoato de metila (T9900, Methyl tricosanoate), após verificação da concordância entre os FRE e FRT (Tabela 3).

Os cálculos da concentração dos ácidos graxos contidos nas amostras foram realizados conforme Simionato et al. (2010), pela equação:

$$C \left( \frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = \frac{A_X \cdot M_{23:0} \cdot F_{RT}}{A_{23:0} \cdot M_A \cdot F_{CT}}$$

onde,  $A_X$  = área dos ésteres metílicos dos ácidos graxos;  $A_{23:0}$  = área do padrão interno;  $M_{23:0}$  = massa do padrão interno adicionado a amostra (em miligramas);  $M_A$  = massa da amostra (em gramas);  $F_{RT}$  = fator de resposta teórico dos ésteres metílicos de ácidos graxos;  $F_{CT}$  = fator de conversão para expressão dos resultados em mg de ácidos graxos/g de lipídeos totais.

Por outro lado, as amostras de alimento foram expressas em porcentagem do total de ácidos graxos ( $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) (Tabela 2).

A exatidão do método cromatográfico foi verificada pela análise do material certificado BCR® - 163, adquirido do Institute for Reference Materials and Measurements da Bélgica, IRMM. O material de referência foi submetido aos mesmos procedimentos laboratoriais das amostras experimentais e o cálculo da recuperação (R) foi baseada na equação:

$$R (\%) = \frac{100 \cdot V_{EX}}{V_{ESP}}$$

onde, R (%) = Recuperação dos FAME em porcentagem;  $V_{EX}$  = valor experimental dos FAME;  $V_{ESP}$  = valor esperado dos FAME definido pelo material certificado BCR® - 163.

A identificação dos FAME foi realizada pela comparação dos tempos de retenção dos constituintes da amostra com os padrões de referência.

Os resultados da determinação dos ácidos graxos do leite foram utilizados para calcular os índices de aterogenicidade e trombogenicidade (ULBRICHT; SOUTHGATE, 1991), bem como a razão entre ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos (SANTOS-SILVA et al., 2002) e ácidos graxos desejáveis (AGD) (COSTA et al., 2008). O índice de AGD leva em consideração o somatório de ácidos graxos monoinsaturados ( $\Sigma$ AGMI), poli-insaturados ( $\Sigma$ AGPI) e o ácido esteárico (18:0), e não somente os com



reconhecido potencial nutracêutico. Portanto, este estudo propõe uma equação com ácidos graxos que possuam esse potencial, denominada de índice nutracêutico do leite bovino (IN):  

$$IN = (\text{ácido trans vacênico} + \text{ácido rumênico} + \text{ácido t10,c12-octadecadienoico}) / \sum n6:n3.$$

Os teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais do leite foram determinados em equipamento Bentley 2000, enquanto que CCS e CBT foram obtidas por citometria de fluxo, em equipamento Somacount 300 e Bactocount IBC, respectivamente. Com o intuito de linearizar os dados, a CCS foi transformada em escore linear de células somáticas ECS =  $[\log_2(\text{CCS}/100)] + 3$  (Shook, 1993) e a CBT, transformada pelo logaritmo natural da CBT normal.

Os resultados foram analisados conforme delineamento inteiramente casualizado, com medidas repetidas no tempo, tendo-se utilizado o procedimento Mixed e empregando estrutura paramétrica especial nas matrizes de (co)variância, conforme o modelo estatístico:

$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \gamma_k + (\alpha\gamma)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$ , em que  $Y_{ijk}$  é o valor observado pela  $k$ -ésima estação e  $j$ -ésima UPL do  $i$ -ésimo sistema produtivo;  $\mu + \alpha_i + \gamma_k + (\alpha\gamma)_{ik}$ , a média para o sistema produtivo  $i$  na estação  $k$ , que contém os efeitos fixos para sistema produtivo  $i$ , estação  $k$ , bem como a interação sistema produtivo  $\times$  estação  $ik$ ; e  $\varepsilon_{ijk}$ , o erro aleatório associado à mensuração na estação  $k$  na  $j$ -ésima unidade de produção de leite (UPL) designada ao sistema produtivo  $i$ . Assumiu-se uma estrutura de medidas repetidas para os resíduos, ou seja, utilizou-se o pressuposto de que  $\varepsilon_{ijk} \sim N(0; \Sigma)$ , em que  $\Sigma$  representa a matriz de (co)variância residual que mais adequou-se aos dados. As matrizes testadas foram: AR (1), auto regressiva de primeira ordem; VC, componentes de variância; CS, simetria composta; ARH(1), auto regressiva heterogênea de primeira ordem; ARMA(1,1), média móvel auto regressiva de primeira ordem e; TOEP, Toeplitz. As medidas foram estimadas com o comando LSMeans (“least squares means”) e comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

No conjunto original das variáveis que representam o potencial nutracêutico do leite, procedeu-se à análise de variância multivariada pelo procedimento GLM e o comando Manova, tendo-se realizado o teste de Wilks para testar a hipótese de que os vetores de médias das diferentes combinações entre sistemas produtivos e estações eram nulos.

Em seguida, utilizou-se a análise de componentes principais (ACP), seguida da análise de agrupamento com uso do algoritmo hierárquico aglomerativo de Ward, como método de agrupamento, e a distância euclidiana quadrática, como medida de dissimilaridade.

As análises estatísticas foram realizadas com o aplicativo SAS, versão 9.0 (SAS Institute Inc., Cary - NC, USA).

## Resultados e Discussão

Na Tabela 2 observa-se a caracterização do perfil de ácidos graxos (g 100 g<sup>-1</sup>) dos principais constituintes da dieta dos distintos sistemas de produção de leite.

**Tabela 2.** Caracterização do perfil de ácidos graxos (g por 100 g do total de ácidos graxos), dos principais constituintes da dieta recebida pelos animais, nos sistemas de produção altamente especializado (AE), especializado (ES), semiespecializado (SE) e não especializado (NE).

Ácido graxo	Silagem de milho				Concentrado				Pastagem temperada <sup>(1)</sup>				Pastagem tropical <sup>(2)</sup>			
	AE	ES	SE	NE	AE	ES	SE	NE	AE	ES	SE	NE	AE	ES	SE	NE
12:0 (ácido láurico)	0,20	0,24	0,28	-	0,10	0,15	0,14	0,12	2,08	2,11	2,16	2,20	2,87	2,64	2,49	2,94
14:0 (ácido mirístico)	0,40	0,50	0,47	-	8,25	7,22	8,22	7,27	0,45	0,40	0,50	0,61	0,50	0,45	0,54	0,90
16:0 (ácido palmítico)	16,20	16,18	16,80	-	21,40	21,70	22,40	22,90	13,20	13,00	13,14	13,11	20,02	20,00	19,77	18,44
16:1n7-c9 (ácido palmitoleico)	0,50	0,39	0,40	-	0,20	0,19	0,15	0,15	0,15	0,20	0,12	0,18	2,14	1,18	2,11	1,94
18:0 (ácido esteárico)	2,10	2,08	2,06	-	3,60	3,62	3,48	3,76	2,47	2,42	2,40	2,49	5,21	5,87	5,77	5,02
18:1n9-c9 (ácido oleico)	13,15	12,10	11,00	-	18,02	18,60	18,65	18,02	2,48	2,49	2,60	2,70	9,80	7,95	7,80	7,87
18:2n6-c9,c12 (ácido linoleico)	27,80	28,50	28,80	-	35,94	33,49	33,86	35,94	12,00	11,00	11,50	14,20	17,04	20,14	20,05	19,94
18:3n3-c9,c12,c15 (AAL)	20,30	23,60	25,80	-	3,34	3,50	3,70	3,54	55,22	55,48	54,12	50,98	27,04	28,21	26,24	28,00
20:0 (ácido araquídico)	0,47	0,42	0,50	-	1,98	0,88	0,98	0,98	0,57	0,50	0,77	0,81	0,52	0,48	0,43	0,41
20:1	9,54	8,60	7,50	-	0,66	0,67	0,40	0,76	0,34	0,57	0,45	0,34	0,50	0,52	0,77	0,82
21:0 (ácido heneicosanoico)	0,15	0,12	0,17	-	0,26	0,36	0,18	0,26	0,87	0,80	0,91	0,85	0,90	0,96	1,15	1,00
20:02	0,10	0,11	0,13	-	0,13	0,14	0,16	0,16	0,57	0,70	0,80	0,82	0,40	0,50	0,54	0,74
22:0 (ácido behênico)	2,33	1,33	1,13	-	0,60	0,55	0,50	0,80	0,55	0,52	0,54	0,55	2,64	2,66	2,60	3,10
24:0 (ácido lignocérico)	0,89	0,59	0,90	-	1,12	1,17	1,20	1,22	0,61	0,70	0,48	0,77	2,90	2,94	2,80	2,61
Não identificados	5,87	5,24	4,06	-	4,40	7,46	5,98	4,12	8,44	9,11	9,51	9,39	7,52	5,50	6,94	6,27

<sup>(1)</sup>Aveia preta (*Avena strigosa*) e azevém (*Lolium multiflorum*); <sup>(2)</sup>Capim sudão (*Sorghum sudanense*) e milheto (*Pennisetum glaucum*); AAL, ácido  $\alpha$ -linolênico.

Para quantificação dos ácidos graxos, foram utilizados os FRT, pois o FE (relação entre o FRE e FRT) demonstrou que o DIC respondia de maneira adequada aos diferentes FAME (Tabela 3). Além disso, através da análise do material certificado BCR<sup>®</sup>-163 do IRMM, observou-se elevada acurácia do método, com recuperações superiores a 90% (Tabela 4).

As estações do ano tiveram efeito significativo sobre os teores de proteína e sólidos totais, e sobre a CCS (Tabela 5). O teor de proteína foi menor durante o verão em razão da baixa qualidade nutricional das pastagens tropicais (*Sorghum sudanense* e *Pennisetum glaucum*) em comparação à das temperadas (*Avena strigosa* e *Lolium multiflorum*) (Fanti et al., 2008). Além disso, os animais possivelmente sofreram com o estresse térmico, uma vez

que a temperatura máxima média da região onde se desenvolveu o estudo é de 31,2°C, o que limita o consumo de matéria seca e diminui o teor de proteína do leite (Fanti et al., 2008). Segundo Vargas et al. (2014), animais em ambientes com temperaturas elevadas apresentam menor capacidade de respostas a doenças, o que aumenta sua susceptibilidade à invasão do úbere por microrganismos, e resultou nos maiores valores de CCS no verão (Tabela 5).

**Tabela 3.** Fator de resposta experimental (FRE), teórico (FRT) e de erro (FE) dos ácidos graxos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) e poli-insaturados (AGPI) analisados em cromatógrafo gasoso Agilent Technologies®, modelo 6890 Plus<sup>+</sup>

Ácidos graxos	FRE <sup>(1)</sup>	FRT <sup>(2)</sup>	FE <sup>(3)</sup>
<b>AGS</b>			
4:0 (ácido butírico)	1,74 (0,22)	1.59	1,09
6:0 (ácido caproico)	1,47 (0,40)	1.35	1,09
8:0 (ácido caprílico)	1.34 (0,19)	1.23	1,09
10:0 (ácido cáprico)	1,26 (0,19)	1.16	1,09
12:0 (ácido láurico)	1,15 (0,14)	1.11	1,04
14:0 (ácido mirístico)	1,08 (0,10)	1.08	1,00
16:0 (ácido palmítico)	1,05 (0,04)	1.05	1,00
18:0 (ácido esteárico)	1,02 (0,03)	1.03	0,99
20:0 (ácido araquídico)	1,02 (0,06)	1.02	1,00
<b>AGMI</b>			
14:1n5-c9 (ácido miristoleico)	1,09 (0,10)	1.07	1,02
16:1n7-c9 (ácido palmitoleico)	1,04 (0,07)	1.05	0,99
18:1n9-t9 (ácido elaídico)	1,02 (0,04)	1.03	0,99
18:1n9-c9 (ácido oleico)	1,00 (0,04)	1.03	0,97
<b>AGPI</b>			
18:2n6-c9,c12 (ácido linoleico)	1,02 (0,05)	1.02	1,00
18:3n3-c9,c12,c15 (ácido $\alpha$ -linolênico-ALA)	1,05 (0,05)	1.01	1,04
20:4n6-c5,c8,c11,c14 (ácido araquidônico-AA)	1,06(0,04)	0.99	1,07
20:5n3-c5,c8,c11,c14,c17 (ácido timnodônico-EPA)	1,03 (0,03)	0.99	1,04

<sup>(1)</sup>FRE= $M_X \cdot A_{PI} / M_{PI} \cdot A_X$ , onde  $M_X$ =massa do éster metílico (FAME);  $A_{PI}$ = área do padrão interno (PI);  $M_{PI}$ = massa do PI e;  $A_X$ =área do PI; <sup>(2)</sup>FRT segundo VISENTAINER (2012); <sup>(3)</sup>FE=FRE/FRT.

A elevação no conteúdo de sólidos totais no outono deveu-se principalmente a elevação no conteúdo de proteína e gordura do leite nessa estação (Tabela 5).

O aumento na CBT com a diminuição dos níveis de especialização das UPL (Tabela 5) deveu-se, possivelmente, ao tipo e ao local de ordenha, bem como ao emprego ou não do resfriamento. Assim, o sistema altamente especializado, por possuir sala de ordenha própria com circuito fechado e tanque de refrigeração à granel (Tabela 1), apresentou os menores valores de CBT.

Houve interação significativa entre os sistemas produtivos e as estações, para todos os ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados (Tabelas 6, 7 e 8), bem como para os índices de qualidade da fração lipídica (Tabela 7).

**Tabela 4.** Porcentagem do valor experimental (VE), valor teórico (VT) do material certificado BCR® - 163 e da recuperação (R%) dos ácidos graxos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) e poli-insaturados (AGPI)

Ácidos graxos	VE%	VT%	R% <sup>(1)</sup>
<b>AGS</b>			
14:0 (ácido mirístico)	2,29	2,12	92,58
16:0 (ácido palmítico)	25,96	24,91	95,94
18:0 (ácido esteárico)	18,29	18,04	98,63
<b>AGMI</b>			
16:1n7-c9 (ácido palmitoleico)	2,58	2,32	90,02
Isômeros posicionais e geométricos (cis/trans) do ácido octadecenoico (18:1)	38,3	37,23	97,21
<b>AGPI</b>			
Isômeros posicionais e geométricos (cis/trans) do ácido octadienoico (18:2)	7,05	7,11	100,82
Isômeros posicionais e geométricos (cis/trans) do ácido octatrienoico (18:3)	0,86	0,82	94,77

<sup>(1)</sup>R%=100.VE/VT

Com a diminuição do grau de especialização dos sistemas produtivos, observou-se menor concentração do  $\Sigma$ AGS nas estações primavera, verão e outono (Tabela 6). Isto se deve a maior participação de forragens frescas (CHILLIARD et al., 2007) na dieta dos extratos menos especializados.

No inverno, observou-se menor concentração de ácido linoleico (18:2n6 - c9, c12) e maiores valores de ácido rumênico e do  $\Sigma$ AGPI, nos extratos produtivos menos especializados (Tabela 8). Esses resultados estão relacionados ao predomínio no uso, dos extratos mais especializados, de pastagens de aveia preta (*Avena strigosa*) e azevém (*Lolium multiflorum*), em detrimento da silagem de milho e de concentrado, o que teria resultado em maiores concentrações de ácido alfa-linolênico (18:3n3 - c9, c12, c15) em comparação às de ácido linoleico e oleico (18:1n9 - c9) na dieta (Tabela 2). Isto, segundo Dewhurst et al. (2006), aumenta as concentrações de ácido rumênico e  $\Sigma$ AGPI, e diminui a concentração de ácido linoleico no leite, o que corrobora os resultados obtidos (Tabela 8).

O extrato produtivo mais especializados, apesar de não ter diferido significativamente dos dois extratos seguintes, aparentemente, favoreceu a formação de ácido rumênico, a ponto de seus teores terem se igualado estatisticamente com os observados no extrato com a menor especialização, que apresentou o maior valor desse ácido graxo (Tabela 8). Assim, pode-se inferir que a relação volumoso:concentrado, nos três primeiros níveis de especialização, tem

influência nesse resultado. No sistema produtivo altamente especializado, que possui a maior suplementação com concentrado na dieta (Tabela 1), os limites da relação volumoso:concentrado foram comprometidos, o que segundo Chilliard et al. (2007) diminui a bio-hidrogenação ruminal dos ácidos graxos de cadeia longa e inibe a etapa final desse processo, em que o ácido trans vacênico (18:1n7 – t11) é convertido a ácido esteárico (18:0). Dessa forma, após a dessaturação do ácido trans vacênico na glândula mamária, pela enzima delta 9 dessaturase, os teores de ácido rumênico no leite aumentam (Tabela 8).

Os extratos altamente especializado e especializado não diferiram quanto aos teores de ácido rumênico; enquanto que os menores valores, no outono, e os maiores, no inverno e na primavera, foram constatados nos sistemas semiespecializado e não especializado (Tabela 6). Como nos extratos mais especializados o processo de formação desse ácido graxo depende principalmente da concentração de ácido linoleico na dieta, e as fontes dietéticas nesses manejos que o contêm em sua composição (silagem de milho e concentrado) (Tabela 2) não são tão susceptíveis a variações sazonais, não houve variação nos teores de ácido rumênico (CLA, 18:2n7 - c9, t11) entre esses extratos (Tabela 8).

Por outro lado, nos níveis de menor especialização, a formação de ácido rumênico depende da participação do ácido alfa-linolênico, principal constituinte das pastagens frescas na dieta (Tabela 2). Portanto, esses sistemas produtivos são mais suscetíveis a alterações climáticas, com maiores teores nas pastagens temperadas, que são exploradas até a primavera, e menores nas pastagens tropicais. Além disso, a menor disponibilidade forrageira no outono resulta nos menores níveis dietéticos de ácido alfa-linolênico, com reflexo no conteúdo do ácido rumênico no leite (Tabela 8).

Portanto, os extratos produtivos altamente especializado e não especializado possuem características importantes para o aumento do potencial nutracêutico do leite, uma vez que o ácidos linoleico conjugado (CLA) está relacionado à redução de uma série de doenças degenerativas, como aterosclerose, à prevenção e tratamento do diabetes mellitus, além de ter efeito anticarcinogênico, estimulante do sistema imunológico, de reduzir a pressão arterial e de atuar no metabolismo lipídico corporal, especialmente na redução da gordura corporal e no aumento da massa magra (KRATZ et al., 2013; LAHLOU et al., 2014). No entanto, o principal antecessor metabólico do ácido rumênico em ruminantes, o ácido trans vacênico, por sua conformação geométrica (trans) poderia exercer ação prejudicial à saúde; contudo, Haug et al. (2007) constataram que este ácido graxo pode ser convertido em humanos ao seu sucessor.

As principais diferenças observadas neste estudo estão relacionadas ao comportamento do ácido linoleico e do ácido alfa-linolênico frente aos diferentes sistemas de produção e estações do ano. As alterações observadas nos conteúdos destes ácidos graxos no leite estão ligadas a modificações no conteúdo de seus sucessores, respectivamente o ácido araquidônico (20:4n6 - c5, c8, c11, c14) e o timnodônico (20:5n3 - c5, c8, c11, c14, c17) (Tabela 8). De acordo com Simopoulos (2006), a ação de enzimas dessaturases e elongases convertem os sucessores em seus respectivos derivados. Entretanto, é importante ressaltar que essas duas famílias de ácidos graxos competem pelas mesmas enzimas envolvidas na dessaturação e no alongamento de suas cadeias (SIMOPOULOS, 2006). Assim, conforme o autor, o balanço entre ômega 6 e ômega 3 ( $\Sigma n6:n3$ ) na dieta assume grande importância na nutrição humana, tendo-se preconizado a diminuição dessa relação.

**Tabela 5.** Média±erro-padrão dos teores de proteína total, gordura, sólidos totais, contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) do leite bovino, nos sistemas de produção altamente especializado (AE), especializado (ES), semiespecializado (SE) e não especializado (NE), nas diferentes estações climáticas<sup>(1)</sup>.

Sistema	Estação do ano				Média
	Primavera	Verão	Outono	Inverno	
	Proteína total (%)				
AE	3,07	2,96	3,12	3,11	3,07±0,09
ES	3,10	3,05	3,07	3,06	3,07±0,09
SE	3,28	3,18	3,17	3,20	3,21±0,09
NE	3,01	2,94	3,23	3,14	3,08±0,09
Média	3,11±0,11a	3,03±0,11b	3,15±0,11a	3,13±0,11a	-
	Gordura (%)				
AE	3,52	3,50	3,51	3,32	3,46±0,14
ES	3,67	3,96	3,37	3,57	3,64±0,14
SE	3,88	3,70	3,77	3,78	3,78±0,14
NE	3,74	4,03	4,03	3,62	3,86±0,14
Média	3,70±0,09	3,80±0,09	3,67±0,09	3,57±0,09	-
	Sólidos totais (%)				
AE	11,62	11,96	12,11	11,72	11,85±0,22
ES	11,87	12,06	11,98	11,37	11,82±0,22
SE	12,36	12,61	12,23	12,22	12,36±0,22
NE	11,97	12,83	13,19	11,99	12,49±0,22
Média	11,96±0,15bc	12,36±0,15ab	12,38±0,15a	11,83±0,15c	-
	Contagem de células somáticas (células mL <sup>-1</sup> )				
AE	521,18	619,30	692,62	565,68	599,70±0,36
ES	415,11	882,78	504,32	516,38	579,65±0,36
SE	517,34	554,23	630,30	455,25	539,28±0,36
NE	324,26	539,38	503,03	357,40	431,02±0,36
Média	444,47±0,20b	648,92±0,20a	582,57±0,20ab	473,67±0,20b	-
	Contagem bacteriana total (unidades formadoras de colônia mL <sup>-1</sup> )				
AE	211,33	209,86	155,73	239,09	204,00±0,05B
ES	229,50	201,98	202,64	245,26	219,83±0,05AB
SE	235,23	211,09	263,86	292,21	250,60±0,05A
NE	252,70	229,54	240,71	220,15	235,77±0,05A
Média	232,18±0,09	213,12±0,09	215,73±0,09	249,18±0,09	-

<sup>(1)</sup>Médias seguidas por letras iguais, minúsculas entre as colunas e maiúsculas entre as linhas, não diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

**Tabela 6.** Média±erro-padrão dos teores de ácidos graxos ( $\text{mg g}^{-1}$ ) saturados, e somatório dos ácidos graxos saturados ( $\Sigma\text{AGS}$ ) no leite bovino, nos sistemas de produção altamente especializado (AE), especializado (ES), semi- especializado (SE) e não especializado (NE) nas diferentes estações climáticas<sup>(1)</sup>.

Sistema	Estação do ano				Média
	Primavera	Verão	Outono	Inverno	
	4:0 (ácido butírico)				
AE	35,36Aa	33,13Ba	35,58Aa	29,61Aa	33,42±0,89
ES	40,94Aa	37,58Aba	37,22Aa	36,03Aa	37,94±0,89
SE	39,54Aa	35,51Ba	37,64Aa	34,62Aa	36,83±0,89
NE	33,18Ab	43,05Aa	35,02Aab	36,25Aab	36,88±0,89
Média	37,26±1,01	37,32±0,61	36,37±0,98	34,13±1,01	-
	6:0 (ácido caproico)				
AE	12,37ABa	12,80Aa	13,34Aa	11,87Aa	12,59±0,35
ES	13,56Aa	13,82Aa	11,78Aa	12,01Aa	12,79±0,35
SE	13,42Aa	12,19Aa	11,06Aa	12,11Aa	12,20±0,35
NE	10,12Ba	13,25Aa	11,19Aa	11,20Aa	11,44±0,35
Média	12,37±0,29	13,02±0,34	11,84±0,27	11,80±0,40	-
	8:0 (ácido caprílico)				
AE	7,93Aa	8,52Aa	8,41Aa	7,64Aa	8,12±0,19
ES	8,31Aab	9,21Aa	8,91Aa	6,41Ab	8,21±0,19
SE	7,72ABa	8,43Aa	8,32ABa	7,63Aa	8,02±0,19
NE	5,43Bb	7,90Aa	6,52Bab	6,57Aab	6,60±0,19
Média	7,34±0,22	8,51±0,15	8,04±0,18	7,06±0,16	-
	10:0 (ácido cáprico)				
AE	18,76Aa	17,60Aa	18,92Aa	19,17Aa	18,61±0,38
ES	17,52Aab	19,00Aa	15,96ABab	14,08Ab	16,64±0,38
SE	17,46Aa	16,99Aa	14,58Ba	17,37Aa	16,60±0,38
NE	12,56Bb	15,70Aab	17,38ABa	15,96Aab	15,40±0,38
Média	16,57±0,31	17,32±0,38	16,71±0,36	16,65±0,50	-
	12:0 (ácido láurico)				
AE	19,27Aa	22,16Aa	23,11Aa	21,11Aa	21,41±0,68
ES	21,78Aa	21,08Aa	18,86Aa	19,14Aa	20,22±0,68
SE	20,03Aa	19,62Aa	17,85Aa	19,63Aa	19,28±0,68
NE	11,80Bb	18,69Aa	16,90Aab	17,73Aa	16,28±0,68
Média	18,22±0,35	20,39±0,57	19,18±0,73	19,40±0,66	-
	14:0 (ácido mirístico)				
AE	93,67Aa	99,40Aa	100,02Aa	92,89Aa	96,50±1,93
ES	91,63Aa	96,47Aa	96,48Aa	87,67Aa	93,06±1,93
SE	88,62Aa	93,63Aa	89,83ABa	86,45Aa	89,63±1,93
NE	64,53Bb	87,75Aa	78,20Bab	84,27Aa	78,68±1,93
Média	84,61±1,60	94,31±1,18	91,13±1,61	87,82±1,65	-
	16:0 (ácido palmítico)				
AE	229,38Ab	286,81Aa	276,05Aa	238,41Bab	257,66±4,45
ES	278,76Aab	297,12Aa	252,89ABb	313,34Aa	285,53±4,45
SE	256,98Aa	267,19Aba	236,21Ba	230,18Ba	247,64±4,45
NE	204,91Aa	258,95Ba	234,55Bab	205,24Bb	225,91±4,45
Média	242,51±4,97	277,52±3,88	249,93±3,27	246,79±5,32	-
	18:0 (ácido esteárico)				
AE	104,72Ba	108,39Ba	110,43Aa	100,78Aa	106,08±2,20
ES	118,15ABab	127,40Aba	99,87Ab	106,57Aab	113,00±2,20
SE	128,57Aa	114,95Bab	105,91Ab	109,59Aab	114,75±2,20
NE	127,07Aa	141,87Aa	95,81Ab	122,70Aab	121,86±2,20
Média	119,63±1,40	123,15±1,67	103,01±2,09	109,91±3,26	-
	20:0 (ácido araquídico)				
AE	1,07Cab	1,22Aa	1,05Aab	0,80Bb	1,03±0,05
ES	1,45BCa	1,47Aa	0,99Aab	0,87Bb	1,19±0,05
SE	2,30Aa	1,36Ab	1,40Ab	0,89Bc	1,49±0,05
NE	1,67Ba	1,61Aa	1,02Ab	1,70Aa	1,50±0,05
Média	1,62±0,05	1,41±0,04	1,11±0,06	1,07±0,03	-
	$\Sigma\text{AGS}$				
AE	538,98ABa	610,06Aba	611,27Aa	536,08Aa	574,10±7,63
ES	618,31Aab	664,28Aa	548,41Bb	615,99Aab	611,74±7,63
SE	609,12Aa	594,16Ba	514,30Bb	537,14Aab	563,68±7,63
NE	496,90Bb	632,79Aba	503,51Bb	514,49Ab	536,92±7,63
Média	565,82±8,62	625,32±6,13	544,37±5,36	550,93±10,04	-

<sup>(1)</sup>Médias seguidas por letras iguais, minúsculas entre as colunas e maiúsculas entre as linhas, não diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

**Tabela 7.** Média±erro-padrão dos ácidos graxos (mg g<sup>-1</sup>) monoinsaturados, somatório dos ácidos graxos monoinsaturados (ΣAGMI), atividade da enzima delta 9 dessaturase, índice de aterogenicidade, índice de trombogenicidade, razão de ácidos graxos hipocolesterolêmico e hipercolesterolêmico (h/H), ácidos graxos desejáveis e índice nutracêutico do leite bovino, nos sistemas de produção altamente especializado (AE), especializado (ES), semi- especializado (SE) e não especializado (NE), nas diferentes estações climáticas.

Sistema	Estação do ano				Média
	Primavera	Verão	Outono	Inverno	
			14:1n5-c9 (ácido miristoleico)		
AE	6,75Ab	7,67Aab	8,40Aa	7,45Aab	7,57±0,14
ES	6,70Aa	6,13Aba	7,05ABa	5,19Ba	6,27±0,14
SE	6,64Aa	6,97Aba	5,54Ba	6,06ABa	6,30±0,14
NE	3,31Bc	5,59Bb	5,51Bb	7,65Aa	5,52±0,14
Média	5,85±0,14	6,59±0,16	6,63±0,15	6,59±0,19	-
			16:1n7-c9 (ácido palmitoleico)		
AE	12,71Aab	13,72Aa	13,73Aa	10,42Ab	12,64±0,37
ES	12,70Aa	10,81Ba	10,99ABa	10,63Aa	11,28±0,37
SE	12,25Aab	12,66ABa	9,74Bb	9,68Ab	11,08±0,37
NE	10,71Aab	10,42Bab	8,99Bb	12,77Aa	10,71±0,37
Média	12,10±0,29	11,90±0,25	10,86±0,29	10,87±0,29	-
			18:1n9-t9 (ácido eláídico)		
AE	3,78Aab	3,23Ab	3,48Ab	4,73Aa	3,81±0,11
ES	3,87Aab	3,55Aab	2,91Ab	4,35Ca	3,67±0,11
SE	3,61Aab	3,35Ab	3,16Ab	4,44Aa	3,64±0,11
NE	4,23Aa	3,92Aa	2,81Ab	3,37Bab	3,58±0,11
Média	3,88±0,15	3,51±0,10	3,09±0,09	4,22±0,08	-
			18:1n7-t11 (ácido trans vacênico)		
AE	14,14Bb	13,24Bb	16,97Aab	20,41Aa	16,19±0,53
ES	15,86ABb	13,21Bb	16,88Aab	22,62Aa	17,14±0,53
SE	18,34Aa	18,97ABa	16,70Aa	20,24Aa	18,57±0,53
NE	18,70Ab	22,12Aa	13,68Ac	23,52Aa	19,50±0,53
Média	16,76±0,36	16,89±0,74	16,06±0,53	21,70±0,53	-
			18:1n9-c9 (ácido oleico)		
AE	127,11Aa	152,92Aa	162,13Aa	125,70Ba	141,96±4,95
ES	145,75Aa	154,22Aa	135,15Aa	126,93Ba	140,51±4,95
SE	163,06Aa	162,80Aa	146,65Aa	125,38Ba	149,47±4,95
NE	138,68Aab	157,11Aab	126,80Ab	176,60Aa	149,80±4,95
Média	143,65±4,07	156,76±4,91	142,68±5,32	138,65±4,39	-
			ΣAGMI		
AE	165,43Aa	191,48Aa	208,33Aa	170,73Ba	183,99±5,38
ES	186,73Aa	191,01Aa	175,24Aa	173,77Ba	181,69±5,38
SE	209,51Aa	203,49Aa	186,07Aa	169,17Ba	192,06±5,38
NE	179,78Aab	206,65Aab	154,13Ab	229,73Aa	192,57±5,38
Média	185,36±4,98	198,16±5,08	180,94±5,61	185,85±5,17	-
			Δ9-dessaturase (C14)		
AE	6,87Aa	7,48Aa	7,54Aa	7,33ABa	7,30±0,13
ES	7,11Aa	6,49ABab	6,51Aab	5,48Bb	6,40±0,13
SE	6,78Aa	7,03ABa	6,25Aa	6,39Ba	6,61±0,13
NE	5,32Ab	5,87Bb	6,30Ab	8,38Aa	6,47±0,13
Média	6,52±0,13	6,72±0,13	6,65±0,13	6,90±0,13	-
			índice de aterogenicidade		
AE	3,35Aa	3,23Aa	3,11ABb	3,24Aa	3,23±0,11
ES	3,35Aa	3,17Aa	3,47ABa	3,58Aa	3,39±0,11
SE	2,91ABb	3,12Aab	3,77Aa	3,16Aab	3,24±0,11
NE	2,38Ba	2,73Aa	2,72Ba	2,03Ba	2,47±0,11
Média	3,00±0,08	3,06±0,06	3,27±0,10	3,00±0,07	-
			índice de trombogenicidade		
AE	4,38ABa	4,38ABa	4,15Aa	4,30Ba	4,30±0,12
ES	4,57Aa	4,57Aa	4,76Aa	5,13Aa	4,76±0,12
SE	3,85ABa	3,92ABa	4,87Aa	4,17Ba	4,20±0,12
NE	3,69Bab	4,06Ba	4,38Aa	3,10Cb	3,81±0,12
Média	4,12±0,08	4,23±0,08	4,54±0,14	4,17±0,08	--
		Razão de ácidos graxos hipocolesterolêmico e hipercolesterolêmico (h/H)			
AE	0,46Ba	0,44Aa	0,47Aa	0,45Ba	0,45±0,03
ES	0,45Ba	0,44Aa	0,41Aa	0,40Ba	0,43±0,03
SE	0,53ABa	0,49Aa	0,47Aa	0,47Ba	0,49±0,03
NE	0,63Aa	0,51Ab	0,46Ab	0,64Aa	0,56±0,03
Média	0,52±0,01	0,47±0,01	0,45±0,01	0,49±0,01	-
			Ácidos graxos desejáveis		
AE	300,38Aa	323,80Aa	337,80Aa	312,37Aa	318,59±6,92
ES	339,94Aa	320,04Aa	315,60Aa	310,40Aa	321,49±6,92
SE	346,99Aa	349,36Aa	320,65Aa	304,91Aa	330,48±6,92
NE	354,78Aab	355,44Aab	298,55Ab	375,86Aa	346,16±6,92
Média	335,52±7,09	337,16±4,81	318,15±6,75	325,88±6,86	-
			Índice nutracêutico		
AE	4,87Aab	2,28Bb	4,14Aab	6,59Ba	4,47±0,48
ES	4,14Aab	4,07Bb	4,04Ab	7,13ABa	4,85±0,48
SE	7,32Aa	6,10ABa	3,64Ba	8,04ABa	6,27±0,48
NE	7,11Ab	9,74Ab	4,68Ab	12,36Aa	8,47±0,48
Média	5,86±0,52	5,55±0,39	4,12±0,51	8,53±0,51	-

<sup>01</sup>Médias seguidas por letras iguais, minúsculas entre as colunas e maiúsculas entre as linhas, não diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.



**Tabela 8.** Média±erro-padrão dos ácidos graxos (mg g<sup>-1</sup>) poli-insaturados, somatório dos ácidos graxos ômega 3 (Σn3), dos ácidos graxos ômega 6 (Σn6), da relação ômega 6 e ômega 3 (Σn6:n3) e do total de ácidos graxos poli-insaturados (ΣAGPI) do leite bovino, nos sistemas produtivos altamente especializado (AE), especializado (ES), semiespecializado (SE) e não especializado (NE), nas distintas estações do ano

Sistema	Estação do ano				Média
	Primavera	Verão	Outono	Inverno	
	18:2n6-c9,c12 (ácido linoleico)				
AE	12,19Aa	11,49Aa	11,85Aa	9,96Aa	11,37±0,26
ES	13,91Aa	9,97Ab	9,93Ab	10,46Ab	11,07±0,26
SE	10,71Ba	10,45Aa	9,97Aa	9,28ABa	10,10±0,26
NE	9,91Ba	8,50Ba	7,73Ba	7,70Ba	8,46±0,26
Média	11,68±0,29	10,10±0,16	9,87±0,25	9,35±0,32	-
	18:3n3-c9,c12,c15 (ácido α-linolênico-AAL)				
AE	2,46Aab	1,66Bb	1,73Bb	3,11Aa	2,31±0,08
ES	2,73Aab	1,81Bb	2,14Ab	3,05Aa	2,43±0,08
SE	3,09Aa	3,13Aa	1,60Bb	3,37Aa	2,80±0,08
NE	3,04Aa	2,73Aa	1,81ABb	3,38Aa	2,67±0,08
Média	2,83±0,10	2,33±0,07	1,82±0,04	3,23±0,10	-
	18:2n7- c9,t11 (ácido rumênico-CLA)				
AE	6,60Aa	5,33Aa	6,39Aa	7,40ABa	6,43±0,20
ES	5,97Aa	6,38Aa	5,58Aa	7,20Ba	6,28±0,20
SE	7,11Aa	5,16Ab	5,65Aab	6,71Bab	6,16±0,20
NE	7,34Ab	5,78Abc	4,87Ac	10,00Aa	7,00±0,20
Média	6,76±0,17	5,66±0,18	5,62±0,18	7,83±0,26	-
	18:2n6-t10,c12 (ácido t10,c12-octadecadienoico-CLA)				
AE	0,21Ba	0,30Aa	0,28Aa	0,23Ca	0,26±0,01
ES	0,30Bab	0,36Aa	0,24Ab	0,37Ba	0,32±0,01
SE	0,31Bab	0,31Aab	0,28Ab	0,37Ba	0,32±0,01
NE	0,55Ab	0,36Ac	0,22Ad	0,73Aa	0,46±0,01
Média	0,34±0,01	0,33±0,01	0,26±0,01	0,43±0,01	-
	20:4n6-c5,c8,c11,c14 (ácido araquidônico-AA)				
AE	0,69ABa	0,80Aa	0,81Aa	0,66Aa	0,74±0,02
ES	0,83Aa	0,82Aa	0,65Aa	0,64Aa	0,73±0,02
SE	0,66ABa	0,68ABa	0,68Aa	0,56Aa	0,64±0,02
NE	0,58Ba	0,57Ba	0,44Ba	0,64Aa	0,56±0,02
Média	0,69±0,02	0,72±0,02	0,65±0,02	0,63±0,02	-
	20:5n3-c5,c8,c11,c14,c17 (ácido timnodônico-EPA)				
AE	0,34Aab	0,34Cab	0,41Aa	0,28Bb	0,34±0,01
ES	0,21Bb	0,38BCa	0,24Bb	0,30Bab	0,28±0,01
SE	0,15Bc	0,47Ba	0,27Bb	0,38Bab	0,32±0,01
NE	0,26ABc	0,75Aa	0,41Ab	0,68Aa	0,52±0,01
Média	0,24±0,01	0,48±0,01	0,33±0,01	0,41±0,01	-
	Σn3				
AE	2,72Aa	2,35Aa	3,02Aa	3,21Aa	2,83±0,08
ES	2,94Aa	3,24Aa	2,14Aa	3,36Aa	2,92±0,08
SE	3,18Aa	2,40Aa	2,27Aa	3,51Aa	2,84±0,08
NE	3,36Aab	2,94Aab	2,30Ab	3,80Aa	3,10±0,08
Média	3,05±0,11	2,73±0,11	2,43±0,09	3,47±0,16	-
	Σn6				
AE	14,85ABa	14,65Aa	14,54Aa	12,57Aa	14,15±0,28
ES	17,43Aa	13,65ABb	12,98Ab	13,38Ab	14,36±0,28
SE	14,00ABa	12,56ABa	13,31Aa	11,80Aa	12,92±0,28
NE	12,62Ba	11,41Ba	9,96Ba	10,31Ba	11,07±0,28
Média	14,72±0,33	13,07±0,22	12,70±0,25	12,02±0,30	-
	Σn6:n3				
AE	4,27Ab	7,49Aa	6,68Aa	4,35Ab	5,70±0,14
ES	4,94Aa	3,77Ca	5,25Ba	4,40Aa	4,59±0,14
SE	3,33Ab	5,74Ba	7,04Aa	3,56Ab	4,92±0,14
NE	3,06Aa	3,42Ca	4,24Ba	3,40Aa	3,53±0,14
Média	3,90±0,17	5,10±0,14	5,80±0,13	3,93±0,12	-
	ΣAGPI				
AE	25,09Aa	22,15Aa	25,52Aa	25,02ABa	24,44±0,43
ES	25,81Aa	23,00Aab	21,47ABb	25,44ABab	23,93±0,43
SE	24,96Aa	21,94Aa	21,40ABa	22,55Ba	22,71±0,43
NE	23,41Aa	24,49Aa	17,40Ba	27,40Aa	23,17±0,43
Média	24,82±0,45	22,90±0,49	21,45±0,45	25,10±0,42	-

<sup>(1)</sup>Médias seguidas por letras iguais, minúsculas entre as colunas e maiúsculas entre as linhas, não diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Os valores de  $\Sigma 6:n3$  diminuíram à medida que a especialização dos sistemas produtivos também diminui (Tabela 7). Como Simopoulos (2006) preconizam  $\Sigma 6:n3$  de 2:1 a 4:1, os melhores resultados foram obtidos no sistema não especializado.

O perfil de ácidos graxos mais apropriado para alimentação humana foi obtido com a diminuição da especialização dos sistemas produtivos e nas estações com maior participação de gramíneas temperadas, ou seja, no inverno e na primavera (Tabela 7). Nesse sentido, o nível não especializado, no inverno, apresentou o melhor índice nutracêutico do estudo (Tabela 7), pois além de apresentar maior participação de forrageiras frescas na dieta, o perfil de ácidos graxos nas pastagens temperadas (Tabela 2) favorece a formação dos ácidos trans vacênico, rumênico e do ácido t10,c12-octadecadienoico, além de diminuir a  $\Sigma 6:n3$  no leite (ROY et al., 2006; CHILLIARD et al., 2007).

O índice nutracêutico proposto demonstrou maior poder de diferenciação entre os sistemas de produção, pois as diferenças no índice acentuaram-se entre os extratos mais e menos especializados, principalmente, nas estações verão e inverno (Tabela 7). Assim, em estudos de manipulação da dieta que visem à obtenção de um perfil de ácidos graxos mais adequado para o leite de consumo, sugere-se o índice nutracêutico como parâmetro de avaliação da qualidade da fração lipídica do leite.

Além disso, o índice nutracêutico pode ser considerado adequado para analisar a capacidade do leite em contribuir na prevenção e combate de doenças cardiovasculares, uma vez que ele apresentou correspondência inversa com os índices de aterogenicidade e trombogênicidade propostos por Ulbricht e Southgate (1991), e direta com a razão entre ácidos graxos hipocolesterolêmico e hipercolesterolêmico (SANTOS-SILVA et al., 2002) (Tabela 7). O índice também se mostrou mais eficiente na avaliação do potencial nutracêutico do leite que o conteúdo de ácidos graxos desejáveis (COSTA et al., 2008), que não apresentou correspondência com os índices estudados (Tabela 7).

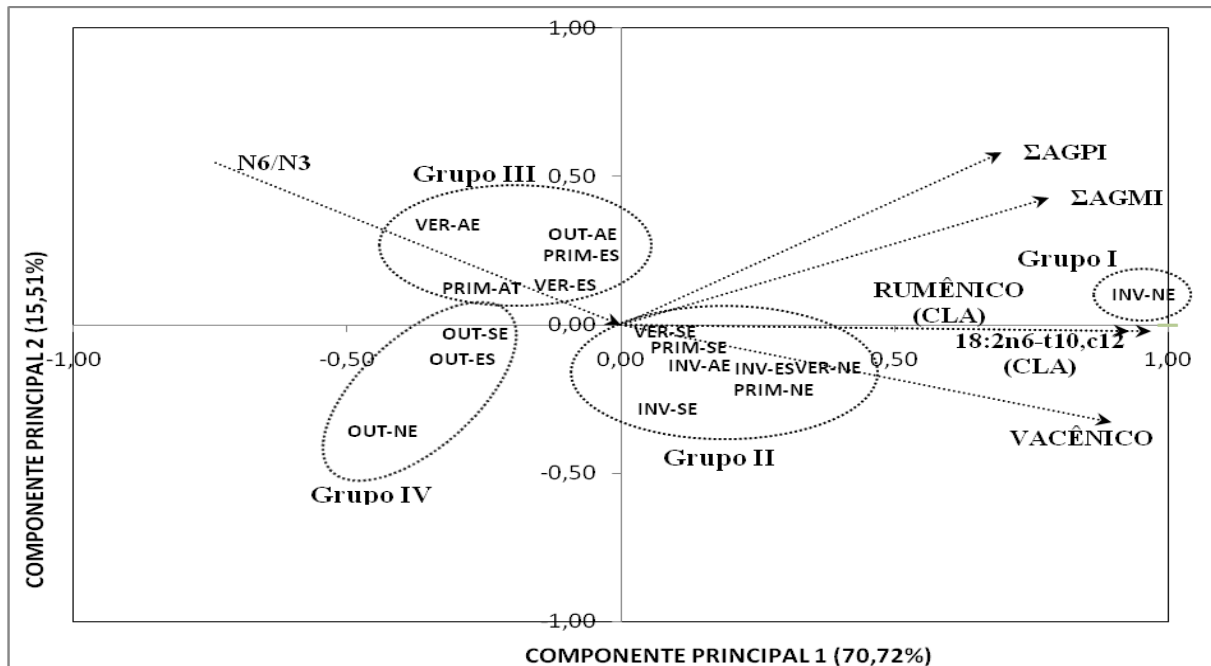
Com a análise de variância multivariada verificou-se diferença significativa entre os vetores de médias, para as diferentes combinações de sistemas produtivos e estações do ano, tanto pelo teste Wilks, quanto pelos testes Pillai, Hotelling-Lawley e Roy. Os três primeiros autovalores foram significativos pelo teste da razão de verossimilhança, e o primeiro autovalor explicou 70,72%, e o segundo, 15,51%; ou seja, os dois primeiros autovalores explicaram 86,23% da variação total dos dados relacionados ao potencial nutracêutico do leite bovino (Figura 1). Portanto, a análise de componentes principais permitiu visualizar a similaridade e dissimilaridade entre as diferentes combinações entre sistemas produtivos e estações (Figura 1).

As variáveis  $\Sigma$ AGPI ( $r=0,69$ ;  $p<0,01$ ),  $\Sigma$ AGMI ( $r=0,78$ ;  $p<0,001$ ),  $\Sigma n6:n3$  ( $r=-0,74$ ;  $p<0,01$ ), ácido rumênico ( $r=0,97$ ;  $p<0,001$ ) e ácido t10,c12-octadecadienoico ( $r=0,93$ ;  $p<0,001$ ) explicaram a variabilidade do CP1 (componente principal 1), ao passo que as variáveis  $\Sigma n6:n3$  ( $r=0,55$ ;  $p<0,05$ ) e  $\Sigma$ AGPI ( $r=0,58$ ;  $p<0,05$ ) explicaram a variabilidade do CP2 (Figura 1). A partir das correlações dos componentes principais com as variáveis, pode-se observar que quanto mais à direita (variação explicada pelo CP1) e acima (variação explicada CP2) do plano cartesiano as combinações se localizarem, maior será o potencial nutracêutico do leite, uma vez que essas posições apresentam valores mais elevados de  $\Sigma$ AGPI,  $\Sigma$ AGMI, ácido rumênico e ácido t10,c12-octadecadienoico, e menores de  $\Sigma n6:n3$ ; exceto pela variação explicada pelo CP2 em relação ao  $\Sigma n6:n3$ , que apresentou maiores valores em posições mais elevadas.

A análise de agrupamento mostrou que o número ideal de grupos formados, entre as 16 possíveis combinações entre sistemas produtivos e estações do ano, foi quatro, em que o grupo I englobou a classe inverno-não especializado; o grupo II, as classes primavera-semiespecializado, primavera-não especializado, verão-semiespecializado, verão-não especializado, inverno-altamente especializado, inverno-especializado e inverno-semiespecializado; o grupo III, as classes primavera-altamente especializado, primavera-especializado, verão- altamente especializado, verão-especializado e outono-altamente especializado; e o grupo IV, as classes outono-especializado, outono-semiespecializado e outono-não especializado (Figura 1).

Portanto, no outono, todos os sistemas produtivos situaram-se no grupo IV, exceto o altamente especializado que se localizou no grupo III. Isso mostra que esse extrato produtivo foi o único capaz de mitigar os efeitos negativos da carência de forragens no outono sobre a qualidade da fração lipídica do leite, o que culminou com um aumento de  $\Sigma$ AGPI,  $\Sigma$ AGMI, ácido rumênico e ácido t10,c12-octadecadienoico, variação esta explicada pelo CP1 (Figura 1).

Entretanto, é importante ressaltar que, por meio da análise das variáveis que explicaram a variabilidade do CP2, observou-se, no outono, aumento na  $\Sigma n6:n3$  no nível altamente especializado, em comparação com os outros sistemas produtivos. Isso se deve, segundo Chilliard et al. (2007), ao incremento do fornecimento de fontes dietéticas com elevados teores de ácido linoleico, como a silagem de milho e concentrado (Tabela 2), o que elevaria a absorção intacta desse principal representante da família ômega-6 no leite (Figura 1).



**Figura 1.** Projeção bidimensional dos escores das diferentes combinações entre os sistemas de produção – altamente especializado (AE), especializado (ES), semiespecializado (SE) e não especializado (NE) – e as diferentes estações do ano – primavera, PRIM; verão, VER; outono, OUT; e inverno, INV –, além das cargas (correlações entre as variáveis e os componentes principais) das variáveis: ácido vacênico, total de ácidos graxos monoinsaturados ( $\Sigma$ AGMI), poli-insaturados ( $\Sigma$ AGPI), relação dos ácidos graxos ômega 6 e ômega 3 (N6/N3) e os isômeros de ácido linoleico conjugado (CLA), ácido rumênico e ácido t10,c12-octadecadienoico (18:2n6-t10,c12).

Além da combinação outono-altamente especializado, outras quatro assentaram-se no grupo III, compostas pelos sistemas produtivos altamente especializado e especializado, nas estações verão e primavera (Figura 1). Porém, nota-se que as combinações dessas estações com os níveis de menor especialização migraram para o grupo II. Essa migração pode ser explicada pelas diferenças no manejo nutricional entre os diferentes extratos produtivas. Os sistemas mais especializados necessitaram desocupar áreas antes destinadas ao pastejo, para o plantio do milho, nos períodos compreendidos entre a primavera e o verão, o que resultou na diminuição do fornecimento de forrageiras frescas em razão do aumento na oferta de silagem de milho e concentrado. Isso manteve esses sistemas de produção no grupo III (Figura 1), principalmente em razão dos maiores valores de  $\Sigma$ n6:n3 (variação explicada pelo CP1 e CP2) e menores de  $\Sigma$ AGPI,  $\Sigma$ AGMI, ácido rumênico e ácido t10,c12-octadecadienoico, quando comparado ao grupo II (variação explicada principalmente pelo CP1).

Esse manejo nutricional, entretanto, não ocorre em propriedades dos extratos produtivos menos especializados, que apresentam menor ou nenhum fornecimento de silagem de milho na dieta (Tabela 1). O extrato semiespecializado, que também utiliza silagem de milho e concentrado, mas em menores proporções, apesar de situar-se no grupo II, deslocou-se em direção ao grupo III (Figura 1), o que corrobora a explicação anterior.

No grupo II, além das combinações dos sistemas semiespecializados e não especializados com as estações primavera verão, ocorrem todas as combinações dos extratos produtivos com a estação inverno, exceto para a combinação inverno-não especializado, que foi o único representante do grupo I, caracterizado pelo leite de maior potencial nutracêutico. Essa variação foi explicada principalmente pelo CP1, já que esses grupos diferiram minimamente quanto ao CP2.

### Conclusões

Os sistemas de produção e as estações do ano interferem conjuntamente no perfil de ácidos graxos do leite bovino, mas isoladamente em sua qualidade química e microbiológica. As maiores contagens de células somáticas e os menores valores de proteína são obtidos no verão e, com a diminuição do grau de especialização das unidades produtoras, a contagem bacteriana total aumenta. Os leites bovinos de maior potencial nutracêutico são obtidos no inverno, nos sistemas não especializados de produção, que apresentam os maiores teores de ácidos graxos poli-insaturados, ácido rumênico e ácido t10,c12-octadecadienoico, além dos melhores índices de aterogenicidade, trombogenicidade, razão de ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos e, em especial, o melhor índice nutracêutico. Em razão de sua alta capacidade em diferenciar alterações no manejo nutricional dos animais, o índice nutracêutico deve ser preferido para a avaliação da qualidade da fração lipídica do leite bovino.

### Referências

- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, n.8, p.911-917, 1959.
- BODENMÜLLER FILHO, A.; DAMASCENO, J.C.; PREVIDELLI, I.T.S.; SANTANA, R.G.; RAMOS, C.E.C.O.; SANTOS, G. T. Tipologia de sistemas de produção baseada nas características do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.8, p.1832-1839, 2010.

CHILLIARD, Y.; GLASSER, F.; FERLAY, A.; BERNARD, L.; ROUEL, J.; DOREAU, M. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. **European of Lipid Science and Technology**, v.109, n.8, p.828-855, 2007.

CHRISTIE, W.W. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesterol esters. **Journal of Animal Science**, v.23, p.1072-1077, 1982.

COSTA, R.G.; MESQUITA, I.V.; QUEIROGA, R.C.R. Características químicas e sensoriais do leite de cabras Moxotó alimentadas com silagem de maniçoba. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.4, p.694-702, 2008.

DEWHURST, R. J.; SHINGFIELD, K.J.; LEE, M.R.F.; SCOLLAN, N.D. Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. **Animal Feed Science and Technology**, v.131, n.3-4, p.168–206, 2006.

FANTI, M.G.N.; ALMEIDA, K.E.; RODRIGUES, A.M.; SILVA, R.C.; FLORENCE, A.C.R.; GIOIELLI, L.A.; OLIVEIRA, M.N. Contribuição ao estudo das características físico-químicas e da fração lipídica do leite orgânico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.259-265, 2008.

GABBI, A.M.; McMANUS, C.M.; SILVA, A.V.; MARQUES, L.T.; ZANELA, M.B.; STUMPF, M.P.; FISCHER, V. Typology and physical–chemical characterization of bovine milk produced with different productions strategies. **Agricultural Systems**, v.121, p.130-134, 2013.

HAUG, A.; HØSTMARK, A.T.; HARSTAD, O.M. Bovine milk in human nutrition – a review. **Lipids in Health and Disease**, v.25, n.6, p.1-16, 2007.

KRATZ, M.; BAARS, T.; GUYENET, S. The relationship between high-fat dairy consumption and obesity, cardiovascular, and metabolic disease. **European journal of nutrition**, v.52, n.1, p.1-24, 2013.

LAHLOU, M. N.; KANNEGANTI, R.; MASSINGILL, L. J.; BRODERICK, G. A.; PARK, Y.; PARIZA, M. W.; FERGUSON, J. D.; WU, Z. Grazing increases the concentration of CLA in dairy cow milk. **Animal**, v.8, n.7, p.1191-1200, 2014.

ROY, A.; FERLAY, A.; SHINGFIELD, K.J.; CHILLIARD, Y. Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to plant oils in cows given different basal

diets, with particular emphasis on trans-C18:1 fatty acids and isomers of conjugated linoleic acid. **Animal Science**, n.82, v.4, p.479–492, 2006.

SANTOS-SILVA, J.; BESSA, R.J.B.; SANTOS-SILVA, F. Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs: II. Fatty acid composition of meat. **Livestock Production Science**, v.77, n.2, p.187-194, 2002.

SHOOK, G.E. Genetic improvement of mastitis through selection on somatic cell count. **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.9, n.3, p.563-581, 1993.

SIMIONATO, J.I.; GARCIA, J.C.; DOS SANTOS, G.T.; OLIVEIRA, C.C.; VISENTAINER, J.V.; DE SOUZA, N.E. Validation of the determination of fatty acids in milk by gas chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.21, n.3, p.520-524, 2010.

SIMOPOULOS, A.P. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. **Biomedecine & Pharmacotherapy**, v.60, n.9, p.502-507, 2006.

TRIPATHI, M.K. Effect of nutrition on production, composition, fatty acids and nutraceutical properties of milk. **Advances in Dairy Research**, v.2, n.2, p.1-11, 2014.

ULBRICHT, T.L.V.; SOUTHGATE, D.A.T. Coronary heart disease: Seven dietary factors. **Lancet**, v.2, n.8773, p.985-992, 1991.

VARGAS, D.P.; NÖRNBERG, J.L.; MELLO, R.O.; SHEIBLER, R.B.; MILANI, M.P.; MELLO, F.C.B. Correlações entre contagem bacteriana total e parâmetros de qualidade do leite. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.20, n.4, p.241-247, 2013.

VARGAS, D. P.; NÖRNBERG, J. L.; MELLO, R. O.; SHEIBLER, R. B.; MELLO, F. C. B.; MILANI, M. P. Correlações entre contagem de células somáticas e parâmetros físico-químicos e microbiológicos de qualidade do leite. **Ciência Animal Brasileira**, v.15, n.4, p.473-483, 2014.

**3.4 Manuscrito III:**

**EFEITO DE SISTEMAS PRODUTIVOS, ESTAÇÕES DO ANO  
E TRATAMENTOS TÉRMICOS INDUSTRIAIS NA  
PRESENÇA DE AGROTÓXICOS NO LEITE DO RIO  
GRANDE DO SUL, BRASIL**



**Resumo** – O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de sistemas de produção, estações do ano e tratamentos térmicos industriais na presença de agrotóxicos no leite do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Para avaliar os extratos produtivos quanto à presença de agroquímicos, foram analisadas amostras compostas, confeccionadas a partir da amostragem mensal, de cada uma das propriedades rurais, durante um ano. Em cada unidade produtora de leite, foram aplicados questionários para caracterização dos distintos extratos estudados, os quais foram classificados em quatro sistemas de produção: altamente especializado, especializado, semiespecializado e não especializado. Na avaliação do efeito de estações do ano e dos tratamentos térmicos industriais (pasteurização e ultrapasteurização), foram coletadas mensalmente amostras dos silos de leite cru de uma indústria de laticínios, referentes a 15 municípios da região sul do Brasil e, posteriormente, amostras referentes às iniciais, após submissão aos distintos binômios de tempo e temperatura. Com a diminuição dos níveis de especialização das UPL, houve uma redução na quantidade de agrotóxicos no leite e, estes prevaleceram no outono, primavera e verão. Após os tratamentos térmicos, evidenciou-se o favorecimento da obtenção de um leite mais adequado à alimentação quanto à inocuidade de pesticidas.

**Palavras-chave:** agrotóxicos, componentes principais, qualidade do leite.

**Effect of productive systems, seasons and heat treatment in presence of pesticides in milk of Rio Grande do Sul, Brazil**

**Abstract** - The objective of this work was to evaluate the effect of production systems, seasons and industrial heat treatment in the presence of pesticides in milk of Rio Grande do Sul, Brazil. To evaluate the productive extracts for the presence of agrochemicals, were analyzed composite samples made from the monthly sampling of each of the farms for a year. In each unit producing milk, questionnaires were applied to characterize the different studied extracts, which were classified into four production systems: highly specialized, specialized, partially specialized, and nonspecialized.. In assessing the seasons effect and heating processes (high temperature short time - HTST and Ultra-high temperature - UHT) were monthly collected samples of raw milk of a dairies, related to 15 municipalities in southern Brazil, and later samples relating the initial, after submission to the distinct binomial of time and temperature. With decreased levels of specialization of UPL, there was a reduction in the amount of pesticides in milk and, these prevailed in the autumn, spring and summer. After the heat treatment, showed up favoring the attainment of better milk to food regarding the safety of pesticides.

**Keywords:** pesticides, principal components, milk quality.

## Introdução

O Rio Grande do Sul é o segundo maior produtor de leite do Brasil, sendo o quarto colocado entre os estados brasileiros que utilizam as maiores concentrações de agrotóxicos, perfazendo 10,8% do total empregado no país (IBGE, 2006; IBGE, 2015).

O leite é um líquido ideal para dissolução de agroquímicos, pois a maior parte deles são solúveis em gordura (HECK et al., 2007). Assim, quando aplicados de forma inadequada, os agrotóxicos podem contaminar o leite bovino por diferentes fontes, como: contaminação das pastagens, rações e cereais; contaminação do meio ambiente; uso nos currais e estabelecimentos de produção leiteira e; utilização através de produtos veterinários destinados ao gado leiteiro (KAN; MEIJER, 2007; KAMPIRE et al., 2011).

Assim, a expressiva heterogeneidade de sistemas de produção de leite em todas as unidades federativas do Rio Grande do Sul, representando-se por um reduzido número de produtores mais especializados (cerca de 20%) e um elevado número de pequenos produtores (cerca de 80%) e a grande diversidade edafoclimática existente, com acentuadas variações sazonais de produção (BODENMÜLLER FILHO et al., 2010; GABBI et al., 2013), podem resultar em diferentes níveis de exposição à grande variedade de agroquímicos atualmente utilizados.

O cenário do mercado de alimentos revela o grande interesse da sociedade quanto à inocuidade dos produtos consumidos, especialmente no que concerne aos resíduos de agrotóxicos (DAMALAS; ELEFTHEROHORINOS, 2011), pois os seus efeitos crônicos estão associados ao aumento da incidência de cânceres (JOBIM et al., 2010), endocrinopatias, neuropatias, entre outras (WAISSMANN, 2007). Dessa maneira, para garantir a segurança alimentar e a regulamentação do comércio externo, as agências governamentais de diversos países e da União Europeia têm estabelecido os limites máximos de resíduos (LMR) em alimentos (JARDIM et al., 2009). Nesse sentido, não é conhecido se os tratamentos térmicos industriais do leite conferem segurança para consumo quanto à presença de agrotóxicos (KAMPIRE et al., 2011).

Com a finalidade de analisar situações usuais que favoreçam a obtenção de um leite mais adequado à alimentação quanto à inocuidade de agrotóxicos, objetivou-se diagnosticar o comportamento de 93 agroquímicos frente a diferentes práticas de manejos produtivos adotadas no Rio Grande do Sul, nas distintas estações climáticas e tratamentos térmicos usualmente empregados nas indústrias lácteas.

## Material e Métodos

### Coleta de amostras

Três propriedades foram coletadas, mensalmente, durante as diferentes estações do ano, em quatro graus de especialização dos sistemas de produção: altamente especializado (AE), especializado (ES), semiespecializado (SE) e não especializado (NE) (Tabela 1), tendo-se coletado um total de 144 amostras, de 12 propriedades compreendidas em dez municípios do Rio Grande do Sul (Figura 1).

**Tabela 1.** Características dos sistemas de produção de leite altamente especializado (AE), especializado (ES), semiespecializado (SE) e não especializado (NE).

Sistema	Produção (litros/animal/dia)	Área (ha)	Concentrado (kg/vaca/dia)	Silagem <sup>(1)</sup>	Raça	Ordenha	Local	Refrigeração	Agrotóxicos
AE	>20	>15	>10	Sim	Definida	Circuito fechado	Sala própria	Com	Utilização intensiva
ES	15–20	10–15	4–10	Sim	Definida	Circuito aberto	Sala própria	Com	Utilização intensiva
SE	10–15	5–10	1–4	Sim	Não definida	Balde ao pé	Galpão	Com	Utilização usual
NE	5–10	1-5	<1	Não	Não definida	Balde ao pé	Galpão	Sem	Não utilizava

<sup>(1)</sup>Sim, silagem de milho como base do volumoso diário; Não, silagem de milho como parte do volumoso diário.



**Figura 1.** Localização da amostragem. As amostras de leite foram obtidas entre as latitudes 29°15'16" e 29°29'13"S; e longitudes 51°31'52" e 51°59'50"W do estado do Rio Grande do Sul, no sul do Brasil.

Posteriormente, para avaliar os distintos sistemas de produção quanto à presença de agrotóxicos, foram confeccionadas amostras compostas de cada uma das propriedades, totalizando 12 amostras.

Para avaliar o efeito de estações do ano e a possibilidade dos tratamentos térmicos usualmente empregados em nível industrial (pasteurização e ultrapasteurização) conferirem segurança para consumo de leite quanto à inocuidade de agroquímicos, foram coletadas mensalmente amostras dos silos de leite cru de uma indústria de laticínios, representando as estações (EST) primavera (PRIM), verão (VER), outono (OUT) e inverno (INV) e, amostras referentes às iniciais, após submissão aos distintos tratamentos térmicos, totalizando 36 amostras (12 de leite cru + 12 de leite pasteurizado + 12 de leite ultrapasteurizado).

As amostras de leite foram analisadas por método multirresíduos e multiclases para determinação e quantificação dos 93 resíduos de agrotóxicos.

### **Análise multirresíduos e multiclases de agrotóxicos**

#### *Extração das amostras e validação do método*

O procedimento de extração utilizado no estudo seguiu o método QuEChERS modificado proposto por Bandeira et al. (2014), consistindo de 5 mL de amostra em tubos de 50 mL, extraída com 5 mL de MeCN acidificada com 1% (v/v) de CH<sub>3</sub>COOH, seguida de agitação manual vigorosa por 1 min. Para a etapa de partição foram adicionados 2,0 g de MgSO<sub>4</sub> e 0,85 g de CH<sub>3</sub>COONa, seguida de agitação manual por 1 minuto e posterior centrifugação a 3.400 rpm por 8 minutos à 20 °C. A limpeza foi efetuada com 150 mg MgSO<sub>4</sub> + 125 mg C<sub>18</sub> + 62 mg de PSA, empregando a técnica de D-SPE com precipitação a baixa temperatura, seguidas de agitação e posterior centrifugação em tubos eppendorf de 2 mL a 10.000 rpm por 3 minutos à temperatura de 10 °C. Estipulou-se como parâmetro ideal, percentuais de recuperação entre 70 e 120% e os valores de desvios-padrão relativos (DPR ≤ 20%). Para determinar a qualidade do método, foram realizados estudos de recuperação com seis fortificações das amostras “branco” em três níveis diferentes de concentração (10,0; 25,0 e 50,0 µg L<sup>-1</sup>), totalizando 18 análises. Os níveis de fortificações foram escolhidos levando em consideração os limites máximos de resíduos (LMR) estabelecidos pela legislação internacional (Tabela 1). A precisão do método, em termos de repetibilidade e da precisão intermediária, foi avaliada em função do DPR dos resultados de recuperação. Os limites de detecção e quantificação foram determinados com base nos valores médios do “branco”

(Tabelas 2, 3 e 4).

### *Análises cromatográficas*

A análise cromatográfica dos praguicidas organoclorados, dinitroanilinas e piretróides foram conduzidas em um cromatógrafo a gás, modelo 6890N, acoplado com espectrômetro de massas, modelo 5975B inert XL CI/EI MSD, equipado com injetor automático *split/splitless*, modelo 7683, operando no modo *splitless* (Agilent Technologies®).

Foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida, J & W Scientific® DB5-MS (30 m x 0,25 mm x 0,20 µm). As análises foram realizadas no modo de ionização eletrônica, com energia de 70 eV, bem como, no modo de ionização química negativa, utilizando como gás ionizante o metano, a um fluxo otimizado de 40%, ambos no modo de monitoramento de íons selecionados.

Os parâmetros de operação do forno iniciaram-se com uma isoterma de 60 °C pelo período de 1 minuto, elevando-se 20 °C min<sup>-1</sup> até 150 °C, seguindo-se por um incremento de 2 °C min<sup>-1</sup> até 220 °C e 20 °C min<sup>-1</sup> até 280 °C, permanecendo por 11,5 minutos, totalizando 55 minutos de análise, a uma pressão do gás de arraste (Hélio) de 29,8 psi, com vazão constante de 1,6 mL min<sup>-1</sup>, enquanto o volume utilizado para a injeção foi de 1 µL.

Para as análises dos agrotóxicos organofosforados também foi utilizado um cromatógrafo a gás 6890N, acoplado a detector fotométrico de chamas GC-FPD, equipado com injetor automático *split/splitless*, modelo 7683 (Agilent Technologies®), atuando no modo *splitless*. Além disso, foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida, J & W Scientific® DB1 (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm).

A rampa de temperatura consistiu de 70 °C pelo período de 1 minuto, elevando-se 3 °C min<sup>-1</sup> até 180 °C, seguindo-se por um incremento de 5 °C min<sup>-1</sup> até 200 °C e 15 °C min<sup>-1</sup> até 280 °C, permanecendo por 8 minutos, totalizando 55 minutos de análise, a uma pressão inicial do gás de arraste (Hélio) de 28,5 psi, com vazão constante de 1,5 mL min<sup>-1</sup>, enquanto o volume utilizado para a injeção foi de 1 µL.

Nas análises dos pesticidas neonicotinoides e carbamatos e seus derivados, foi utilizado um cromatógrafo líquido 1200 Series, acoplado com espectrômetro de massas em série LC-MS/MS, modelo 6460, ambos da marca Agilent Technologies®. A ionização dos contaminantes foi através de uma fonte por *electrospray*, nos modos positivo e negativo (*ESI-Jet Stream*). Na separação dos compostos foi utilizada coluna Zorbax Extend C-18 (2,1 mm

de diâmetro interno, 100 mm de comprimento e poros de 1,8  $\mu\text{m}$ ) e as análises foram realizadas através de monitoramento de múltiplas reações.

A fase móvel consistiu em uma solução aquosa com 0,01 % de ácido fórmico e 10 mM de formiato de amônio, constituindo a solução A, enquanto a solução B foi composta unicamente de acetonitrila. O gradiente da solução B constituiu-se de um aumento de 20 % até 40 %, em 2 minutos, seguindo-se até 100 %, por um período de 10 minutos, permanecendo até completar 16 minutos de análise. A vazão usada foi de 0,3 mL  $\text{min}^{-1}$  e o volume de injeção foi de 10  $\mu\text{L}$ .

A identificação e quantificação dos compostos foram realizadas pela comparação dos tempos de retenção dos sinais cromatográficos encontrados nas amostras, com os tempos de retenção dos padrões de referência sob as mesmas condições de trabalho, bem como pela comparação dos íons majoritários de cada um dos compostos ou suas transições, obtidos a partir dos padrões de referência e dos íons encontrados nas amostras.

### **Análises estatísticas**

Para avaliação do efeito dos distintos tratamentos térmicos industriais, os dados foram considerados não métricos (discretos) quanto à presença ou ausência de resíduos tóxicos no leite cru, pasteurizado e esterilizado, com posterior transformação monotônica, pelo método dos quadrados mínimos primários (KRUSKAL, 1964). Em seguida, foram submetidos à análise de variância univariada (ANOVA), pelo procedimento GLM, ajustamento de médias pelo método dos quadrados mínimos ordinários, através do comando LSMEANS, e comparadas pela diferença mínima significativa (teste t).

No conjunto original dos 93 resíduos de agrotóxicos que representam as unidades produtoras de leite nos seus sistemas produtivos e entre as combinações referentes às distintas estações do ano e tratamento térmicos industriais, foram considerados os valores numéricos sem transformações, procedendo-se a análise de variância multivariada, pelo procedimento GLM e comando MANOVA, realizando o teste de Wilks, para testar a hipótese de que os vetores de médias dos tratamentos fossem nulos. Posteriormente, foi utilizada a análise de componentes principais (ACP), através do procedimento PRINCOMP.

As análises estatísticas foram executadas no aplicativo SAS<sup>®</sup> *System for Windows*<sup>™</sup> versão 9.0 (SAS Institute Inc., Cary - NC, USA).

## Resultados e Discussão

Constatou-se a presença de alguns representantes dos organofosforados (Pirimiphos, Chlorpyrifos, Diazinon, Parathion-Methyl, Malathion e Parathion-Ethyl) (Tabela 2), organoclorados ( $\alpha$ -Endosulfan e  $\beta$ -Endosulfan) (Tabela 3), dinitroanilina (Pendimethalin e Flumetralin), Piretróides (Bifenthrin,  $\lambda$ -Cyhalothrin, cis-Permethrin, trans-Permethrin, Cyfluthrin e Cypermethrin), neonicotinoides (Thiamethoxam e Imidacloprid) e carbamatos e seus derivados (Carbendazim, Carbofuran, Carbaryl e Thiophanate-Methyl) (Tabela 4) nas amostras de leite estudadas.

Aproximadamente 70% dos leites analisados apresentaram pelo menos um dos 93 agroquímicos, sendo que o grupo mais prevalente foi dos organofosforados (50%), seguido das dinitroanilina e piretróides (41,7%), carbamatos e derivados (33,4%), neonicotinoides (25%) e, por último, os organoclorados (12,5%).

Corroborando com estes resultados, Medeiros et al. (2009), afirmaram que entre os agrotóxicos mais empregados na pecuária brasileira, principalmente no combate de parasitas, destacam-se os organofosforados, carbamatos e piretróides. A porcentagem de amostras que apresentaram organofosforados é superior a resultados reportados na Europa, como os de Pagliuca et al. (2006) e Melgar et al. (2010), que encontraram respectivamente 35% e 8,7% deste grupo químico de pesticidas no leite. Por outro lado, assemelham-se a estudos brasileiros, onde Nero et al. (2004) e Nero et al. (2007), acharam respectivamente 74,4% e 93,8% das amostras com algum resíduo de organofosforados e/ou carbamatos, contra 80% deste estudo.

Os maiores índices encontrados no leite brasileiro podem ser reflexos do seu Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), onde no seu último relatório, publicado em 2012, foram analisadas apenas 13 alimentos (leite e derivados não foram contemplados), ou seja, cerca de 5% do que é avaliado pelos Estados Unidos da América (Food and Drug Administration-FDA) e Europa (European Food Safety Authority-EFSA).

Apesar de sua alta persistência no meio ambiente (MOR et al., 2010; GOVARTS et al., 2012), observam-se índices bastante baixos de organoclorados (12,5%), acordando-se com os resultados reportados por Melgar et al. (2010) (8,7%). Isto evidencia uma substituição destes compostos, principalmente por organofosforados, sendo um indício que o processo de controle e exclusão dos organoclorados do comércio mundial de agrotóxicos, a partir da

década de 70 e 80 (GOVARTS et al., 2012), começa a diminuir a sua bioacumulação na cadeia alimentar.

**Tabela 2.** Limites de detecção (LOD<sub>m</sub>), quantificação (LOQ<sub>m</sub>) e máximos de resíduos (LMR) dos agrotóxicos organofosforados.

Compostos	LOD <sub>m</sub>	LOQ <sub>m</sub>	LMR
Trichlorfon	0.001	0.005	0.01 <sup>(2)</sup>
Dimefox	0.001	0.005	-
Dichlorvos	0.001	0.005	0.01 <sup>(1)</sup>
Heptenophos	0.001	0.005	-
Thionazin	0.001	0.005	-
Ethoprophos	0.001	0.005	0.01 <sup>(1 e 2)</sup>
Phorate	0.001	0.005	0.01 <sup>(1 e 2)</sup>
Terbufos	0.001	0.005	0.01 <sup>(1 e 2)</sup>
Disulfoton	0.001	0.005	0.01 <sup>(1 e 2)</sup>
Formothion	0.001	0.005	-
Iprobenphos	0.001	0.005	-
Chlorphyrifos-M	0.001	0.005	0.01 <sup>(1 e 2)</sup>
Ronnel	0.001	0.005	-
Fenitrothion	0.001	0.005	0.01 <sup>(1 e 2)</sup>
Pirimiphos	0.001	0.005	0.01 <sup>(1)</sup> e 0.05 <sup>(2)</sup>
Fenthion	0.001	0.005	0.01 <sup>(2)</sup>
Chlorphyrifos	0.001	0.005	0.02 <sup>(1)</sup>
Bromophos-M	0.001	0.005	-
Chlorfenvinphos	0.001	0.005	0.01 <sup>(2)</sup>
Bromophos-E	0.001	0.005	-
Fenamiphos	0.001	0.005	0.005 <sup>(1 e 2)</sup>
Profenofos	0.001	0.005	0.01 <sup>(1 e 2)</sup>
Fensulfathion	0.001	0.005	-
Ethion	0.001	0.005	0.01 <sup>(2)</sup>
EPN	0.001	0.005	-
Azinphos-M	0.001	0.005	0.01 <sup>(2)</sup>
Azinphos-E	0.001	0.005	0.01 <sup>(2)</sup>
Pyrazophos	0.001	0.005	0.02 <sup>(2)</sup>
Dioxabenzophos	0.001	0.005	-
Cadusofos	0.001	0.005	-
Fonofos	0.001	0.005	-
Diazinon	0.001	0.005	0.02 <sup>(1 e 2)</sup>
Parathion-Methyl	0.001	0.005	0.01 <sup>(2)</sup>
Tolclofos-Methyl	0.001	0.005	0.05 <sup>(2)</sup>
Malathion	0.001	0.005	0.02 <sup>(2)</sup>
Parathion-Ethyl	0.001	0.005	0.05 <sup>(2)</sup>
Methidation	0.001	0.005	0.001 <sup>(1)</sup>
Tetraclorvinphos	0.001	0.005	-
Prothiophos	0.001	0.005	-
Triazophos	0.001	0.005	0.01 <sup>(2)</sup>
Phosalone	0.001	0.005	0.01 <sup>(2)</sup>
Total	-	-	-

<sup>(1)</sup>Codex Alimentarius (2015); <sup>(2)</sup>EFSA (2015).

Na avaliação da conformidade dos resíduos de inseticidas no leite com os limites propostos pelo Codex Alimentarius e Comissão Europeia, 37,5% das amostras estão em desconformidade com as normas vigentes em pelo menos um dos resíduos Pirimiphos,



Chlorpyrifos, Parathion-Ethyl, Pendimethalin, soma do cis-Permethrin e trans-Permethrin, Thiamethoxam e Carbofuran (Tabela 2, 3e 4). Destes, destaca-se que em duas amostras, os valores de Parathion-Ethyl (0.1100 mg Kg<sup>-1</sup>) (Tabela 2) e Thiamethoxam (0.1190 mg Kg<sup>-1</sup>) (Tabela 4) excederam em mais de duas vezes os limites propostos por essas normatizações.

**Tabela 3.** Limites de detecção (LOD<sub>m</sub>), quantificação (LOQ<sub>m</sub>) e máximos de resíduos (LMR) de agrotóxicos organoclorados.

Compostos	LOD <sub>m</sub>	LOQ <sub>m</sub>	LMR
α-HCH	0.0003	0.001	0.004 <sup>(2)</sup>
Hexaclobenzeno	0.0003	0.001	-
Dicloran	0.001	0.005	0.01 <sup>(2)</sup>
β-HCH	0.0003	0.001	0.003 <sup>(2)</sup>
Lindane	0.0003	0.001	0.01 <sup>(1)</sup> e 0.001 <sup>(2)</sup>
Chlorothalonil	0.001	0.005	0.07 <sup>(1)</sup> e 0.1 <sup>(2)</sup>
δ-HCH	0.0003	0.001	0.001 <sup>(2)</sup>
Heptachlor	0.0003	0.001	0.006 <sup>(1)</sup> e 0.004 <sup>(2)</sup>
Aldrin	0.0003	0.001	0.006 <sup>(1 e 2)*</sup>
Dieldrin	0.0003	0.001	0.006 <sup>(2)*</sup>
Chlorthal	0.0003	0.001	0.01 <sup>(2)</sup>
Heptachlor epoxide	0.0003	0.001	0.004 <sup>(2)</sup>
Captan	0.003	0.01	0.02 <sup>(2)</sup>
Folpet	0.003	0.01	-
γ-Chlordane	0.0003	0.001	0.002 <sup>(1 e 2)</sup>
α-Endosulfan	0.001	0.005	0.01 <sup>(1)</sup> e 0.05 <sup>(2)**</sup>
β-Endosulfan	0.001	0.005	0.05 <sup>(2)**</sup>
Endosulfan sulphate	0.001	0.005	0.05 <sup>(2)**</sup>
α-Chlordane	0.0003	0.001	0.002 <sup>(1 e 2)</sup>
o, p' -DDT	0.0003	0.001	0.04 <sup>(2)***</sup>
p,p' -DDE	0.0003	0.001	0.04 <sup>(2)***</sup>
p,p' -DDD	0.0003	0.001	0.04 <sup>(2)***</sup>
Endrin	0.003	0.01	0.0008 <sup>(2)</sup>
Nitrofen	0.0003	0.001	0.01 <sup>(2)</sup>
Endrin aldeyde	0.003	0.01	-
Endrin ketone	0.003	0.01	-
Methoxychlor	0.003	0.01	0.01 <sup>(2)</sup>
Dimethomorph	0.001	0.005	0.01 <sup>(1 e 2)</sup>
Mirex	0.001	0.005	-

<sup>(1)</sup>Codex Alimentarius (2015); <sup>(2)</sup>EFSA (2015); \*Aldrin e Dieldrin (expresso em dieldrin); \*\*soma de α-Endosulfan, β-Endosulfan e Endosulfan sulphate (expresso em endosulfan); \*\*\*soma de p, p' -DDT, o, p' -DDT, p,p- DDE, p,p- DDD (expresso em DDT).

O neonicotinoide Thiamethoxam é um inseticida levemente tóxico (classe III) segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2015). Por outro lado, o Parathion-Ethyl é um dos mais tóxicos organofosforados utilizados na agricultura e pecuária (TABASSUM et al., 2014), com uma DL<sub>50</sub>, via oral, menor que 50 mg Kg<sup>-1</sup> de massa corpórea, classificando-se segundo WHO (2015), como altamente tóxico (Classe Ia).

Portanto, o Thiamethoxam e Parathion-Ethyl merecem atenção quanto aos manejos de aplicação, prioritariamente o segundo, pois os pesticidas paration inibem a enzima colinesterase, aumentando a concentração de acetilcolina, o que acarreta distúrbios no tecido

muscular e órgãos vitais (RICHINS et al., 2000). Nesse sentido, Hoppin et al. (2002) relataram que a exposição a estes organofosforados está relacionada ao aparecimento de doenças respiratórias em agricultores e, segundo Guivarch et al. (2003) são extremamente tóxicos para peixes e invertebrados aquáticos.

**Tabela 4.** Limites de detecção (LOD<sub>m</sub>), quantificação (LOQ<sub>m</sub>) e máximos de resíduos (LMR) dos agrotóxicos Dinitroanilina, Piretróides, Neonicotinóide e, Carbamatos e derivados.

Compostos	Classe	LOD <sub>m</sub>	LOQ <sub>m</sub>	LMR
Trifluralin	Dinitroanilina	0.001	0.005	0.01 <sup>(2)</sup>
Benfluralin	Dinitroanilina	0.001	0.005	0.02 <sup>(2)</sup>
Butralin	Dinitroanilina	0.001	0.005	0.01 <sup>(2)</sup>
Isopropalin	Dinitroanilina	0.001	0.005	-
Pendimethalin	Dinitroanilina	0.001	0.005	0.01 <sup>(2)</sup>
Flumetralin	Dinitroanilina	0.001	0.005	-
Bifenthrin	Piretróides	0.001	0.005	0.2 <sup>(1 e 2)</sup>
λ-Cyhalothrin	Piretróides	0.0004	0.002	0.05 <sup>(2)</sup>
Cypermethrin	Piretróides	0.0004	0.002	0.05 <sup>(1 e 2)*</sup>
cis-Permethrin	Piretróides	0.003	0.01	0.05 <sup>(2)*</sup>
trans-Permethrin	Piretróides	0.003	0.01	0.05 <sup>(2)*</sup>
Cyfluthrin	Piretróides	0.0004	0.002	0.01 <sup>(1)</sup> e 0.02 <sup>(2)</sup>
Flucythrinate	Piretróides	0.0004	0.002	0.05 <sup>(2)</sup>
cis-Fenvalerate	Piretróides	0.0004	0.002	0.1 <sup>(1)**</sup>
trans-Fenvalerate	Piretróides	0.0004	0.002	0.1 <sup>(1)**</sup>
Deltamethrin	Piretróides	0.0008	0.004	0.05 <sup>(1 e 2)</sup>
Thiamethoxam	Neonicotinóide	0.0003	0.001	0.05 <sup>(1 e 2)</sup>
Imidacloprid	Neonicotinóide	0.0003	0.001	0.1 <sup>(1 e 2)</sup>
Carbendazim	Benzimidazol Carbamato	0.0003	0.001	0.05 <sup>(1 e 2)</sup>
Carbofuran	Metilcarbamato de benzofuranila	0.0003	0.001	0.01 <sup>(2)</sup>
Carbaryl	Carbamato	0.0003	0.001	0.05 <sup>(1 e 2)</sup>
Propamocarb	Carbamato	0.0003	0.001	0.01 <sup>(1 e 2)</sup>
Thiophanate-Methyl	Benzimidazol Carbamato	0.0003	0.001	0.05 <sup>(2)</sup>

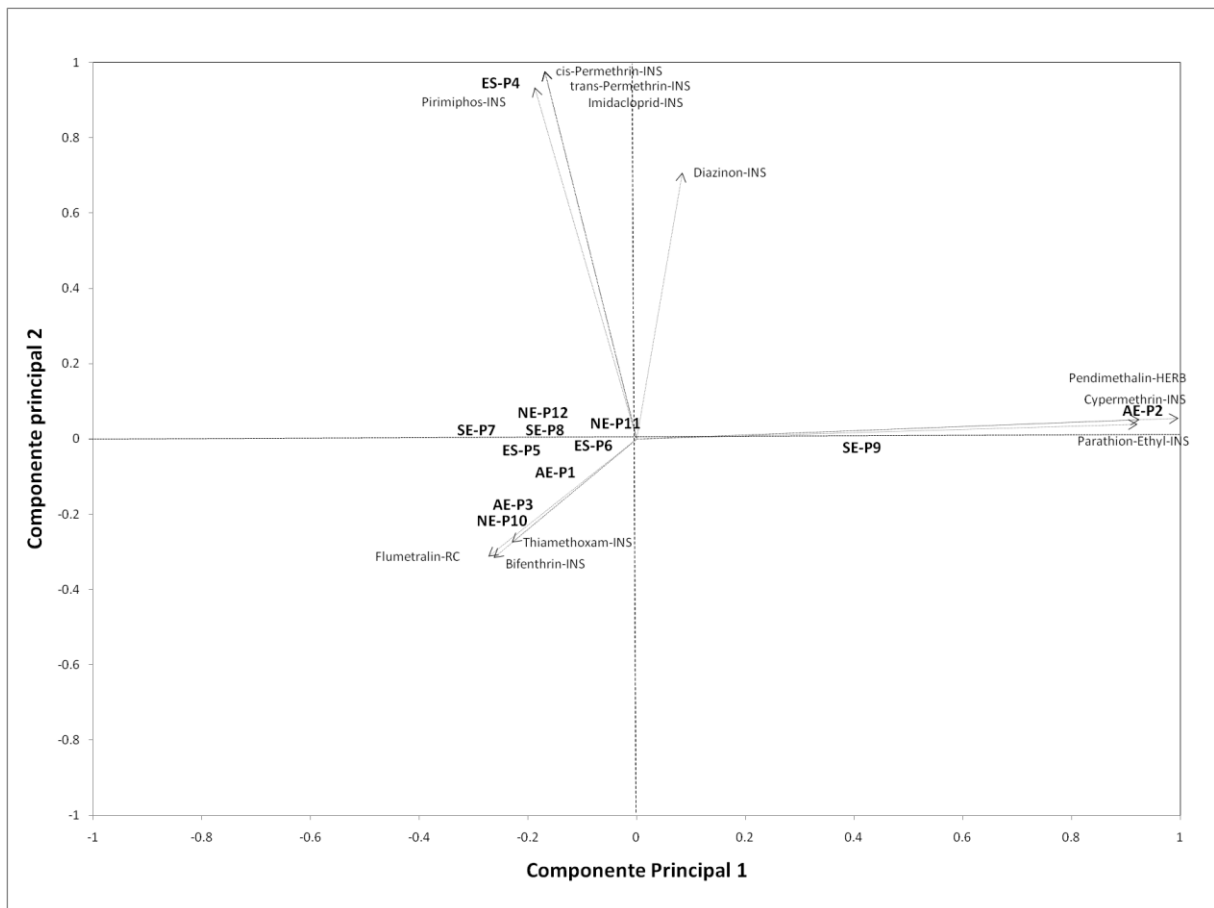
<sup>(1)</sup>Codex Alimentarius (2015); <sup>(2)</sup>EFSA (2015); \*Soma dos isômeros Cypermethrin; \*\*Qualquer isômero de Fenvalerate.

Na análise de variância multivariada dos níveis de especialização, pelo teste de Wilks, verificou-se diferença ( $P < 0,05$ ) entre os vetores de médias para as propriedades leiteiras e seus respectivos níveis de especialização (PROP- NE), sendo que o primeiro autovalor explicou 60,70% e o segundo 26,39%, totalizando 87,09% da variação total dos dados relacionados aos resíduos de pesticidas nos distintos níveis de especialização (Figura 1).

Através da inspeção gráfica visual dos componentes principais, constatou-se que as variáveis Parathion-Ethyl ( $r = 0,99$ ;  $P < 0,001$ ), Pendimethalin ( $r = 0,92$ ;  $P < 0,001$ ) e Cypermethrin ( $r = 0,92$ ;  $P < 0,001$ ) explicaram a variabilidade no eixo x (CP1, componente principal 1), ao passo que as Pirimiphos ( $r = 0,93$ ;  $P < 0,001$ ), Diazinon ( $r = 0,71$ ;  $P < 0,01$ ), cis-Permethrin ( $r = 0,98$ ;

$P < 0,001$ ), trans-Permethrin ( $r = 0,98$ ;  $P < 0,001$ ) e Imidacloprid ( $r = 0,98$ ;  $P < 0,001$ ) do eixo y (CP2, componente principal 2).

Logo, observa-se que com a diminuição dos níveis de especialização das UPL, houve uma redução na quantidade de pesticidas no leite (propriedades situadas no centro do plano cartesiano). Isto ocorre, pois nos extratos produtivos mais especializados há utilização de agrotóxicos em alguma etapa de produção, o que pode contaminar o leite por diferentes fontes, como: contaminação das pastagens, rações e cereais; contaminação do meio ambiente; uso nos currais e estabelecimentos de produção leiteira e; utilização através de produtos veterinários destinados ao gado leiteiro (KAN; MEIJER, 2007; KAMPIRE et al., 2011).



**Figura 2.** Projecção bidimensional dos “escores” das doze propriedades leiteiras aninhadas nos níveis produtivos altamente especializado (AE), especializado (ES), semiespecializado (SE) e não especializado (NE), e as “cargas” (correlações existentes entre as variáveis e os componentes principais) dos pesticidas encontradas no leite de seus tanques de refrigeração.

Sendo assim, as unidades produtivas AE e ES possuem características importantes para o aumento destes compostos químicos no leite, no entanto, observa-se que as

propriedades 1 (nível AE) e 5 (nível ES) deslocaram-se para a origem do plano cartesiano, onde alocaram-se os menores níveis de pesticidas do estudo. Como a utilização de agrotóxicos em alguma etapa da produção animal é fato indiscutível (KONSTANTINOU et al., 2006), estas unidades produtivas específicas (1 e 5), possuem aspectos importantes a serem considerados, pois faziam uso de inseticidas, no entanto mantiveram os seus níveis baixos no leite.

Entre os representantes dos níveis NE, evidencia-se um afastamento da propriedade 10 do centro da dispersão gráfica (Figura 1). Isto se deve aos únicos pesticidas que aparecem em quantidades acima dos seus limites de quantificação nos leites referentes a este extrato produtivo, representado pelos praguicidas, piretroide Bifenthrin e neonicotinoide Thiamethoxam e, o regulador de crescimento dinitroanilina Flumetralin. Devido a proximidade de localização entre as propriedades 3 (AE) e 10 (NE), a primeira parece estar influenciando a segunda quanto a presença de pesticidas no leite. Essas evidências reforçam-se na pequena distância entre estas unidades de produção na dispersão gráfica (Figura 1).

Por outro lado, na análise de variância multivariada das distintas combinações de tratamentos térmicos e estações (EST), verificou-se diferença ( $P < 0,05$ ) entre os vetores de médias pelo teste Wilks. Os três primeiros autovalores foram significativos pelo teste da razão de verossimilhança, sendo que o primeiro autovalor explicou 46,77% e o segundo 28,52%, ou seja, os dois primeiros autovalores explicaram 75,29% da variação total dos dados relacionados ao comportamento dos resíduos de pesticidas nas EST, e dos tratamentos térmicos industriais (Figura 1).

Através da inspeção gráfica visual dos componentes principais, constatou-se que as variáveis Chlorphyrifos ( $r = 0,77$ ;  $P < 0,001$ ), Flumetralin ( $r = 0,82$ ;  $P < 0,001$ ),  $\lambda$ -Cyhalothrin ( $r = 0,61$ ;  $P < 0,05$ ), Thiamethoxam ( $r = 0,76$ ;  $P < 0,01$ ) e Imidacloprid ( $r = 0,91$ ;  $P < 0,001$ ) explicaram a variabilidade no eixo x (CP1, componente principal 1), ao passo que as Chlorphyrifos ( $r = 0,61$ ;  $P < 0,05$ ), Parathion-Ethyl ( $r = -0,85$ ;  $P < 0,001$ ),  $\alpha$ -Endosulfan ( $r = -0,85$ ;  $P < 0,001$ ),  $\beta$ -Endosulfando ( $r = -0,85$ ;  $P < 0,001$ ),  $\lambda$ -Cyhalothrin ( $r = -0,72$ ;  $P < 0,01$ ) e Thiamethoxam ( $r = -0,64$ ;  $P < 0,05$ ) eixo y (CP2, componente principal 2).

Observa-se que os resíduos de pesticidas prevaleceram no OUT, PRIM e VER (Figura 2). No OUT, devido ao aumento da suplementação dietética com silagem de milho e concentrado frente à deficitária disponibilidade forrageira, resultou possivelmente na elevação desta classe de agrotóxico no leite, já que segundo Pignati et al. (2014), na cultura do milho e soja (principais constituintes da ração concentrada), se utilizam grandes quantidades de agrotóxicos.

Segundo levantamento de dados disponibilizado pela indústria estudada, na cultura do milho safrinha, eleva-se a aplicação de inseticidas no solo (Carbofuran), na semeadura (Imidacloprid) e na área foliar (Chlorpyrifos), o que explica o incremento destes compostos nos leites de PRIM e VER (Figura 2). Reforçando essas evidências, observa-se um aumento do herbicida Pendimethalin e do fungicida Carbendazim nesta época do ano (Figura 2) devido a seu uso na semeadura (Carbendazin) e na pré-emergência (Pendimethalin) do milho.

Como no INV aumenta a participação de forrageiras temperadas na dieta dos animais, e não é prática comum a utilização de agroquímicos nas pastagens predominantes na região (*Avena strigosa* e *Lolium multiflorum*), observaram-se os menores valores de agrotóxicos nessa estação climática (Figura 2).

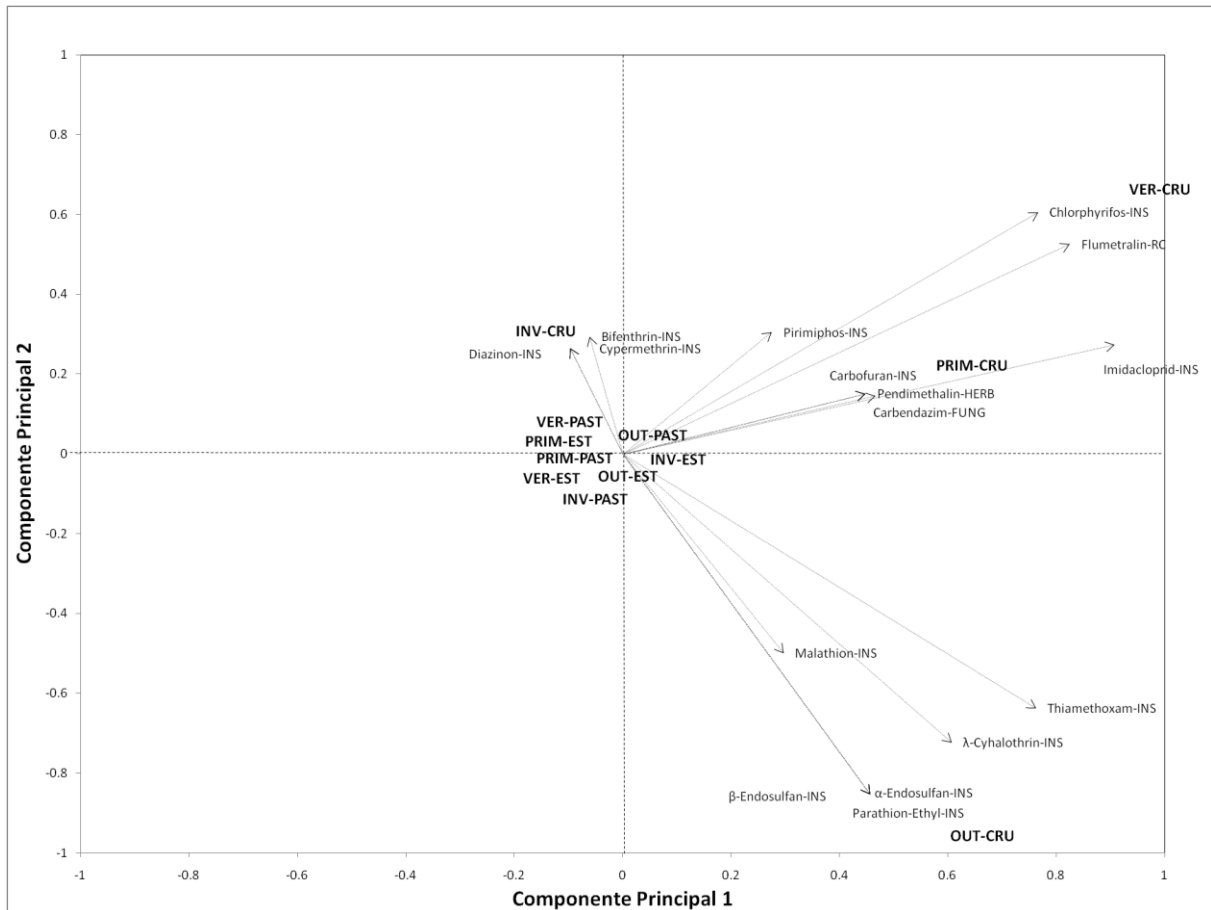
Após a aplicação dos tratamentos térmicos usualmente utilizados nas indústrias laticinistas, as combinações de estações e estes distintos binômios de tempo e temperatura migraram-se para a origem do plano cartesiano, evidenciando-se o favorecimento da obtenção de um leite mais adequado à alimentação quanto à inocuidade de pesticidas (Figura 2).

Nesse sentido, através da análise de variância univariada (ANOVA), observa-se que tanto a pasteurização quanto a ultrapasteurização são capazes de eliminar em nível de 0.1% de significância os pesticidas Pirimiphos (P=0.0002), Chlorpyrifos (P=0.0002), Parathion-Methyl (P=0.0004), Pendimethalin (P=0.0002), Flumetralin (P=0.0002),  $\lambda$ -Cyhalothrin (P=0.0002), Carbendazim (P=0.0002) e Thiophanate-methyl (P=0.0002), em 1% de significância os Parathion-Ethyl (P=0.0052),  $\alpha$ -Endosulfan (0.0052),  $\beta$ -Endosulfan (0.0052), Bifenthrin (0.0100), Carbofuran (P=0.0011) e Carbaryl (P=0.0039) e ao nível de 10% de significância os Malathion (P=0.0970), Thiamethoxam (P=0.0819) e Imidacloprid (P=0.0819). Por outro lado, apesar de não serem detectados resíduos de pesticidas nas amostras de leite pasteurizado e ultrapasteurizados referentes ao leite cru inicial, não houve efeito significativo de tratamento térmico para o organofosforado Diazinon (P=0.2363) e o piretroide Cypermethrin (P=0.2363).

Corroborando com esses resultados, Melgar et al. (2010) pesquisaram a presença de resíduos de organofosforados empregados no controle de ectoparasitas em gado ou na ração animal, em 312 amostras, dividindo-se em 70 de alimentos infantis à base de leite e 242 de leite “in natura”, sendo que nas amostras de alimentos infantis, que utilizavam leites submetidos a tratamentos térmicos industriais, não foram detectados resíduos de agrotóxicos.

Kampire et al. (2011) analisaram 50 amostras de leite cru e 47 de leite pasteurizado, constatando-se que a pasteurização é capaz de degradar e eliminar os resíduos de organoclorados no leite. No entanto, ressalta-se que neste ensaio os leites pasteurizados e

esterilizados não são referentes ao leite cru inicialmente analisado, portanto não é adequado fazer afirmações quanto à eficiência dos distintos tratamentos térmicos, pois estes resultados podem ser decorrentes das particularidades de manejos de produção da localidade de coleta.



**Figura 3.** Projeção bidimensional dos “escores” das combinações entre as estações do ano primavera (PRIM), verão (VER), outono (OUT) e inverno (INV) com os tratamentos térmicos industriais, pasteurização (PAST) e esterilização comercial (EST) e as “cargas” (correlações existentes entre as variáveis e os componentes principais) dos pesticidas encontradas no leite

Por outro lado, Mezcua et al. (2007) analisaram 25 amostras de leite em pó, nas quais foram detectados resíduos de  $\alpha$ -Endosulfan,  $\beta$ -Endosulfan, Chlorpyrifos e Bifenthrin, evidenciando-se uma contaminação pós tratamento térmico do leite, já que os resultados deste estudo mostram a capacidade de eliminação destes resíduos de pesticidas com a pasteurização inicial do leite.

Assim, os resultados obtidos, reforçam a importância do tratamento térmico do leite para a segurança alimentar do consumidor, visto que foram capazes de degradar ou eliminar os resíduos de pesticidas presentes no leite cru.

## Conclusões

Nas estações primavera, verão e outono e nos níveis de maior especialização encontraram-se os maiores valores de resíduos de agrotóxicos no leite. No entanto, os tratamentos térmicos industriais mostraram-se eficientes para degradar ou eliminar os praguicidas presentes no leite cru refrigerado, evidenciando-se a importância destes distintos binômios de tempo e temperatura para a inocuidade do leite consumido, especialmente em relação aos resíduos de agrotóxicos.

## Referências

BODENMÜLLER FILHO, A.; DAMASCENO, J. C.; PREVIDELLI, I. T. S.; SANTANA, R. G., RAMOS, C. E. C. O.; SANTOS, G. T. Tipologia de sistemas de produção baseada nas características do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.8, p.1832-1839, 2010.

CARVALHO, R.A.; OMOTO, C.; FIELD, L.M.; WILLIAMSON, M.S.; BASS, C. Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **Plos One**, v.8, n.4, p.1-11, 2013.

CODEX ALIMENTARIUS. Pesticide Residues in Food: Maximum Residue Limits; Extraneous Maximum Residue Limits. Roma. Disponível em: <[http://www.codexalimentarius.net/mrls/servlet/PesticideServlet?Pesticides=0&Items=36&Items=%3E36&out\\_style=by+substance&Domain=PesticideMRLs&Language=english&query\\_form=%2Fmrls%2Fpestdes%2Fpest\\_q-e.htm](http://www.codexalimentarius.net/mrls/servlet/PesticideServlet?Pesticides=0&Items=36&Items=%3E36&out_style=by+substance&Domain=PesticideMRLs&Language=english&query_form=%2Fmrls%2Fpestdes%2Fpest_q-e.htm)>. Acesso em: 25 jun 2015.

DAMALAS, C.A. & ELEFTHEROHORINOS, I.G. Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.8, n.5, p.1402–1419, 2011.

EFSA- European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance thiamethoxam. **EFSA Journal**, v.11, n.1, p.1-68, 2013.

EUROPEAN COMMISSION. Directorate General for Health & Consumers. Pesticides EU-MRIs: Updated on 11/10/2010. Disponível em: <[http://ec.europa.eu/sanco\\_pesticides/public/index.cfm](http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm)>. Acesso em: 25 jun 2015.

GABBI, A.M.; MCMANUS, C.M.; SILVA, A.V.; MARQUES, L.T.; ZANELA, M.B.; STUMPF, M.P.; FISCHER, V. Typology and physical–chemical characterization of bovine milk produced with different productions strategies, **Agricultural Systems**, v.121, p.130–134, 2013.

GOVARTS, E; NIEUWENHUIJSEN, M.; SCHOETERS, G; BALLESTER, F; BLOEMEN, K; DE BOER, M.; CHEVRIER, C.; EGGESBØ, M., Guxens, M.; Krämer, U.; Legler, J.; Martínez, D.; Palkovicova, L.; Patelarou, E.; Ranft, U.; Rautio, A.; Skaalum, P.; Slama, R.; Stigum, H.; Toft, G.; Trnovec, T.; Vandentorren, S.; Weihe, P.; Weisglas, N.K.; Wilhelm, M.; Wittsiepe, J.; Bonde, J.P.; OBELIX/ENRIECO. Birth Weight and Prenatal Exposure to Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Dichlorodipenyldichloroethylene (DDE): A Meta-analysis within 12 European Birth Cohorts. **Environmental Health Perspectives**, n.120, p.162–170, 2012.

GUIVARCH, E.; OTURAN, N.; OTURAN, M.A. Removal of organophosphorus pesticides from water by electrogenerated Fenton's reagent. **Environmental Chemistry Letters**, v.1, n.3, p.165-168, 2003.

HECK, M.C.; SIFUENTES DOS SANTOS, J.; BOGUSZ JUNIOR, S.; COSTABEBER, I.; EMANUELLI, T. Estimation of children exposure to organochlorine compounds through milk in Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Chemistry**, v.102, n.1, p.288-294, 2007.

HOPPIN, J.A.; UMBACH, D.M.; LONDON, S.J.; ALAVANJA, M.C.R; SANDLER, D.P. Chemical predictors of wheeze among farmer pesticide applicators in the agricultural health study. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.165, p.683-689, 2002.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE ESTATÍSTICA E GEOGRAFIA. Censo agropecuário do Brasil.2006. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10 jun. 2015.



IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE ESTATÍSTICA E GEOGRAFIA. Indicadores IBGE: Estatística da produção pecuária .2015. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 12 dez. 2015.

JARDIM, F.S.C.I.; ANDRADE, A.A.; QUEIROZ, N.C.S. Resíduos de Agrotóxicos em alimentos: Uma preocupação ambiental Global - Um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v.32, n.4, p.996-1012, 2009.

JOBIM, C.F.P.; NUNES, N.L.; GIUGLIANI, R.; CRUZ, M.B.I. Existe uma associação entre mortalidade por câncer e uso de agrotóxicos? Uma contribuição ao debate. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.15, n.1, p.277-288, 2010.

KAMPIRE, E.; KIREMIRE, B.T.; NYANZI, S.A.; KISHIMBA, M. Organochlorine pesticide in fresh and pasteurized cow's milk from Kampala markets. **Chemosphere**, v.84, n.7, p.923-927, 2011.

KAN, A.C.; MEIJER, I.A.G. The risk contamination of food with toxic substances present in animal feed. **Animal Feed Science and Technology**, v.133, n.1-2, p.84-108, 2007.

KONSTANTINOU, I.K.; HELA, D.G.; ALBANIS, T.A. The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. **Environmental Pollution**, v.141, n.3, p.555-570, 2006.

MEDEIROS, R.J.; MONTEIRO, F.O.; SILVA, G.C.; NASCIMENTO JUNIOR, A. Casos de intoxicações exógenas em cães e gatos atendidos na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense durante o período de 2002 a 2008. **Ciencia Rural**, v.39, n.7, p.2105-2110, 2009.

MELGAR, M.J.; SANTAEUFEMIA, M.; GRACIA, M.A. Organophosphorus pesticide residues in milk and infant formulas from Spanish northwest. **Journal of environmental Science & Health**, v.45, n.7, p.595-600, 2010.

MOR, F.; OZMEN, O. Endosulfan-induced neurotoxicity and serum acetylcholinesterase inhibition in rabbits: The protective effect of Vit C. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.96, p.108–112, 2010.

MEZCUA, M.; REPETTI, M. R.; AGÜERA, A.; FERRER, C.; GARCÍAREYES, J.F.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Determination of pesticides in milk-based infant formulas by pressurized liquid extraction followed by gas chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.389, n.6, p.1833-1840, 2007.

NASS (National Agricultural Statistics Service) (2013). Acreage. USDA, Washington DC. USA. Disponível em: <<http://usda01.library.cornell.edu/usda/current/Acre/Acre-06-28-2013.pdf>>. Acesso em 17 Jun 2015.

NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; NETTO, D.P.; PINTO, J.P. A.N.; ANDRADE, N.J.; SILVA, W.P.; FRANCO, B.D.G.M. Hazards in non-Pasteurized Milk on Retail Sale in Brazil: Prevalence of *Salmonella* Spp, *Listeria Monocytogenes* and Chemical Residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.211-215, 2004.

NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; NETTO, D.P.; FRANCO, B.D.G.M. Organofosforados e carbamatos no leite produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e ação sobre *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, p.201-204, 2007.

PAGLIUCA, G.; SERRAINO, A.; GAZZOTTI, T.; ZIRONI, E.; BORSARI, A.; ROSMINI, R. Organophosphorus pesticides residues in Italian raw milk. **Journal of Dairy Research**, v.73, n.3, p.340–344, 2006.

PIGNATI, W.; OLIVEIRA, N.P. da SILVA, A.M.C. Vigilância aos agrotóxicos: quantificação do uso e previsão de impactos na saúde-trabalho-ambiente para os municípios brasileiros. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.19, n.12, p. 4669-4678, 2014.

RICHINS, R.D.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Expression, immobilization, and enzymatic characterization of cellulose-binding domain-organophosphorus hydrolase fusion enzymes. **Biotechnology and Bioengineering**, v.69, n.6, p.591-596, 2000.

TABASSUM, N.; RAFIQUE, U.; BALKHAIR, K.S.; ASHRAF, M.A. Chemodynamics of Methyl Parathion and Ethyl Parathion: Adsorption Models for Sustainable Agriculture. **BioMed Research International**, v.2014, p.1-8, 2014.

WAISSMANN, W. Agrotóxicos e doenças não transmissíveis. **Ciência &Saúde Coletiva**, v.12, n.1, p.20-21, 2007.

WHO – World Health Organization. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard And Guidelines to Classification. Geneva: World Health Organization. 2009b. Disponível em: <[http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides\\_hazard\\_2009.pdf](http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf)>. Acesso em 17 jan 2015.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O termo qualidade é amplamente discutido nos diversos setores envolvidos com a cadeia láctea mundial, entre eles, produtores, indústrias laticinistas e a comunidade científica.

Com o intuito de auxiliar na definição dos preços pagos aos produtores e nas ações de assistência técnica, as indústrias laticinistas contam com uma base de informações mensais das características do leite, contemplando dois aspectos principais, a composição centesimal e aspectos higiênico-sanitários. Entretanto, a eficiência com que essa base de informações tem sido utilizada tem esbarrado na ausência de ferramentas de análise que simplifiquem o campo de ação. Assim, através de técnicas estatísticas multivariadas, este estudo proporcionou uma metodologia de otimização da utilização destes bancos de dados.

Com a maior divulgação e/ou acesso à informação sobre o papel dos alimentos na saúde, o conceito de qualidade tem se tornado mais abrangente, levando em consideração aspectos ligados à composição de produtos, relacionando-a com uma alimentação mais adequada. Estas perspectivas são dirigidas a uma nova classe de alimentos, denominadas de “alimentos nutracêuticos”, que é capaz de proporcionar benefícios médicos e de saúde aos consumidores. Além disso, o cenário atual da produção de alimentos revela o grande interesse da sociedade quanto à inocuidade dos produtos consumidos, especialmente no que diz respeito aos resíduos de agrotóxicos, que quando aplicados de forma inadequada, podem contaminar o leite.

Com os resultados deste estudo foi possível avaliar a potencialidade nutracêutica do leite bovino, através da criação do índice nutracêutico, e diagnosticar condições naturais de manejo nas distintas estações climáticas e tratamentos térmicos industriais (pasteurização e ultrapasteurização), que favorecem a produção de um leite mais adequado à alimentação humana.

Os sistemas de produção e as estações do ano interferem de forma conjunta no perfil de ácidos graxos, e de forma isolada na qualidade química e microbiológica do leite. As maiores contagens de células somáticas e os menores conteúdos de proteína foram observados no verão, e o grau de especialização das unidades produtivas esteve indiretamente relacionado com a contagem bacteriana total no leite. No inverno, sistemas não especializados produziram leite com melhor índice nutracêutico, com os maiores teores de ácidos graxos poli-insaturados, ácido rumênico (CLA, 18:2n7 - c9, t11) e ácido t10,c12-octadecadienoico (CLA, 18:2n6 – t10, c12). Além disso, com a elevação dos níveis de especialização das UPL e principalmente na primavera, verão e outono aumentaram-se os valores de resíduos de

pesticidas no leite. No entanto, os tratamentos térmicos industriais (pasteurização e ultrapasteurização) mostraram-se eficientes para degradar ou eliminar os praguicidas presentes no leite cru refrigerado, evidenciando-se a importância destes distintos binômios de tempo e temperatura para a inocuidade do leite consumido, especialmente em relação aos resíduos de agroquímicos.

Os resultados finais possibilitaram identificar situações que favorecem a produção de um leite diferenciado, com potencialidade nutracêutica, qualidade química e microbiológica, que é de grande interesse para a saúde dos consumidores, e conseqüentemente, para as indústrias e os produtores, pela possível agregação de valor no produto final.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKMAN, R.G. The analyses of fatty acids and related materials by gás-liquid chromatography. **Progress in the Chemistry of fats & Other lipids**, v.12, p.165-284, 1972.

ALEIXO, S.S.; SOUZA, J.G.; FERRAUDO, A.S. Técnicas de análise multivariada na determinação de grupos homogêneos de produtores de leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.6, p.2168-2175, 2007 (supl.).

BAER, D.J.; JUDD, J.T.; CLEVIDENCE, B.A.; TRACY, R.P. Dietary fatty acids affect plasma markers of inflammation in healthy men fed controlled diets: a randomized crossover study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, n.6, p.969-973, 2004.

BAIRD, C.; CANN, M. **Química Ambiental**. Porto Alegre: Bookman, 4 ed., 2011. 844p.

BARGO, F.; DELAHOY, J.E.; SCHROEDER, G.F.; BAUMGARD, L.H.; MULLER, L.D. Supplementing total mixed rations with pasture increase the content of conjugated linoleic acid in milk. **Animal Feed Science and Technology**, v.131, n.10, p.226-240, 2006.

BERTOLINO, C.N.; CASTRO, T.G.; SARTORELLI, D.S.; FERREIRA, S.R.G.; CARDOSO, M.A. Influência do consumo alimentar de ácidos graxos trans no perfil de lipídios séricos em nipo-brasileiros de Bauru, São Paulo, Brasil, **Caderno Saúde Pública**, v.22, n.2, p.357-364, 2006.

BETANCOURT, K.; IBRAHIM, M.; VILLANUEVA, C.; VARGAS, B. Caracterización del manejo productivo de sistemas lecheros en la cuenca del río Bulbul de Matiguás. **Livestock Research for Rural Development**, v.17, n.7, 2005.

BHAT, Z.F.; BHAT, H. Milk and dairy products as funcional foods. A review. **International Journal of Dairy Science**, v.6, n.1, p.1-12, 2011.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extration and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**. v.37, n.8, p.911-917, 1959.

BODENMÜLLER FILHO, A.; DAMASCENO, J. C.; PREVIDELLI, I. T. S.; SANTANA, R. G., RAMOS, C. E. C. O.; SANTOS, G. T. Tipologia de sistemas de produção baseada nas características do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.8, p.1832-1839, 2010.

BRASIL. **Instrução Normativa n. 51 de 18 de setembro de 2002**. Dispõe sobre regulamentos técnicos aplicados ao leite cru refrigerado e pasteurizado. Diário Oficial da União, Brasília, 20 set. 2002. Seção 1, n. 183, p.13-22.

BRASIL. **Instrução Normativa n. 62 de 29 de dezembro de 2011**. Dispõe sobre regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, leite Cru refrigerado, leite pasteurizado e do regulamento técnico de coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. Disponível em: <[http://www.sindilat.com.br/gomanager/arquivos/IN62\\_2011\(2\).pdf](http://www.sindilat.com.br/gomanager/arquivos/IN62_2011(2).pdf)> Acesso em: 05/05/2012.

BUENO, V.F.F.; MESQUITA, A.J.; NICOLAU, E.S.; OLIVEIRA, A.N.; OLIVEIRA, J.P.; NEVES, R.B.S.; MANSUR, J.R.G.; THOMAZ, L.W. Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. **Ciência Rural**, v.35, n.4, p.848-854, 2005.

BULLETIN of the International Dairy Federation. Payment systems for ex-farm milk. Brussels: **International Dairy Federation**, 2006. 106 p. Bulletin 403/2006.

CAJKA, T.; HAJŠLOVA, J.; LACINA, O.; MASTOVSKA, K.; LEHOTAY, S.J. Rapid analysis of multiple pesticide in fruitbased baby food using programmed temperature vaporiser injection lowpressure gas chromatography-highresolution time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v.1186, n.2, p.281-294, 2008.

CARVALHO, R.A.; OMOTO, C.; FIELD, L.M.; WILLIAMSON, M.S.; BASS, C. Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **Plos One**, v.8, n.4, p.1-11, 2013.

CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; LOOR, J.; ROUEL, J.; MARTIN, B. Trans and conjugated fatty acids in milk from cows and goats consuming pasture or receiving vegetable oils or seeds. **Italian Journal of Animal Science**, v.1, p.243-254, 2002.

CHILLIARD, Y; FERLAY, A; DOREAU, M. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. **Livestock Production Science**. v.70, n.1-2, p.31-48, 2001.

CHRISTIE, W.W. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesterol esters. **Journal of Animal Science**, v.23, p.1072-1077, 1982.

CODEX ALIMENTARIUS. **Pesticide Residues in Food: Maximum Residue Limits; Extraneous Maximum Residue Limits. Roma.** Disponível em: <[http://www.codexalimentarius.net/mrls/servlet/PesticideServlet?Pesticides=0&Items=36&Items=%3E36&out\\_style=by+substance&Domain=PesticideMRLs&Language=english&query\\_form=%2Fmrls%2Fpestdes%2Fpest\\_q-e.htm](http://www.codexalimentarius.net/mrls/servlet/PesticideServlet?Pesticides=0&Items=36&Items=%3E36&out_style=by+substance&Domain=PesticideMRLs&Language=english&query_form=%2Fmrls%2Fpestdes%2Fpest_q-e.htm)>. Acesso em: 25 jun 2015.

COLLOMB, M.; SCHMID, A.; SIEBER, R.; WECHSLER, D.; RYHANEN, E.L. Conjugated linoleic acids milk fat: Variation and physiological effects. **International Dairy Journal**, v.16, n.11, p.1347-1361, 2006.

CORL, B.A.; BAUMGARD, L.H.; DWYER, D.A.; GRINARI, J.M.; PHILLIPS, B.S.; BAUMAN, D.E. The role of delta-9-desaturase in the production of cis-9, trans-11. **Journal Nutritional Biochemistry**, v.12, n.11, p.622-630, 2001.

COSTA, R.G.; MESQUITA, I.V.; QUEIROGA, R.C.R. Características químicas e sensoriais do leite de cabras Moxotó alimentadas com silagem de maniçoba. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.4, p.694-702, 2008.

DAMALAS, C.A. & ELEFTHEROHORINOS, I.G. Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.8, n.5, p.1402-1419, 2011.

DEJONCKHEERE, W.; VERSTRAETEN, R.; STEURBAUT, W.; MELKEBEKE, G.; KIPS, R.H. Permetrin and deltamethrin residues on lettuce. **Pesticide Science**, v.13, n.4, p.351-356, 1982.



DELL'OMO, G.; PLESKACHEVA, M.G.; WOLFER, D.P.; LIPP, H.P.; SHORE, R.F. Comparative Effects of Exposure to an Organophosphate Pesticide on Locomotor Activity of Laboratory Mice and Five Species of Wild Rodents. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.70, n.1, p.138–145, 2003.

DESTAILLATS, F.; TROTTIER, J.P.; GALVEZ, J.M.; ANGERS, P. Analysis of alpha-linolenic acid biohydrogenation intermediates in milk fat with emphasis on conjugated linolenic acids. **Journal of Dairy Science**, n.88, n.9, p.3231–3239, 2005.

DEWHURST, R.J.; SHINGFIELD, K.J.; LEE, M.R.F.; SCOLLAN, N.D. Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. **Animal Feed Science and Technology**, v.131, n.3-4, p.168–206, 2006.

DOREAU, M.; FERLAY, A. Digestion and utilization of fatty acids by ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, n.45, v.3-4, p.379-396, 1994.

DOREAU, M.; LEE, M. R. F.; UEDA, K.; SCOLLAN, N. D. Metabolisme ruminal et digestibilité des acides gras des fourrages. **12<sup>o</sup> Rencontres Recherches Ruminants**, Paris (France). n.12, p.101–104, 2005.

DOREAU, M.; PONCET, C. Ruminal biohydrogenation of fatty acids originating from fresh or preserved grass. **Reproduction, nutrition, development**, v.40, p.201, 2000.

EFSA- European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance thiamethoxam. **EFSA Journal**, v.11, n.1, p.1-68, 2013.

EUROPEAN COMMISSION. **Directorate General for Health & Consumers. Pesticides EU-MRLs**. Disponível em: <[http://ec.europa.eu/sanco\\_pesticides/public/index.cfm](http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm)>. Acesso em: 25 jun 2015.

FAIT, A. (1994) **Introduction: General Structure of the Manual**. Toxicology 91:1- 3.

FIEVEZ, V.; VLAEMINCK, B.; DHANOA, M.S.B.; DEWHURST, R.J. Use of principal components analysis to investigate the origin of heptadecenoic acid and conjugated linoleic acids in milk. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.12, p.1017-1053, 2003.

FUENTE, M.A. de la; LUNA, P.; JUÁREZ, M. Chromatographic techniques to determine conjugated linoleic acid isomers. **Trends in Analytical Chemistry**, v.25, n.9, p.917- 926, 2006.

FUKE, G.; NÖRNBERG, J.L.; RODRIGUES, I.L.; SOUZA, A.P.B.; NOVACK, M.E.; BEZERRA, A.S. Teor de CLA em leites produzidos em diferentes regiões do Estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.19, n.2, p.109-113, 2012.

GABBI, A.M.; MCMANUS, C.M.; SILVA, A.V.; MARQUES, L.T.; ZANELA, M.B.; STUMPF, M.P.; FISCHER, V. Typology and physical–chemical characterization of bovine milk produced with different productions strategies, **Agricultural Systems**, v.121, p.130–134, 2013.

GLASSER, F. R.; SCHMIDELY, D.; SAUVANT, M. D. Digestion of fatty acids in ruminants: a meta-analysis of flows and variation factors: C18:2 fatty acids. **Animal Cambridge**, v.2, n.5, p.691-704, 2008.

GOUVÊA, M.M; FRANCO, C.F.J.; MARQUES, F.F.C.; PEREIRA NETTO, A.D. Ácidos Linoleicos Conjugados (ALC)- Os Benefícios que Exercem sobre a Saúde Humana e as Principais metodologias Analíticas Aplicadas para a sua Determinação em Leites. **Revista Virtual de Química**, v.4, n.6, p.653-669, 2012.

GOVARTS, E; NIEUWENHUIJSEN, M.; SCHOETERS, G; BALLESTER, F; BLOEMEN, K; DE BOER, M.; CHEVRIER, C.; EGGESBØ, M., GUXENS, M.; KRÄMER, U.; LEGLER, J.; MARTÍNEZ, D.; PALKOVICOVA, L.; PATELAROU, E.; RANFT, U.; RAUTIO, A.; SKAALUM, P.; SLAMA, R.; STIGUM, H.; TOFT, G.; TRNOVEC, T.; VANDENTORREN, S.; WEIHE, P.; WEISGLAS, N.K.; WILHELM, M.; WITTSIEPE, J.; BONDE, J.P.; OBELIX; ENRIECO. Birth Weight and Prenatal Exposure to Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Dichlorodipenyldichloroethylene (DDE): A Meta-analysis within 12 European Birth Cohorts. **Environmental Health Perspectives**, n.120, p.162–170, 2012.

GRIINARI, J. M.; CORL, B. A.; LACY, S. H.; CHOUINARD, P. Y.; NURMELA, K. V.; BAUMAN, D. E. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by delta(9)-desaturase. **Journal of Nutrition**, n.130, p.2285–2291, 2000.

GUIVARCH, E.; OTURAN, N.; OTURAN, M.A. Removal of organophosphorus pesticides from water by electrogenerated Fenton's reagent. **Environmental Chemistry Letters**, v.1, n.3, p.165-168, 2003.

HA, Y.L.; GRIMM, N.K.; PARIZA, M. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. **Carcinogenesis**, v.8, n.12, p.1881-1887, 1987.

HARFOOT, C.G.; HAZLEWOOD, G.P. **Lipid metabolism in the rumen**. In: HOBSON, P.N.(Ed). *The Rumen Microbial Ecosystem*. Londres: Elsevier Applied Science, 1998. p.251-284.

HAUG, A.; HØSTMARK, A.T.; HARSTAD, O.M. Bovine milk in human nutrition – a review. **Lipids in Health and Disease**, v.6, n.25, p.1-16, 2007.

HECK, M.C.; SIFUENTES DOS SANTOS, J.; BOGUSZ JUNIOR, S.; COSTABEBER, I.; EMANUELLI, T. Estimation of children exposure to organochlorine compounds through milk in Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Chemistry**, v.102, n.1, p.288-294, 2007.

HEINZOW, B.; ANDERSEN, H.R. **Biocides and Pesticides**. In: DUFFUS, J.H. (Ed) & WORTH, H. G. J. (Ed). *Fundamental Toxicology*. Londres: The Royal Society of Chemistry, 2006. p.291-302.

HOPPIN, J.A.; UMBACH, D.M.; LONDON, S.J.; ALAVANJA, M.C.R; SANDLER, D.P. Chemical predictors of wheeze among farmer pesticide applicators in the agricultural health study. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.165, p.683-689, 2002.

HOSTIOU, N.J.; VEIGA, J.B.; TOURRAND, J.F. Dinâmica e evolução de sistemas familiares de produção leiteira em Uruará, frente de colonização da Amazônia brasileira. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v.44, n.2, p.295-311, 2006.

HOSTIOU, N; DEDIEU, B. A method for assessing work productivity and flexibility in livestock farms. **Animal**, v.6, n.5, p.852-862, 2012.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE ESTATÍSTICA E GEOGRAFIA. **Censo agropecuário do Brasil**. 2006. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10 jun. 2015.

JARDIM, F.S.C.I.; ANDRADE, A.A.; QUEIROZ, N.C.S. Resíduos de Agrotóxicos em alimentos: Uma preocupação ambiental Global - Um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v.32, n.4, p.996-1012, 2009.

JOBIM, C.F.P.; NUNES, N.L.; GIUGLIANI, R.; CRUZ, M.B.I. Existe uma associação entre mortalidade por câncer e uso de agrotóxicos? Uma contribuição ao debate. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.15, n.1, p.277-288, 2010.

KAMPIRE, E.; KIREMIRE, B.T.; NYANZI, S.A.; KISHIMBA, M. Organochlorine pesticide in fresh and pasteurized cow's milk from Kampala markets. **Chemosphere**, v.84, n.7, p.923-927, 2011.

KAN, A.C.; MEIJER, I.A.G. The risk contamination of food with toxic substances present in animal feed. **Animal Feed Science and Technology**, v.133, n.1-2, p.84-108, 2007.

KEPLER, C.R.; TOVE, S.B. Biohidrogenation of insaturated fatty acids. **Journal of Biological Chemistry**, v.242, n.24, p.5686-5694, 1967.

KEYS, A., MENOTTI, A., KARVONEN, M.J., ARAVANIS, C., BLACKBURN, H., BUZINA, R., DJORDJEVIC, B.S., DONTAS, A.S., FIDANZA, F., KEYS, M.H., KROMHOUT, D., NEDELJKOVIC, S., PUNSAR, S., SECCARECCIA, F., TOSHIMA, H. The diet and 15-year death rate in the seven countries study. **American Journal of Epidemiology**, v.124, n.6, p.903-915, 1986.

KONSTANTINOOU, I.K.; HELA, D.G.; ALBANIS, T.A. The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. **Environmental Pollution**, v.141, n.3, p.555-570, 2006.

KOVALCZUK, T.; LACINA, O.; JECH, M.; POUSTKA, J.; HAJŠLOVA, J. Novel approach to fast determination of multiple pesticide residues using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Food Additives and Contaminants**, v.25, n.4, p.444–457, 2008.

LATUSZYNSKA, J.; LUTY, S.; RASZEWSKI, G.; PRZEBIROWSKA, D., TOKARSKA-RODAK, M. Neurotoxic effect of dermally applied chlorpyrifos and cypermethrin. Reversibility of changes. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v.10, n.2, p.197-201, 2003.

LOCK, A. L.; SHINGFIELD K. J. **Optimising milk composition**. In: Dairying – Using Science to Meet Consumers’s Needs. KEBREAB, J.; MILLS, D.E. Beever, Occasional Publication No 29. Loughborough: British Society of Animal Science Nottingham University Press, 2004, p.107–108.

LOOR, J. J.; FERLAY, A.; OLLIER, A.; DOREAU, M.; CHILLIARD, Y. Relationship among trans and conjugated fatty acids and bovine milk fat yield due to dietary concentrate and linseed oil. **Journal Dairy Science**, v.88, n.2, p.726–740, 2005.

LOPES, F.C.F.; BARROS, P.A.V.; BRUSCHI, J.H.; SILVA, P.H.F.; PEIXOTO, M.G.C.D.; GOMIDE, C.A.M.; DUQUE, A.C.A.; GAMA, M.A.S. Perfil de ácidos graxos no leite de vacas Holandês em pastagens tropicais suplementadas com dois níveis de concentrado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.2, p.518-521, 2011.

MAIA, P.V.; MOLINA, L.R.; FACURY FILHO, E.J.; GONÇALVES, R.L.; MOREIRA, L.P.V.; CARVALHO, A.Ú. Vacinação com *Escherichia coli* J5 no pré-parto e ocorrência de mastite e produção de leite de vacas mestiças leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.5, p.1367-1375, 2013.

MANNA, S.; BHATTACHARYYA, D.; MANDAL, T.K.; DEY, S. Neuropharmacological effects of deltamethrin in rats. **Journal of Veterinary Science**, v.7, n.2, p.133-136, 2004.

MARTIN, C.A.; ALMEIDA, V.V.; RUIZ, M.R. VISENTAINER, J.E.L.; MATSHUSHITA, M.; DE SOUZA, N.E.; VISENTAINER, J.V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega- 3 e

ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v.19, n.6, p.761-770, 2006.

McKINLAY, R.; PLANT, J.A.; BELL, J.N.; VOULVOULIS, N. Endocrine disrupting pesticides: Implications for risk assessment. **Environment International**, v.34, n.2, p.168-183, 2008.

MEDEIROS, R. J.; MONTEIRO, F. O.; SILVA, G. C.; NASCIMENTO JUNIOR, A. Casos de intoxicações exógenas em cães e gatos atendidos na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense durante o período de 2002 a 2008. **Ciencia Rural**, v.39, n.7, p.2105-2110, 2009.

MELGAR, M.J.; SANTAEUFEMIA, M.; GRACIA, M.A. Organophosphorus pesticide residues in milk and infant formulas from Spanish northwest. **Journal of environmental Science & Health**, v.45, n.7, p.595-600, 2010.

MEZCUA, M.; REPETTI, M. R.; AGÜERA, A.; FERRER, C.; GARCÍAAREYES, J. F.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Determination of pesticides in milk-based infant formulas by pressurized liquid extraction followed by gas chromatography tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.389, n.6, p.1833-1840, 2007.

MOR, F.; OZMEN, O. Endosulfan-induced neurotoxicity and serum acetylcholinesterase inhibition in rabbits: The protective effect of Vit C. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.96, n.2, p.108–112, 2010.

NARAHASHI, T. Neuronal ion channel as the target sites of insecticides. **Pharmacology & Toxicology**, v.79, n.1, p.1-14, 1996.

NASS (National Agricultural Statistics Service) (2013). **Acreage**. **USDA**, Washington DC. USA. Disponível em: <<http://usda01.library.cornell.edu/usda/current/Acre/Acre-06-28-2013.pdf>>. Acesso em 17 Jun 2015.

NAUEN, R., STUMPF, N.; ELBERT, A.; ZEBITZ, C.P.W.; KRAUS, W. Acaricide toxicity and resistance in larvae of different strains of *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae). **Pest Management Science**, v.57, n.3, p.253-261, 2001.

NAUEN, R.; BRETSCHEIDER, T. New modes of action of insecticides. **Pesticide Outlook**, v.13, n.6, p.241-245, 2002.

NEAL, A.P.; YUAN, Y.; ATCHISON, W.D. Allethrin Differentially Modulates Voltage Gated Calcium Channel. **Toxicological Sciences**, v.116, n.2, p.604–613, 2010.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; NETTO, D. P.; FRANCO, B. D. G. M. Organofosforados e carbamatos no leite produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e ação sobre *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, p.201-204, 2007.

NERO, L.A.; MATTOS, M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; NETTO, D.P.; PINTO, J.P. A.N.; ANDRADE, N.J.; SILVA, W.P.; FRANCO, B.D.G.M. Hazards in non-Pasteurized Milk on Retail Sale in Brazil: Prevalence of Salmonella Spp, Listeria Monocytogenes and Chemical Residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, n.3, p.211-215, 2004.

NUERNBERG, K.; FISCHER, A.; NUERNBERG, G.; ENDER, K.; DANNENBERGER, D. Meat quality and fatty acid composition of lipids in muscle and fatty tissue of Skudde lambs fed grass versus concentrate. **Small Ruminant Research**, v.74, n.1-2, p.279-283, 2008.

PAGLIUCA, G.; SERRAINO, A.; GAZZOTTI, T.; ZIRONI, E.; BORSARI, A.; ROSMINI, R. Organophosphorus pesticides residues in Italian raw milk. **Journal of Dairy Research**, v.73, n.3, p.340–344, 2006.

PARIZA, M. W.; LORETZ, L. J.; STORKSON, J. M. ; HOLLAND, N. C. Mutagens and modulador of mutagenesis in fried ground beef. **Cancer Research**, v.43 (suplemento 5), p.2444-2446, 1983.

PARIZA, M.W.; ASHOOR, S.H.; CHU, F.S.; LUND, D.B. Effect of temperature and time on mutagen formation in pan-fried hamburger. **Cancer Letters**, v.7, n.2-3, p.63-69, 1979.

PARIZA, M.W.; HARGRAVES, W.A. A beef-derived mutagenesis modular inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. **Carcinogenesis**, v.6, p.591-593, 1985.

PARODI, P.W. Conjugated octadecadienoic acids of milk fat. **Journal Dairy Science**, v.60, n.10, p.1550-1553, 1977.

PARODI, P.W. Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. **Journal Dairy Science**, v.82, n.6, p.1339-1349, 1999.

PERINI, J.A.L. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Revista de Nutrição**, v.23, n.6, p.1075-1086, 2010.

PHILPOT, N.W.; NICKERSON, S.C. **Vencendo a luta contra a mastite**. Piracicaba: Westfalia Surge/Westfalia Landtechnik do Brasil, 2002. 188p.

PIGNATI, W.; OLIVEIRA, N.P. da SILVA, A.M.C. Vigilância aos agrotóxicos: quantificação do uso e previsão de impactos na saúde-trabalho-ambiente para os municípios brasileiros. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.19, n.12, p. 4669-4678, 2014.

POIRIER, H.; SHAPIRO, J.S.; KIM, R.J.; LAZAR, M.A. Nutritional Supplementation with trans-10, cis-12- Conjugated Linoleic Acid. Induces Inflammation of White Adipose Tissue. **Diabetes**, v.55, n.6, p.1634-1641, 2006.

REIS, R.B.; GLÓRIA, J.R.; VIEIRA, L.R.; FARIA, B.N. Manipulação da composição do leite pela nutrição da vaca. In: Simpósio do Agronegócio do Leite: produção, gestão e qualidade, 1., 2004, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 2004.

RICHINS, R.D.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Expression, immobilization, and enzymatic characterization of cellulose-binding domain-organophosphorus hydrolase fusion enzymes. **Biotechnology and Bioengineering**, v.69, n.6, p.591-596, 2000.

ROY, A.; FERLAY, A.; SHINGFIELD, K.J.; CHILLIARD, Y. Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to plant oils in cows given different basal diets, with particularemphasis on trans-C18:1 fatty acids and isomers of conjugated linoleic acid. **Animal Science**, v.4, n.82, p.479-492, 2006.



SANTOS, M.V. **O uso da CCS em diferentes países.** In: Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil. Goiânia: Talento, 2006, v.1, p.181-197.

SANTOS-SILVA, J.; BESSA, R.J.B.; SANTOS-SILVA, F. Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs: Fatty and composition of meat. **Livestock Production Science**, v.77, n.2, p.187-194, 2002.

SANTOS-ZAGO, L. F.; FERREIRA, L.; BOTELHO, A.P.; OLIVEIRA, A.C. Os efeitos do ácido linoléico conjugado no metabolismo animal: avanço das pesquisas e perspectivas para o futuro. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.21, n.2, p.195-221, 2008.

SHINGFIELD, K. J.; REYNOLDS, C. K.; LUPOLI, B.; TOIVONEN, V.; YURAWECZ, P. DELMONTE, M. P.; GRINARI, J. M.; GRANDISON, A. S.; BEEVER, D. E. Effect of forage type and proportion of concentrate in the diet on milk fatty acid composition in cows given sunflower oil and fish oil. **Journal of Animal Science**, v.80, n.2, p.225–238, 2005.

SHOOK, G.E. Genetic improvement of mastitis through selection on somatic cell count. The Veterinary Clinics of North America: **Food Animal Practice**, v.9, n.3, p.563-581, 1993.

SIMIONATO, J.I.; GARCIA, J.C.; DOS SANTOS, G.T.; OLIVEIRA, C.C.; VISENTAINER, J.V.; DE SOUZA, N.E. Validation of the Determination of Fatty Acids in Milk by Gas Chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.21, n.3, p.520-524, 2010.

SIMOPOULOS, A.P. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.60, n.9, p.502-507, 2006.

SIRI-TARINO, P.W.; SUN, Q.; HU, F.B.; KRAUSS, R. M. Saturated fatty acids and risk of coronary heart disease: modulation by replacement nutrients. **Current Atherosclerosis Reports**, v.12, n.6, p.384-390, 2010.

SMITH, R.R.; MOREIRA, L.V.H.; LATRILLE, L.L. Characterization of dairy productive systems in the Tenth Region of Chile using multivariate analysis. **Agricultura Técnica**, v.62, n.3, p.35-395, 2002.

SOUSA BENTES, A; SOUZA, H.A.L; MENDONÇA, X.M.F. Caracterização física e química e perfil lipídico de três espécies de peixes amazônicos. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.3, n.2, p.97-108, 2009.

SPENCER, C. L.; YUILL, K.H.; BORG, J.J.; HANCOX, J.C.; KOZLOWSKI, R.Z. Actions of pyrethroid insecticides on sodium currents, action potentials, and contractile rhythm in isolated mammalian ventricular myocytes and perfused hearts. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.298, n.3, p.1067-1082, 2001.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. **The SAS system for windows**. v.9.0 Cary: SAS Institute Inc., 2002.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J.E. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.45, p.247-268, 2005.

TRAPÉ, A. Z. Doenças Relacionadas a Agrotóxicos: Um Problema de Saúde Pública. 1995. 175f. **Tese (Doutorado)** - Faculdade de Ciências Médicas, Unicamp. Campinas.

TRICON, S.; BURDGE, G.C.; KEW, S.; BANERJEE, T.; RUSSELL, J.J.; JONES, E.L.; GRIMBLE, R.F.; WILLIAMS, C.M.; YAQOUB, P.; CALDER, P.C. Opposing effects of cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. **American Journal Clinical Nutrition**, v.80, n.3, p.614-20, 2004.

TURPEINEN, A.M; MUTANEN, M.; ARO, A.; SALMINEN, I.; BASU, S.; PALMQUIST, D.L.; GRIINARI, J.M. Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, n.3, p.504-510, 2002.

ULBRICHT, T.L.V; SOUTHGATE, D.A.T. Coronary heart disease: Seven dietary factors. **Lancet**, v.338, p.985-992, 1991.

VARGAS, D. P.; NÖRNBERG, J. L.; MELLO, R. O.; SHEIBLER, R. B.; MILANI, M. P.; MELLO, F. C. B. Correlações entre contagem bacteriana total e parâmetros de qualidade do leite. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.20, n.4, p.241-247, 2013.

VISENTAINER, J.V. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. **Química Nova**, v.35, n.2, p.274-279, 2012.

WANG, L. M.; LV, J.P; CHU, Z.Q.; CUI, Y.Y.; REN, X.H. Production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii*. **Food Chemistry**, v.103, n.2, p.313-318.

WHO – World Health Organization. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard And Guidelines to Classification. Geneva: World Health Organization. 2009b. Disponível em: <[http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides\\_hazard\\_2009.pdf](http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf)> Acesso em 17 jan 2015.

WIJLEN, R.P.J.V.; COLOMBANI, P.C. Grass-based ruminant production methods and human bioconversion of vaccenic acid with estimations of maximal dietary intake of conjugated linoleic acids. **International Dairy Journal**, v.20, n.7, p.433-448, 2010.

WINCK, C.A.; THALER NETO, A. Diagnóstico da adequação de propriedades leiteiras em Santa Catarina às normas brasileiras de qualidade do leite. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.8, n.2, p.164-172, 2009.

YAMAGUCHI, L. C. T.; MARTINS, P. do C.; LEITE, J. L. B.; STOCK, L. A .; ZOCCAL, R.; OLIVEIRA, A. F. de. **Socioeconomia do agronegócio do leite**. In: SANTOS, C. A . dos; CARVALHO, L. de A.; CAMPOS, O . F. de; ARCURI, P. B. (Ed.). Embrapa Gado de Leite: 30 anos de pesquisa e conquistas para o Brasil. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2006. p.193-212.

**APÊNDICES**

**APÊNDICE A**

Artigo publicado na Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB): Qualidade e potencial nutracêutico do leite bovino em diferentes sistemas de produção e estações do ano.

# Qualidade e potencial nutracêutico do leite bovino em diferentes sistemas de produção e estações do ano

Diego Prado de Vargas<sup>(1)</sup>, José Laerte Nörnberg<sup>(1)</sup>, Rudolf Brand Scheibler<sup>(2)</sup>, Jorge Schafhauser Junior<sup>(3)</sup>, Fábio Antunes Rizzo<sup>(2)</sup> e Roger Wagner<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Avenida Roraima, nº 1.000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, CEP 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: diegodevargas@hotmail.com, jlnornberg@gmail.com, rogerwag@gmail.com  
<sup>(2)</sup>Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Zootecnia, Rua Gomes Carneiro, nº 01, Centro, CEP 96010-610 Pelotas, RS, Brasil. E-mail: rudolfbrandscheibler@hotmail.com, rizzo.fabioantunes@gmail.com  
<sup>(3)</sup>Embrapa Clima Temperado, Caixa Postal 403, CEP 96010-971 Pelotas, RS, Brasil. E-mail: jorge.junior@embrapa.br

**Resumo** – O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da interação entre sistemas produtivos e estações do ano sobre a qualidade química e microbiológica do leite bovino, além de propor um índice de potencial nutracêutico do perfil de ácidos graxos do leite. Três propriedades foram avaliadas mensalmente, durante as diferentes estações do ano, em quatro graus de especialização dos sistemas de produção: altamente especializado, especializado, semiespecializado e não especializado. Os sistemas de produção e as estações do ano interferem de forma conjunta no perfil de ácidos graxos e, de forma isolada, na qualidade química e microbiológica do leite. As maiores contagens de células somáticas e os menores conteúdos de proteína foram observados no verão, e o grau de especialização das unidades produtivas esteve indiretamente relacionado à contagem bacteriana total no leite. No inverno, sistemas não especializados produziram leite com o melhor índice nutracêutico, que apresentaram os maiores teores de ácidos graxos poli-insaturados, ácido rumênico (CLA, 18:2n7-c9,t11) e ácido t10,c12-octadecadienoico (CLA, 18:2n6-t10,c12).

**Termos para indexação:** ácido linoleico conjugado, alimentos funcionais, perfil de ácidos graxos, qualidade do leite bovino.

## Quality and nutraceutical potential of bovine milk in different production systems and seasons

**Abstract** – The objective of this work was to evaluate the effect of the interaction between production systems and seasons on the chemical and microbiological qualities of bovine milk, besides proposing a potential nutraceutical index of milk fatty acid profiles. Three farms were assessed monthly, along the different seasons, for four specialization levels of the production systems: highly specialized, specialized, partially specialized, and nonspecialized. The production systems and the seasons jointly interfere in fatty acid profiles, and singly interfere in the chemical and microbiological quality of milk. The highest somatic cell counts and the lowest protein contents were observed in the summer, and the specialization level of the production units had an inverse relationship with the total bacterial count. During winter, nonspecialized systems produced milk with the best nutraceutical index, with the highest contents of polyunsaturated fatty acids, rumenic acid (CLA, 18:2n7-c9,t11) and t10,c12-octadecadienoic acid (CLA, 18:2n6-t10,c12).

**Index terms:** conjugated linoleic acid, functional foods, fatty acid profiles, bovine milk quality.

## Introdução

O leite é produzido com expressiva heterogeneidade de sistemas de produção, em todo o território brasileiro, com menor número de produtores especializados (sistemas intensivos de produção) e elevado número de produtores com intermediária ou nenhuma especialização (sistemas extrativistas de produção). Esses sistemas diferem, principalmente,

pela produtividade leiteira e pelo manejo nutricional e higiênico-sanitário adotado (Gabbi et al., 2013).

Para a cadeia láctea mundial, é de grande relevância identificar os sistemas de manejo e produção de rebanhos leiteiros que favoreçam a obtenção de leite com maior qualidade, ao longo das diferentes estações do ano (Bodenmüller Filho et al., 2010).

Quanto à qualidade do leite, do ponto de vista legal e prático, consideram-se a composição centesimal – que

inclui os teores de gordura, proteína e sólidos totais – e os aspectos higiênico-sanitários, que englobam padrões internacionais relacionados à contagem de células somáticas (CCS) e à contagem bacteriana total (CBT) (Vargas et al., 2013, 2014).

Com o maior acesso à informação sobre o papel dos alimentos na saúde, o conceito de qualidade tem-se tornado mais abrangente. Assim, uma nova classe de alimentos tem surgido, denominada de “alimentos nutracêuticos”, capazes de proporcionar benefícios à saúde do consumidor, que incluem prevenção ou tratamento de doenças (Tripathi, 2014).

Com foco no potencial nutracêutico de alguns ácidos graxos, tem-se buscado a elevação dos conteúdos de ácido rumênico (CLA, 18:2n7-c9,t11) e ácido t10,c12-octadecadienoico (CLA, 18:2n6-t10,c12) no leite, que podem contribuir para a prevenção e combate de muitas doenças em humanos, como obesidade, doenças cardiovasculares, diabetes do tipo-2, e alguns tipos de câncer (Kratz et al., 2013; Lahlou et al., 2014).

Sistemas de produção e estações do ano podem interferir na qualidade química e microbiológica do leite (Gabbi et al., 2013); porém, há pouca informação disponível quanto ao efeito conjunto desses fatores sobre a qualidade e o potencial nutracêutico do leite.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da interação entre sistemas de produção e estações do ano sobre a qualidade química e microbiológica do leite bovino, além de propor um índice de potencial nutracêutico do perfil de ácidos graxos.

## Material e Métodos

Três propriedades foram avaliadas, mensalmente, durante as diferentes estações do ano, em quatro graus de especialização dos sistemas de produção: altamente especializado, especializado, semiespecializado e não especializado (Tabela 1), tendo-se analisado um total de 144 amostras, de 12 propriedades.

As amostras foram coletadas em 2012, em fazendas localizadas em municípios compreendidos desde a Região Central do Rio Grande do Sul até o início da Serra Gaúcha (29°15'16" a 29°29'13"S; e 51°31'52" a 51°59'50"W). Paralelamente, foram coletadas amostras dos alimentos destinados aos animais, para sua caracterização (Tabela 2). Os lipídeos foram extraídos das amostras de leite e de alimento – silagem de milho, concentrado, pastagens temperadas (aveia-preta,

*Avena strigosa*, e azevém, *Lolium multiflorum*) e pastagens tropicais (capim-sudão, *Sorghum sudanense*, e milheto, *Pennisetum glaucum*), conforme Bligh & Dyer (1959). A transesterificação e a metilação seguiram a técnica descrita por Christie (1982). O perfil de ácidos graxos foi determinado de acordo com Simionato et al. (2010). A identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos (Emag) foi realizada pela comparação dos tempos de retenção dos constituintes da amostra, tendo-se utilizado mistura composta de 37 Emag (24056, Supelco, 37 Component Fame Mix) e padrão do éster metílico do ácido transvacênico (18:1n7-t11) (46905-U, trans-11-octadecenoic methyl ester), com mistura dos isômeros do éster metílico do ácido rumênico (CLA, 18:2n7-c9,t11) e ácido t10,c12-octadecadienoico (CLA, 18:2n6-t10,c12) (O5632, Linoleic acid, conjugated methyl ester).

As amostras de alimento foram expressas em percentagem do total de ácidos graxos ( $\text{g } 100\text{g}^{-1}$ ), e as de leite em lipídeos totais ( $\text{mg } \text{g}^{-1}$ ), em relação ao padrão interno [tricosanoato de metila (23:0) (T9900, methyl tricosanoate)]. Os cálculos foram realizados conforme Simionato et al. (2010), com a equação:  $C (\text{mg } \text{g}^{-1}) = (A_x \times m_{23:0} \times F_{RT}) / (A_{23:0} \times M_A \times F_{CT})$ , em que  $A_x$  é a área dos ésteres metílicos dos ácidos graxos;  $A_{23:0}$ , a área do padrão interno;  $m_{23:0}$ , a massa do padrão interno adicionado à amostra (em mg);  $M_A$ , a massa da amostra (em g);  $F_{RT}$ , o fator teórico de resposta dos ésteres metílicos de ácidos graxos;  $F_{CT}$ , o fator de conversão para expressão dos resultados em miligramas de ácidos graxos por grama de lipídeos totais.

Os resultados da determinação dos ácidos graxos do leite foram utilizados para calcular os índices de aterogenicidade e trombogenicidade (Ulbricht & Southgate, 1991), bem como a razão entre ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos (Santos-Silva et al., 2002) e ácidos graxos desejáveis (AGD) (Costa et al., 2008). O índice de AGD leva em consideração o somatório de ácidos graxos monoinsaturados ( $\Sigma\text{AGMI}$ ), poli-insaturados ( $\Sigma\text{AGPI}$ ) e o ácido esteárico (C18:0), e não somente os ácidos com reconhecido potencial nutracêutico. Portanto, este estudo propõe uma equação, com ácidos graxos que apresentem esse potencial, denominada de índice nutracêutico do leite bovino (IN):  $\text{IN} = (\text{ácido transvacênico} + \text{ácido rumênico} + \text{ácido t10,c12-octadecadienoico}) / \Sigma n6:n3$ . De acordo com a equação, o numerador é diretamente proporcional

à concentração de ácidos graxos benéficos à saúde, e inversamente proporcional à relação ômega 6 e ômega 3 ( $\Sigma n6:n3$ ), o que está de acordo com a diminuição recomendada nesta razão (Simopoulos, 2006).

Os teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais do leite foram determinados em equipamento Bentley 2000; enquanto a CCS e a CBT foram obtidas por citometria de fluxo, em equipamento Somacount 300 e Bactocount IBC, respectivamente. Com o intuito de linearizar os dados, a CCS foi transformada em escore linear de células somáticas para  $ECS = [\log_2(CCS/100)]+3$  (Shook, 1993), e a CBT, transformada pelo logaritmo natural da CBT normal.

Os resultados foram analisados conforme delineamento inteiramente casualizado, com medidas repetidas no tempo, tendo-se utilizado o procedimento

Mixed e empregado estrutura paramétrica especial nas matrizes de variância e covariância, conforme o modelo estatístico:  $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \gamma_k + (\alpha\gamma)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$ , em que:  $Y_{ijk}$  é o valor observado pela  $k$ -ésima estação e  $j$ -ésima UPL, do  $i$ -ésimo sistema produtivo;  $\mu + \alpha_i + \gamma_k + (\alpha\gamma)_{ik}$  é a média para o sistema produtivo  $i$ , na estação  $k$ , que contém os efeitos fixos para o sistema produtivo  $i$ , estação  $k$ , bem como a interação sistema produtivo  $\times$  estação  $ik$ ; e  $\varepsilon_{ijk}$  é o erro aleatório, associado à mensuração na estação  $k$  na  $j$ -ésima unidade de produção de leite (UPL), designada ao sistema produtivo  $i$ . Assumiu-se uma estrutura de medidas repetidas para os resíduos; ou seja, utilizaram-se os pressupostos de que  $\varepsilon_{ijk} \sim N(0; \Sigma)$ , em que:  $\Sigma$  representa a matriz de covariância e covariância residual que mais adequou-se aos dados. As matrizes testadas foram: AR (1), autorregressiva

**Tabela 1.** Características dos sistemas de produção de leite altamente especializado (AE), especializado (ES), semiespecializado (SE) e não especializado (NE).

Sistema	Produção (L por animal por dia)	Área (ha)	Concentrado (kg por vaca por dia)	Silagem <sup>(1)</sup>	Raça	Ordenha	Local	Refrigeração
Altamente especializado	>20	>15	>10	Sim	Definida	Circuito fechado	Sala própria	Com
Especializado	15–20	10–15	4–10	Sim	Definida	Circuito aberto	Sala própria	Com
Semiespecializado	10–15	5–10	1–4	Sim	Não definida	Balde ao pé	Galpão	Com
Não especializado	5–10	1–5	<1	Não	Não definida	Balde ao pé	Galpão	Sem

<sup>(1)</sup>Sim, silagem de milho como base do volumoso diário; Não, silagem de milho como parte do volumoso diário.

**Tabela 2.** Caracterização do perfil de ácidos graxos ( $g\ 100g^{-1}$  do total de ácidos graxos), dos principais constituintes da dieta recebida pelos animais, nos sistemas de produção altamente especializado (AE), especializado (ES), semiespecializado (SE) e não especializado (NE).

Ácido graxo	Silagem de milho				Concentrado				Pastagem temperada <sup>(1)</sup>				Pastagem tropical <sup>(2)</sup>			
	AE	ES	SE	NE	AE	ES	SE	NE	AE	ES	SE	NE	AE	ES	SE	NE
12:0 (ácido láurico)	0,20	0,24	0,28	-	0,10	0,15	0,14	0,12	2,08	2,11	2,16	2,20	2,87	2,64	2,49	2,94
14:0 (ácido mirístico)	0,40	0,50	0,47	-	8,25	7,22	8,22	7,27	0,45	0,40	0,50	0,61	0,50	0,45	0,54	0,90
16:0 (ácido palmítico)	16,20	16,18	16,80	-	21,40	21,70	22,40	22,90	13,20	13,00	13,14	13,11	20,02	20,00	19,77	18,44
16:1n7-c9 (ácido palmitoleico)	0,50	0,39	0,40	-	0,20	0,19	0,15	0,15	0,15	0,20	0,12	0,18	2,14	1,18	2,11	1,94
18:0 (ácido esteárico)	2,10	2,08	2,06	-	3,60	3,62	3,48	3,76	2,47	2,42	2,40	2,49	5,21	5,87	5,77	5,02
18:1n9-c9 (ácido oleico)	13,15	12,10	11,00	-	18,02	18,60	18,65	18,02	2,48	2,49	2,60	2,70	9,80	7,95	7,80	7,87
18:2n6-c9,c12 (ácido linoleico)	27,80	28,50	28,80	-	35,94	33,49	33,86	35,94	12,00	11,00	11,50	14,20	17,04	20,14	20,05	19,94
18:3n3-c9,c12,c15 (AAL)	20,30	23,60	25,80	-	3,34	3,50	3,70	3,54	55,22	55,48	54,12	50,98	27,04	28,21	26,24	28,00
20:0 (ácido araquídico)	0,47	0,42	0,50	-	1,98	0,88	0,98	0,98	0,57	0,50	0,77	0,81	0,52	0,48	0,43	0,41
20:1	9,54	8,60	7,50	-	0,66	0,67	0,40	0,76	0,34	0,57	0,45	0,34	0,50	0,52	0,77	0,82
21:0 (ácido heneicosanoico)	0,15	0,12	0,17	-	0,26	0,36	0,18	0,26	0,87	0,80	0,91	0,85	0,90	0,96	1,15	1,00
20:02	0,10	0,11	0,13	-	0,13	0,14	0,16	0,16	0,57	0,70	0,80	0,82	0,40	0,50	0,54	0,74
22:0 (ácido behênico)	2,33	1,33	1,13	-	0,60	0,55	0,50	0,80	0,55	0,52	0,54	0,55	2,64	2,66	2,60	3,10
24:0 (ácido lignocérico)	0,89	0,59	0,90	-	1,12	1,17	1,20	1,22	0,61	0,70	0,48	0,77	2,90	2,94	2,80	2,61
Não identificados	5,87	5,24	4,06	-	4,40	7,46	5,98	4,12	8,44	9,11	9,51	9,39	7,52	5,50	6,94	6,27

<sup>(1)</sup>Aveia-preta (*Avena strigosa*) e azevém (*Lolium multiflorum*). <sup>(2)</sup>Capim-sudão (*Sorghum sudanense*) e milheto (*Pennisetum glaucum*). AAL, ácido  $\alpha$ -linolênico.



de primeira ordem; VC, componentes de variância; CS, simetria composta; ARH(1), autorregressiva heterogênea de primeira ordem; ARMA(1,1), média móvel autorregressiva de primeira ordem; e; TOEP, Toeplitz. As medidas foram estimadas com o comando LSMeans e comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

No conjunto original das variáveis que representam o potencial nutracêutico do leite, procedeu-se à análise de variância multivariada pelo procedimento GLM e o comando Manova, tendo-se realizado o teste de Wilks para testar a hipótese de que os vetores de médias das diferentes combinações entre sistemas produtivos e estações eram nulos.

Em seguida, utilizou-se a análise de componentes principais (ACP), seguida da análise de agrupamento, com uso do algoritmo hierárquico aglomerativo de Ward como método de agrupamento, e a distância euclidiana quadrática, como medida de dissimilaridade.

As análises estatísticas foram realizadas com o aplicativo SAS, versão 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

## Resultados e Discussão

As estações do ano produziram efeito significativo sobre os teores de proteína e sólidos totais, assim como sobre a CCS (Tabela 3). O teor de proteína foi menor durante o verão, em razão da baixa qualidade nutricional das pastagens tropicais (*Sorghum sudanense* e *Pennisetum glaucum*), em comparação à das temperadas (*Avena strigosa* e *Lolium multiflorum*) (Fanti et al., 2008). Além disso, os animais, possivelmente, sofreram com o estresse térmico, uma vez que a temperatura máxima média da região onde se desenvolveu o estudo é de 31,2°C, o que limita o consumo de matéria seca e diminui o teor de proteína do leite (Fanti et al., 2008). Segundo Vargas et al. (2014), animais em ambientes com temperaturas elevadas apresentam menor capacidade de respostas a doenças, o que aumenta sua suscetibilidade à invasão do úbere por microrganismos e, no presente trabalho, resultou nos maiores valores de CCS no verão (Tabela 3).

A elevação do conteúdo de sólidos totais no outono deveu-se, principalmente, à elevação do conteúdo de proteína e gordura do leite.

O aumento da CBT, com a diminuição dos níveis de especialização das UPL (Tabela 3), deveu-se, possivelmente, ao tipo e ao local de ordenha, bem como

ao emprego ou não do resfriamento. Assim, o sistema altamente especializado, por possuir sala de ordenha própria, com circuito fechado e tanque de refrigeração a granel (Tabela 1), apresentou os menores valores de CBT.

Houve interação significativa entre os sistemas produtivos e as estações, para todos os ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados (Tabelas 4, 5 e 6), bem como para os índices de qualidade da fração lipídica (Tabela 5).

Com a diminuição do grau de especialização dos sistemas produtivos, observou-se menor concentração do somatório dos ácidos graxos saturados ( $\Sigma$ AGS), nas estações primavera, verão e outono (Tabela 4). Isto se atribui à maior participação de forragens frescas (Chilliard et al., 2007) na dieta dos extratos menos especializados.

No inverno, observou-se menor concentração de ácido linoleico (18:2n6-c9,c12) e maiores valores de ácido rumênico e do somatório dos ácidos graxos poli-insaturados ( $\Sigma$ AGPI), nos extratos produtivos menos especializados (Tabela 6). Esses resultados estão relacionados ao predomínio de uso dos extratos menos especializados, de pastagens de aveia-preta (*Avena strigosa*) e azevém (*Lolium multiflorum*), em detrimento da silagem de milho e de concentrado, o que teria resultado em maiores concentrações de ácido alfa-linolênico (18:3n3-c9,c12,c15) do que de ácido linoleico e oleico (18:1n9-c9) na dieta (Tabela 2). Conforme Dewhurst et al. (2006), isto aumenta as concentrações de ácido rumênico e  $\Sigma$ AGPI e diminui a concentração de ácido linoleico no leite, o que corrobora os resultados obtidos no presente trabalho (Tabela 6).

O extrato produtivo mais especializado, apesar de não ter significativamente diferido dos dois extratos seguintes, aparentemente favoreceu a formação de ácido rumênico, a ponto de seus teores terem-se igualado estatisticamente aos observados no extrato com a menor especialização, que apresentou o maior valor desse ácido graxo (Tabela 6). Assim, pode-se inferir que a relação volumoso:concentrado, nos três primeiros níveis de especialização, influenciou esse resultado. No sistema produtivo altamente especializado, que utiliza a maior suplementação com concentrado na dieta (Tabela 1), os limites da relação volumoso:concentrado foram comprometidos, o que segundo Chilliard et al. (2007) diminui a

bio-hidrogenação ruminal dos ácidos graxos de cadeia longa e inibe a etapa final desse processo, em que o ácido transvacênico (18:1n7-t11) é convertido a ácido esteárico (18:0). Assim, após a dessaturação do ácido transvacênico na glândula mamária pela enzima delta(9)-dessaturase, os teores de ácido rumênico no leite aumentam (Tabela 6).

Os extratos altamente especializado e especializado não diferiram quanto aos teores de ácido rumênico; no entanto, nos sistemas semiespecializado e não especializado, os menores valores para esse ácido foram constatados no outono, e os maiores, no inverno e na primavera. Como nos extratos mais especializados o processo de formação desse ácido graxo depende principalmente da concentração de ácido linoleico

na dieta, e as fontes dietéticas nesses manejos que o contêm em sua composição (silagem de milho e concentrado) (Tabela 2) não são tão suscetíveis a variações sazonais, não houve variação nos teores de ácido rumênico (CLA, 18:2n7 - c9, t11) entre esses extratos (Tabela 6).

Nos níveis de menor especialização, a formação de ácido rumênico depende da participação do ácido alfa-linolênico, principal constituinte das pastagens frescas na dieta (Tabela 2). Portanto, esses sistemas produtivos são mais suscetíveis a alterações climáticas, com maiores teores do ácido alfa-linolênico nas pastagens temperadas, que são exploradas até a primavera, e menores nas pastagens tropicais. Além disso, a menor disponibilidade forrageira no

**Tabela 3.** Média±erro-padrão dos teores de proteína total, gordura, sólidos totais, contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) do leite bovino, nos sistemas de produção altamente especializado (AE), especializado (ES), semiespecializado (SE) e não especializado (NE), nas diferentes estações do ano<sup>(1)</sup>.

Sistema	Estação do ano				Média
	Primavera	Verão	Outono	Inverno	
	Proteína total (%)				
Altamente especializado	3,07	2,96	3,12	3,11	3,07±0,09
Especializado	3,10	3,05	3,07	3,06	3,07±0,09
Semiespecializado	3,28	3,18	3,17	3,20	3,21±0,09
Não especializado	3,01	2,94	3,23	3,14	3,08±0,09
Média	3,11±0,11a	3,03±0,11b	3,15±0,11a	3,13±0,11a	-
	Gordura (%)				
Altamente especializado	3,52	3,50	3,51	3,32	3,46±0,14
Especializado	3,67	3,96	3,37	3,57	3,64±0,14
Semiespecializado	3,88	3,70	3,77	3,78	3,78±0,14
Não especializado	3,74	4,03	4,03	3,62	3,86±0,14
Média	3,70±0,09	3,80±0,09	3,67±0,09	3,57±0,09	-
	Sólidos totais (%)				
Altamente especializado	11,62	11,96	12,11	11,72	11,85±0,22
Especializado	11,87	12,06	11,98	11,37	11,82±0,22
Semiespecializado	12,36	12,61	12,23	12,22	12,36±0,22
Não especializado	11,97	12,83	13,19	11,99	12,49±0,22
Média	11,96±0,15bc	12,36±0,15ab	12,38±0,15a	11,83±0,15c	-
	Contagem de células somáticas (células mL <sup>-1</sup> )				
Altamente especializado	521,18	619,30	692,62	565,68	599,70±0,36
Especializado	415,11	882,78	504,32	516,38	579,65±0,36
Semiespecializado	517,34	554,23	630,30	455,25	539,28±0,36
Não especializado	324,26	539,38	503,03	357,40	431,02±0,36
Média	444,47±0,20b	648,92±0,20a	582,57±0,20ab	473,67±0,20b	-
	Contagem bacteriana total (unidades formadoras de colônia mL <sup>-1</sup> )				
Altamente especializado	211,33	209,86	155,73	239,09	204,00±0,05B
Especializado	229,50	201,98	202,64	245,26	219,83±0,05AB
Semiespecializado	235,23	211,09	263,86	292,21	250,60±0,05A
Não especializado	252,70	229,54	240,71	220,15	235,77±0,05A
Média	232,18±0,09	213,12±0,09	215,73±0,09	249,18±0,09	-

<sup>(1)</sup>Médias seguidas por letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

**Tabela 4.** Média±erro-padrão dos teores de ácidos graxos (mg g<sup>-1</sup>) saturados e somatório dos ácidos graxos saturados (ΣAGS) no leite bovino, nos sistemas de produção altamente especializado (AE), especializado (ES), semiespecializado (SE) e não especializado (NE), nas diferentes estações do ano<sup>(1)</sup>.

Sistema	Estação do ano				Média
	Primavera	Verão	Outono	Inverno	
			4:0 (ácido butírico)		
Altamente especializado	35,36Aa	33,13Ba	35,58Aa	29,61Aa	33,42±0,89
Especializado	40,94Aa	37,58Aba	37,22Aa	36,03Aa	37,94±0,89
Semiespecializado	39,54Aa	35,51Ba	37,64Aa	34,62Aa	36,83±0,89
Não especializado	33,18Ab	43,05Aa	35,02Aab	36,25Aab	36,88±0,89
Média	37,26±1,01	37,32±0,61	36,37±0,98	34,13±1,01	-
			6:0 (ácido capríco)		
Altamente especializado	12,37ABa	12,80Aa	13,34Aa	11,87Aa	12,59±0,35
Especializado	13,56Aa	13,82Aa	11,78Aa	12,01Aa	12,79±0,35
Semiespecializado	13,42Aa	12,19Aa	11,06Aa	12,11Aa	12,20±0,35
Não especializado	10,12Ba	13,25Aa	11,19Aa	11,20Aa	11,44±0,35
Média	12,37±0,29	13,02±0,34	11,84±0,27	11,80±0,40	-
			8:0 (ácido caprílico)		
Altamente especializado	7,93Aa	8,52Aa	8,41Aa	7,64Aa	8,12±0,19
Especializado	8,31Aab	9,21Aa	8,91Aa	6,41Ab	8,21±0,19
Semiespecializado	7,72ABa	8,43Aa	8,32ABa	7,63Aa	8,02±0,19
Não especializado	5,43Bb	7,90Aa	6,52Bab	6,57Aab	6,60±0,19
Média	7,34±0,22	8,51±0,15	8,04±0,18	7,06±0,16	-
			10:0 (ácido capríco)		
Altamente especializado	18,76Aa	17,60Aa	18,92Aa	19,17Aa	18,61±0,38
Especializado	17,52Aab	19,00Aa	15,96ABab	14,08Ab	16,64±0,38
Semiespecializado	17,46Aa	16,99Aa	14,58Ba	17,37Aa	16,60±0,38
Não especializado	12,56Bb	15,70Aab	17,38ABa	15,96Aab	15,40±0,38
Média	16,57±0,31	17,32±0,38	16,71±0,36	16,65±0,50	-
			12:0 (ácido láurico)		
Altamente especializado	19,27Aa	22,16Aa	23,11Aa	21,11Aa	21,41±0,68
Especializado	21,78Aa	21,08Aa	18,86Aa	19,14Aa	20,22±0,68
Semiespecializado	20,03Aa	19,62Aa	17,85Aa	19,63Aa	19,28±0,68
Não especializado	11,80Bb	18,69Aa	16,90Aab	17,73Aa	16,28±0,68
Média	18,22±0,35	20,39±0,57	19,18±0,73	19,40±0,66	-
			14:0 (ácido mirístico)		
Altamente especializado	93,67Aa	99,40Aa	100,02Aa	92,89Aa	96,50±1,93
Especializado	91,63Aa	96,47Aa	96,48Aa	87,67Aa	93,06±1,93
Semiespecializado	88,62Aa	93,63Aa	89,83ABa	86,45Aa	89,63±1,93
Não especializado	64,53Bb	87,75Aa	78,20Bab	84,27Aa	78,68±1,93
Média	84,61±1,60	94,31±1,18	91,13±1,61	87,82±1,65	-
			16:0 (ácido palmítico)		
Altamente especializado	229,38Ab	286,81Aa	276,05Aa	238,41Bab	257,66±4,45
Especializado	278,76Aab	297,12Aa	252,89ABb	313,34Aa	285,53±4,45
Semiespecializado	256,98Aa	267,19Aba	236,21Ba	230,18Ba	247,64±4,45
Não especializado	204,91Aa	258,95Ba	234,55Bab	205,24Bb	225,91±4,45
Média	242,51±4,97	277,52±3,88	249,93±3,27	246,79±5,32	-
			18:0 (ácido esteárico)		
Altamente especializado	104,72Ba	108,39Ba	110,43Aa	100,78Aa	106,08±2,20
Especializado	118,15ABab	127,40Aba	99,87Ab	106,57Aab	113,00±2,20
Semiespecializado	128,57Aa	114,95Bab	105,91Ab	109,59Aab	114,75±2,20
Não especializado	127,07Aa	141,87Aa	95,81Ab	122,70Aab	121,86±2,20
Média	119,63±1,40	123,15±1,67	103,01±2,09	109,91±3,26	-
			20:0 (ácido araquídico)		
Altamente especializado	1,07Cab	1,22Aa	1,05Aab	0,80Bb	1,03±0,05
Especializado	1,45BCa	1,47Aa	0,99Aab	0,87Bb	1,19±0,05
Semiespecializado	2,30Aa	1,36Ab	1,40Ab	0,89Bc	1,49±0,05
Não especializado	1,67Ba	1,61Aa	1,02Ab	1,70Aa	1,50±0,05
Média	1,62±0,05	1,41±0,04	1,11±0,06	1,07±0,03	-
			ΣAGS		
Altamente especializado	538,98ABa	610,06Aba	611,27Aa	536,08Aa	574,10±7,63
Especializado	618,31Aab	664,28Aa	548,41Bb	615,99Aab	611,74±7,63
Semiespecializado	609,12Aa	594,16Ba	514,30Bb	537,14Aab	563,68±7,63
Não especializado	496,90Bb	632,79Aba	503,51Bb	514,49Ab	536,92±7,63
Média	565,82±8,62	625,32±6,13	544,37±5,36	550,93±10,04	-

<sup>(1)</sup>Médias seguidas por letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

**Tabela 5.** Média±erro-padrão dos ácidos graxos (mg g<sup>-1</sup>) monoinsaturados, somatório dos ácidos graxos monoinsaturados (ΣAGMI), atividade da enzima delta(9)-dessaturase, índice de aterogenicidade, índice de trombogenicidade, razão de ácidos graxos hipocolesterolêmico e hipercolesterolêmico (h/H), ácidos graxos desejáveis e índice nutracêutico do leite bovino, nos sistemas de produção altamente especializado (AE), especializado (ES), semiespecializado (SE) e não especializado (NE), nas diferentes estações do ano<sup>(1)</sup>.

Sistema	Estação do ano				Média
	Primavera	Verão	Outono	Inverno	
			14:1n5-c9 (ácido miristoleico)		
Altamente especializado	6,75Ab	7,67Aab	8,40Aa	7,45Aab	7,57±0,14
Especializado	6,70Aa	6,13Aba	7,05ABa	5,19Ba	6,27±0,14
Semiespecializado	6,64Aa	6,97Aba	5,54Ba	6,06ABa	6,30±0,14
Não especializado	3,31Bc	5,59Bb	5,51Bb	7,65Aa	5,52±0,14
Média	5,85±0,14	6,59±0,16	6,63±0,15	6,59±0,19	-
			16:1n7-c9 (ácido palmitoleico)		
Altamente especializado	12,71Aab	13,72Aa	13,73Aa	10,42Ab	12,64±0,37
Especializado	12,70Aa	10,81Ba	10,99ABa	10,63Aa	11,28±0,37
Semiespecializado	12,25Aab	12,66ABa	9,74Bb	9,68Ab	11,08±0,37
Não especializado	10,71Aab	10,42Bab	8,99Bb	12,77Aa	10,71±0,37
Média	12,10±0,29	11,90±0,25	10,86±0,29	10,87±0,29	-
			18:1n9-t9 (ácido eláidico)		
Altamente especializado	3,78Aab	3,23Ab	3,48Ab	4,73Aa	3,81±0,11
Especializado	3,87Aab	3,55Aab	2,91Ab	4,35Ca	3,67±0,11
Semiespecializado	3,61Aab	3,35Ab	3,16Ab	4,44Aa	3,64±0,11
Não especializado	4,23Aa	3,92Aa	2,81Ab	3,37Bab	3,58±0,11
Média	3,88±0,15	3,51±0,10	3,09±0,09	4,22±0,08	-
			18:1n7-t11 (ácido transvacênico)		
Altamente especializado	14,14Bb	13,24Bb	16,97Aab	20,41Aa	16,19±0,53
Especializado	15,86ABb	13,21Bb	16,88Aab	22,62Aa	17,14±0,53
Semiespecializado	18,34Aa	18,97ABa	16,70Aa	20,24Aa	18,57±0,53
Não especializado	18,70Ab	22,12Aa	13,68Ac	23,52Aa	19,50±0,53
Média	16,76±0,36	16,89±0,74	16,06±0,53	21,70±0,53	-
			18:1n9-c9 (ácido oleico)		
Altamente especializado	127,11Aa	152,92Aa	162,13Aa	125,70Ba	141,96±4,95
Especializado	145,75Aa	154,22Aa	135,15Aa	126,93Ba	140,51±4,95
Semiespecializado	163,06Aa	162,80Aa	146,65Aa	125,38Ba	149,47±4,95
Não especializado	138,68Aab	157,11Aab	126,80Ab	176,60Aa	149,80±4,95
Média	143,65±4,07	156,76±4,91	142,68±5,32	138,65±4,39	-
			ΣAGMI		
Altamente especializado	165,43Aa	191,48Aa	208,33Aa	170,73Ba	183,99±5,38
Especializado	186,73Aa	191,01Aa	175,24Aa	173,77Ba	181,69±5,38
Semiespecializado	209,51Aa	203,49Aa	186,07Aa	169,17Ba	192,06±5,38
Não especializado	179,78Aab	206,65Aab	154,13Ab	229,73Aa	192,57±5,38
Média	185,36±4,98	198,16±5,08	180,94±5,61	185,85±5,17	-
			Delta (9)-dessaturase (C14)		
Altamente especializado	6,87Aa	7,48Aa	7,54Aa	7,33ABa	7,30±0,13
Especializado	7,11Aa	6,49ABab	6,51Aab	5,48Bb	6,40±0,13
Semiespecializado	6,78Aa	7,03ABa	6,25Aa	6,39Ba	6,61±0,13
Não especializado	5,32Ab	5,87Bb	6,30Ab	8,38Aa	6,47±0,13
Média	6,52±0,13	6,72±0,13	6,65±0,13	6,90±0,13	-
			Índice de aterogenicidade		
Altamente especializado	3,35Aa	3,23Aa	3,11ABb	3,24Aa	3,23±0,11
Especializado	3,35Aa	3,17Aa	3,47ABa	3,58Aa	3,39±0,11
Semiespecializado	2,91ABb	3,12Aab	3,77Aa	3,16Aab	3,24±0,11
Não especializado	2,38Ba	2,73Aa	2,72Ba	2,03Ba	2,47±0,11
Média	3,00±0,08	3,06±0,06	3,27±0,10	3,00±0,07	-
			Índice de trombogenicidade		
Altamente especializado	4,38ABa	4,38ABa	4,15Aa	4,30Ba	4,30±0,12
Especializado	4,57Aa	4,57Aa	4,76Aa	5,13Aa	4,76±0,12
Semiespecializado	3,85ABa	3,92ABa	4,87Aa	4,17Ba	4,20±0,12
Não especializado	3,69Bab	4,06Ba	4,38Aa	3,10Cb	3,81±0,12
Média	4,12±0,08	4,23±0,08	4,54±0,14	4,17±0,08	-
			Razão de ácidos graxos hipocolesterolêmico e hipercolesterolêmico (h/H)		
Altamente especializado	0,46Ba	0,44Aa	0,47Aa	0,45Ba	0,45±0,03
Especializado	0,45Ba	0,44Aa	0,41Aa	0,40Ba	0,43±0,03
Semiespecializado	0,53ABa	0,49Aa	0,47Aa	0,47Ba	0,49±0,03
Não especializado	0,63Aa	0,51Ab	0,46Ab	0,64Aa	0,56±0,03
Média	0,52±0,01	0,47±0,01	0,45±0,01	0,49±0,01	-
			Ácidos graxos desejáveis		
Altamente especializado	300,38Aa	323,80Aa	337,80Aa	312,37Aa	318,59±6,92
Especializado	339,94Aa	320,04Aa	315,60Aa	310,40Aa	321,49±6,92
Semiespecializado	346,99Aa	349,36Aa	315,60Aa	304,91Aa	330,48±6,92
Não especializado	354,78Aab	355,44Aab	298,55Ab	375,86Aa	346,16±6,92
Média	335,52±7,09	337,16±4,81	318,15±6,75	325,88±6,86	-
			Índice nutracêutico		
Altamente especializado	4,87Aab	2,28Bb	4,14Aab	6,59Ba	4,47±0,48
Especializado	4,14Aab	4,07Bb	4,04Ab	7,13ABa	4,85±0,48
Semiespecializado	7,32Aa	6,10ABa	3,64Ba	8,04ABa	6,27±0,48
Não especializado	7,11Ab	9,74Ab	4,68Ab	12,36Aa	8,47±0,48
Média	5,86±0,52	5,55±0,39	4,12±0,51	8,53±0,51	-

<sup>(1)</sup>Médias seguidas por letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

**Tabela 6.** Média±erro-padrão ajustadas dos ácidos graxos (mg g<sup>-1</sup>) poli-insaturados, somatório dos ácidos graxos ômega 3 (Σn3), dos ácidos graxos ômega 6 (Σn6), da relação ômega 6 e ômega 3 (Σn6:n3) e do total de ácidos graxos poli-insaturados (ΣAGPI) do leite bovino, nos sistemas produtivos altamente especializado (AE), especializado (ES), semiespecializado (SE) e não especializado (NE), nas distintas estações do ano<sup>(1)</sup>.

Sistema	Estação do ano				Média
	Primavera	Verão	Outono	Inverno	
	18:2n6-c9,c12 (ácido linoleico)				
Altamente especializado	12,19Aa	11,49Aa	11,85Aa	9,96Aa	11,37±0,26
Especializado	13,91Aa	9,97Ab	9,93Ab	10,46Ab	11,07±0,26
Semiespecializado	10,71Ba	10,45Aa	9,97Aa	9,28ABa	10,10±0,26
Não especializado	9,91Ba	8,50Ba	7,73Ba	7,70Ba	8,46±0,26
Média	11,68±0,29	10,10±0,16	9,87±0,25	9,35±0,32	-
	18:3n3-c9,c12,c15 (ácido α-linolênico-AAL)				
Altamente especializado	2,46Aab	1,66Bb	1,73Bb	3,11Aa	2,31±0,08
Especializado	2,73Aab	1,81Bb	2,14Ab	3,05Aa	2,43±0,08
Semiespecializado	3,09Aa	3,13Aa	1,60Bb	3,37Aa	2,80±0,08
Não especializado	3,04Aa	2,73Aa	1,81ABb	3,38Aa	2,67±0,08
Média	2,83±0,10	2,33±0,07	1,82±0,04	3,23±0,10	-
	18:2n7- c9,t11 (ácido rumênico-CLA)				
Altamente especializado	6,60Aa	5,33Aa	6,39Aa	7,40ABa	6,43±0,20
Especializado	5,97Aa	6,38Aa	5,58Aa	7,20Ba	6,28±0,20
Semiespecializado	7,11Aa	5,16Ab	5,65Aab	6,71Bab	6,16±0,20
Não especializado	7,34Ab	5,78Abc	4,87Ac	10,00Aa	7,00±0,20
Média	6,76±0,17	5,66±0,18	5,62±0,18	7,83±0,26	-
	18:2n6-t10,c12 (ácido t10,c12-octadecadienoico-CLA)				
Altamente especializado	0,21Ba	0,30Aa	0,28Aa	0,23Ca	0,26±0,01
Especializado	0,30Bab	0,36Aa	0,24Ab	0,37Ba	0,32±0,01
Semiespecializado	0,31Bab	0,31Aab	0,28Ab	0,37Ba	0,32±0,01
Não especializado	0,55Ab	0,36Ac	0,22Ad	0,73Aa	0,46±0,01
Média	0,34±0,01	0,33±0,01	0,26±0,01	0,43±0,01	-
	20:4n6-c5,c8,c11,c14 (ácido araquidônico-AA)				
Altamente especializado	0,69ABa	0,80Aa	0,81Aa	0,66Aa	0,74±0,02
Especializado	0,83Aa	0,82Aa	0,65Aa	0,64Aa	0,73±0,02
Semiespecializado	0,66ABa	0,68ABa	0,68Aa	0,56Aa	0,64±0,02
Não especializado	0,58Ba	0,57Ba	0,44Ba	0,64Aa	0,56±0,02
Média	0,69±0,02	0,72±0,02	0,65±0,02	0,63±0,02	-
	20:5n3-c5,c8,c11,c14,c17 (ácido timnodônico-EPA)				
Altamente especializado	0,34Aab	0,34Cab	0,41Aa	0,28Bb	0,34±0,01
Especializado	0,21Bb	0,38BCa	0,24Bb	0,30Bab	0,28±0,01
Semiespecializado	0,15Bc	0,47Ba	0,27Bb	0,38Bab	0,32±0,01
Não especializado	0,26ABc	0,75Aa	0,41Ab	0,68Aa	0,52±0,01
Média	0,24±0,01	0,48±0,01	0,33±0,01	0,41±0,01	-
	Σn3				
Altamente especializado	2,72Aa	2,35Aa	3,02Aa	3,21Aa	2,83±0,08
Especializado	2,94Aa	3,24Aa	2,14Aa	3,36Aa	2,92±0,08
Semiespecializado	3,18Aa	2,40Aa	2,27Aa	3,51Aa	2,84±0,08
Não especializado	3,36Aab	2,94Aab	2,30Ab	3,80Aa	3,10±0,08
Média	3,05±0,11	2,73±0,11	2,43±0,09	3,47±0,16	-
	Σn6				
Altamente especializado	14,85ABa	14,65Aa	14,54Aa	12,57Aa	14,15±0,28
Especializado	17,43Aa	13,65ABb	12,98Ab	13,38Ab	14,36±0,28
Semiespecializado	14,00ABa	12,56ABa	13,31Aa	11,80Aa	12,92±0,28
Não especializado	12,62Ba	11,41Ba	9,96Ba	10,31Ba	11,07±0,28
Média	14,72±0,33	13,07±0,22	12,70±0,25	12,02±0,30	-
	Σn6:n3				
Altamente especializado	4,27Ab	7,49Aa	6,68Aa	4,35Ab	5,70±0,14
Especializado	4,94Aa	3,77Ca	5,25Ba	4,40Aa	4,59±0,14
Semiespecializado	3,33Ab	5,74Ba	7,04Aa	3,56Ab	4,92±0,14
Não especializado	3,06Aa	3,42Ca	4,24Ba	3,40Aa	3,53±0,14
Média	3,90±0,17	5,10±0,14	5,80±0,13	3,93±0,12	-
	ΣAGPI				
Altamente especializado	25,09Aa	22,15Aa	25,52Aa	25,02ABa	24,44±0,43
Especializado	25,81Aa	23,00Aab	21,47ABb	25,44ABab	23,93±0,43
Semiespecializado	24,96Aa	21,94Aa	21,40ABa	22,55Ba	22,71±0,43
Não especializado	23,41Aa	24,49Aa	17,40Ba	27,40Aa	23,17±0,43
Média	24,82±0,45	22,90±0,49	21,45±0,45	25,10±0,42	-

<sup>(1)</sup>Médias seguidas por letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

outono resulta em menores níveis dietéticos de ácido alfa-linolênico, com reflexo no conteúdo do ácido rumênico no leite (Tabela 6).

Portanto, os extratos produtivos altamente especializado e não especializado apresentam características importantes para o aumento do potencial nutracêutico do leite, uma vez que o ácido linoleico conjugado (CLA) está relacionado à redução de uma série de doenças degenerativas, como aterosclerose, à prevenção e tratamento do diabetes mellitus, além de apresentar efeito anticarcinogênico, ser estimulante do sistema imunológico, reduzir a pressão arterial e atuar no metabolismo lipídico corporal, especialmente na redução da gordura corporal e no aumento da massa magra (Kratz et al., 2013; Lahlou et al., 2014). No entanto, o principal antecessor metabólico do ácido rumênico em ruminantes, o ácido transvacênico, por sua conformação geométrica (trans) poderia exercer ação prejudicial à saúde; contudo, Haug et al. (2007) constataram que, em humanos, este ácido graxo pode ser convertido ao seu sucessor.

As principais diferenças observadas no presente estudo estão relacionadas ao comportamento do ácido linoleico e do ácido alfa-linolênico nos diferentes sistemas de produção e estações do ano. As alterações observadas quanto aos conteúdos destes ácidos graxos no leite estão ligadas a modificações no conteúdo de seus sucessores – respectivamente o ácido araquidônico (20:4n6-c5,c8,c11,c14) e o timnodônico (20:5n3-c5,c8,c11,c14,c17) (Tabela 6). De acordo com Simopoulos (2006), a ação de enzimas dessaturases e elongases converte os sucessores em seus respectivos derivados. Entretanto, é importante ressaltar que essas duas famílias de ácidos graxos competem pelas mesmas enzimas envolvidas na dessaturação e no alongamento de suas cadeias (Simopoulos, 2006). Assim, conforme o autor, o balanço entre ômega 6 e ômega 3 ( $\Sigma n6:n3$ ), na dieta, assume grande importância na nutrição humana, tendo-se preconizado a diminuição dessa relação.

Os valores de  $\Sigma n6:n3$  diminuíram à medida que a especialização dos sistemas produtivos também diminuiu (Tabela 5). Como Simopoulos (2006) preconiza  $\Sigma n6:n3$  de 2:1 a 4:1, os melhores resultados foram obtidos no sistema não especializado.

O perfil de ácidos graxos mais apropriado para a alimentação humana foi obtido com a diminuição da especialização dos sistemas produtivos e nas estações

com maior participação de gramíneas temperadas, ou seja, no inverno e na primavera. Assim, o nível não especializado, no inverno, apresentou o melhor índice nutracêutico do estudo (Tabela 5), pois, além de apresentar maior participação de forrageiras frescas na dieta, o perfil de ácidos graxos nas pastagens temperadas (Tabela 2) favorece a formação dos ácidos transvacênico, rumênico e do ácido t10,c12-octadecadienoico, além de diminuir a  $\Sigma n6:n3$  no leite (Roy et al., 2006; Chilliard et al., 2007).

O índice nutracêutico proposto mostrou maior poder de diferenciação entre os sistemas de produção, pois as diferenças no índice acentuaram-se entre os extratos mais e menos especializados, principalmente nas estações verão e inverno (Tabela 5). Assim, em estudos de manipulação da dieta que visem à obtenção de um perfil de ácidos graxos mais adequado para o leite de consumo, sugere-se o índice nutracêutico como parâmetro de avaliação da qualidade da fração lipídica do leite.

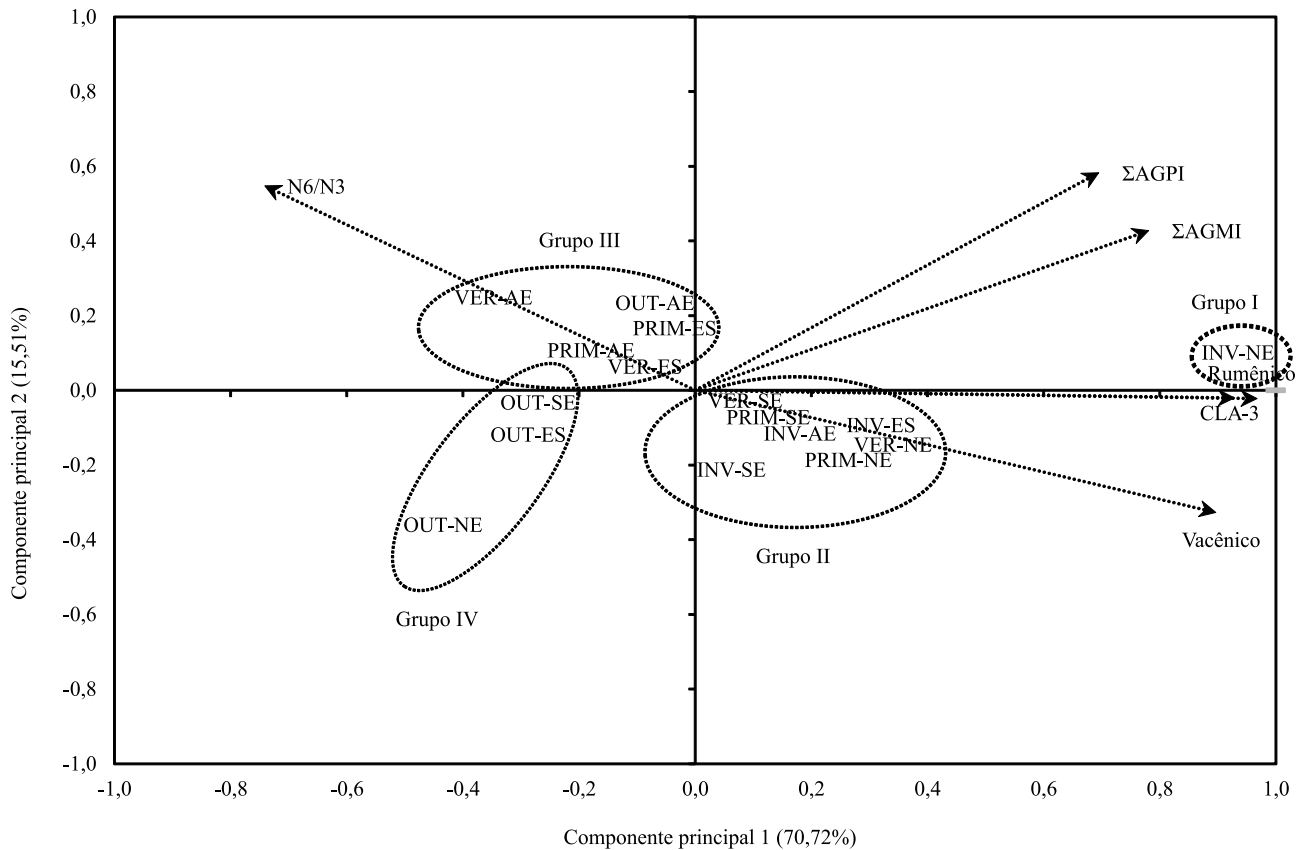
Além disso, o índice nutracêutico pode ser considerado adequado para analisar a capacidade do leite de contribuir na prevenção e combate de doenças cardiovasculares, uma vez que o nutracêutico apresentou correspondência inversa com os índices de aterogenicidade e trombogenicidade, propostos por Ulbricht & Southgate (1991), e relação direta com a razão entre ácidos graxos hipocolesterolêmico e hipercolesterolêmico (Santos-Silva et al., 2002) (Tabela 5). O índice também se mostrou mais eficiente na avaliação do potencial nutracêutico do leite do que o conteúdo de ácidos graxos desejáveis (Costa et al., 2008), que não apresentou correspondência com os índices estudados no presente trabalho.

Com a análise de variância multivariada, verificou-se diferença significativa entre os vetores de médias, para as diferentes combinações de sistemas produtivos e estações do ano, tanto pelo teste de Wilks, quanto pelos testes Pillai, Hotelling-Lawley e Roy. Os três primeiros autovalores foram significativos pelo teste da razão de verossimilhança; o primeiro autovalor explicou 70,72%, e o segundo, 15,51%, ou seja, os dois primeiros autovalores explicaram 86,23% da variação total dos dados relacionados ao potencial nutracêutico do leite bovino (Figura 1). Portanto, a análise de componentes principais permitiu visualizar a similaridade e dissimilaridade entre as diferentes combinações entre sistemas produtivos e estações.

As variáveis  $\Sigma$ AGPI ( $r=0,69, p<0,01$ ),  $\Sigma$ AGMI ( $r=0,78, p<0,001$ ),  $\Sigma n6:n3$  ( $r=-0,74, p<0,01$ ), ácido rumênico ( $r=0,97, p<0,001$ ) e ácido t10,c12-octadecadienoico ( $r=0,93, p<0,001$ ) explicaram a variabilidade do CP1 (componente principal 1), ao passo que as variáveis  $\Sigma n6:n3$  ( $r=0,55, p<0,05$ ) e  $\Sigma$ AGPI ( $r=0,58, p<0,05$ ) explicaram a variabilidade do CP2 (Figura 1). A partir das correlações dos componentes principais com as variáveis, pode-se observar que quanto mais à direita (variação explicada pelo CP1) e acima (variação explicada pelo CP2) as combinações se localizarem no plano cartesiano, maior será o potencial nutracêutico do leite, uma vez que essas posições apresentam valores mais elevados de  $\Sigma$ AGPI,  $\Sigma$ AGMI, ácido rumênico e ácido t10,c12-octadecadienoico, e menores de  $\Sigma n6:n3$ ;

exceto pela variação explicada pelo CP2 em relação ao  $\Sigma n6:n3$ , que apresentou maiores valores em posições mais elevadas.

A análise de agrupamento mostrou que foi quatro o número ideal de grupos formados entre as 16 possíveis combinações entre sistemas produtivos e estações do ano, em que: o grupo I englobou a classe inverno-não especializado; o grupo II, as classes primavera-semiespecializado, primavera-não especializado, verão-semiespecializado, verão-não especializado, inverno-altamente especializado, inverno-especializado e inverno-semiespecializado; o grupo III, as classes primavera-altamente especializado, primavera-especializado, verão-altamente especializado, verão-especializado e outono-altamente



**Figura 1.** Projeção bidimensional dos escores das diferentes combinações entre os sistemas de produção – altamente especializado (AE), especializado (ES), semiespecializado (SE) e não especializado (NE) – e as diferentes estações do ano – primavera (PRIM), verão (VER), outono (OUT) e inverno (INV), além das cargas (correlações entre as variáveis e os componentes principais) das variáveis: ácido vacênico, total de ácidos graxos monoinsaturados ( $\Sigma$ AGMI), poli-insaturados ( $\Sigma$ AGPI), relação dos ácidos graxos ômega 6 e ômega 3 (N6/N3) e os isômeros de ácido linoleico conjugado (CLA), ácido rumênico e ácido t10,c12-octadecadienoico (18:2n6-t10,c12).

especializado; e o grupo IV, as classes outono-especializado, outono-semiespecializado e outono-não especializado (Figura 1).

Portanto, no outono, todos os sistemas produtivos situaram-se no grupo IV, exceto o altamente especializado, que se localizou no grupo III; esse extrato produtivo foi o único capaz de mitigar os efeitos negativos da carência de forragens no outono sobre a qualidade da fração lipídica do leite, o que culminou com um aumento de  $\Sigma$ AGPI,  $\Sigma$ AGMI, ácido rumênico e ácido t10,c12-octadecadienoico, variação esta explicada pelo CP1 (Figura 1).

Entretanto, é importante ressaltar que, por meio da análise das variáveis que explicaram a variabilidade do CP2, observou-se aumento na  $\Sigma n6:n3$  no nível altamente especializado, no outono, em comparação aos outros sistemas produtivos. Isto se atribui, segundo Chilliard et al. (2007), ao incremento do fornecimento de fontes dietéticas com elevados teores de ácido linoleico, como a silagem de milho e o concentrado (Tabela 2), o que elevaria a absorção intacta desse principal representante da família ômega 6 no leite (Figura 1).

Além da combinação outono-altamente especializado, outras quatro assentaram-se no grupo III, compostas pelos sistemas produtivos altamente especializado e especializado, nas estações verão e primavera (Figura 1). Porém, nota-se que as combinações dessas estações com os níveis de menor especialização migraram para o grupo II. Essa migração pode ser explicada pelas diferenças no manejo nutricional entre os diferentes extratos produtivos. Os sistemas mais especializados necessitaram desocupar áreas antes destinadas ao pastejo, para destiná-las ao plantio do milho, entre a primavera e o verão, o que resultou em diminuição do fornecimento de forrageiras frescas, em razão do aumento da oferta de silagem de milho e concentrado. Isso manteve esses sistemas de produção no grupo III (Figura 1), principalmente em razão dos maiores valores de  $\Sigma n6:n3$  (variação explicada pelo CP1 e CP2) e menores de  $\Sigma$ AGPI,  $\Sigma$ AGMI, ácido rumênico e ácido t10,c12-octadecadienoico, em comparação ao grupo II (variação explicada principalmente pelo CP1).

Esse manejo nutricional, entretanto, não ocorreu em propriedades dos extratos produtivos menos especializados, que apresentaram menor ou nenhum fornecimento de silagem de milho na dieta (Tabela 1).

O extrato semiespecializado, que também utiliza silagem de milho e concentrado, mas em menores proporções, apesar de situar-se no grupo II, deslocou-se em direção ao grupo III (Figura 1), o que corrobora a explicação anterior.

No grupo II, além das combinações dos sistemas semiespecializados e não especializados com as estações primavera e verão, ocorreram todas as combinações dos extratos produtivos com a estação inverno, exceto para a combinação inverno-não especializado, que foi o único representante do grupo I, caracterizado pelo leite de maior potencial nutracêutico. Essa variação foi explicada principalmente pelo CP1, já que esses grupos diferiram minimamente quanto ao CP2.

## Conclusões

1. Os sistemas de produção e as estações do ano interferem conjuntamente no perfil de ácidos graxos do leite bovino, mas isoladamente em sua qualidade físico-química e microbiológica.

2. As maiores contagens de células somáticas e os menores valores de proteína são obtidos no verão e, com a diminuição do grau de especialização das unidades produtoras, a contagem bacteriana total aumenta.

3. Os leites bovinos de maior potencial nutracêutico são obtidos no inverno, nos sistemas não especializados de produção, que apresentam os maiores teores de ácidos graxos poli-insaturados, ácido rumênico e ácido t10,c12-octadecadienoico.

4. O sistema de produção não especializado, no inverno, apresenta os melhores índices de aterogenicidade, trombogenicidade, razão de ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos e, em especial, o melhor índice nutracêutico.

5. Em razão de sua alta capacidade em diferenciar alterações no manejo nutricional dos animais, o índice nutracêutico deve ser preferido para a avaliação da qualidade da fração lipídica do leite bovino.

## Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Fapergs), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio e auxílio financeiro prestados.



## Referências

- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, p.911-917, 1959. DOI: 10.1139/o59-099.
- BODENMÜLLER FILHO, A.; DAMASCENO, J.C.; PREVIDELLI, I.T.S.; SANTANA, R.G.; RAMOS, C.E.C. de O.; SANTOS, G.T. dos. Tipologia de sistemas de produção baseada nas características do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.1832-1839, 2010. DOI: 10.1590/S1516-35982010000800028.
- CHILLIARD, Y.; GLASSER, F.; FERLAY, A.; BERNARD, L.; ROUEL, J.; DOREAU, M. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.109, p.828-855, 2007. DOI: 10.1002/ejlt.200700080.
- CHRISTIE, W.W. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesteryl esters. **Journal of Lipid Research**, v.23, p.1072-1077, 1982.
- COSTA, R.G.; MESQUITA, Í.V.U.; QUEIROGA, R. de C.R. do E.; MEDEIROS, A.N. de; CARVALHO, F.F.R. de; BELTRÃO FILHO, E. Características químicas e sensoriais do leite de cabras Moxotó alimentadas com silagem de maniçoba. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.694-702, 2008. DOI: 10.1590/S1516-35982008000400016.
- DEWHURST, R.J.; SHINGFIELD, K.J.; LEE, M.R.F.; SCOLLAN, N.D. Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. **Animal Feed Science and Technology**, v.131, p.168-206, 2006. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2006.04.016.
- FANTI, M.G.N.; ALMEIDA, K.E. de; RODRIGUES, A.M.; SILVA, R.C. da; FLORENCE, A.C.R.; GIOIELLI, L.A.; OLIVEIRA, M.N. de. Contribuição ao estudo das características físico-químicas e da fração lipídica do leite orgânico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.259-265, 2008. DOI: 10.1590/S0101-20612008000500039.
- GABBI, A.M.; MCMANUS, C.M.; SILVA, A.V.; MARQUES, L.T.; ZANELA, M.B.; STUMPF, M.P.; FISCHER, V. Typology and physical-chemical characterization of bovine milk produced with different productions strategies. **Agricultural Systems**, v.121, p.130-134, 2013. DOI: 10.1016/j.agsy.2013.07.004.
- HAUG, A.; HØSTMARK, A.T.; HARSTAD, O.M. Bovine milk in human nutrition – a review. **Lipids in Health and Disease**, v.25, p.1-16, 2007. DOI: 10.1186/1476-511x-6-25.
- KRATZ, M.; BAARS, T.; GUYENET, S. The relationship between high-fat dairy consumption and obesity, cardiovascular, and metabolic disease. **European Journal of Nutrition**, v.52, p.1-24, 2013. DOI: 10.1007/s00394-012-0418-1.
- LAHLOU, M.N.; KANNEGANTI, R.; MASSINGILL, L.J.; BRODERICK, G.A.; PARK, Y.; PARIZA, M.W.; FERGUSON, J.D.; WU, Z. Grazing increases the concentration of CLA in dairy cow milk. **Animal**, v.8, p.1191-1200, 2014. DOI: 10.1017/S1751731114000998.
- ROY, A.; FERLAY, A.; SHINGFIELD, K.J.; CHILLIARD, Y. Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to plant oils in cows given different basal diets, with particular emphasis on trans-C18:1 fatty acids and isomers of conjugated linoleic acid. **Animal Science**, v.82, p.479-492, 2006. DOI: 10.1079/asc.200658.
- SANTOS-SILVA, J.; BESSA, R.J.B.; SANTOS-SILVA, F. Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs: II. Fatty acid composition of meat. **Livestock Production Science**, v.77, p.187-194, 2002. DOI: 10.1016/S0301-6226(02)00059-3.
- SHOOK, G.E. Genetic improvement of mastitis through selection on somatic cell count. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.9, p.563-581, 1993.
- SIMIONATO, J.I.; GARCIA, J.C.; SANTOS, G.T. dos; OLIVEIRA, C.C.; VISENTAINER, J.V.; SOUZA, N.E. de. Validation of the determination of fatty acids in milk by gas chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.21, p.520-524, 2010. DOI: 10.1590/S0103-50532010000300018.
- SIMOPOULOS, A.P. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.60, p.502-507, 2006. DOI: 10.1016/j.biopha.2006.07.080.
- TRIPATHI, M.K. Effect of nutrition on production, composition, fatty acids and nutraceutical properties of milk. **Advances in Dairy Research**, v.2, p.1-11, 2014. DOI: 10.4172/2329-888X.1000115.
- ULBRICHT, T.L.V.; SOUTHGATE, D.A.T. Coronary heart disease: seven dietary factors. **Lancet**, v.338, p.985-992, 1991. DOI: 10.1016/0140-6736(91)91846-M.
- VARGAS, D.P. de; NÖRNBERG, J.L.; MELLO, R. de O.; SHEIBLER, R.B.; MILANI, M.P.; MELLO, F.C.B. Correlações entre contagem bacteriana total e parâmetros de qualidade do leite. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.20, p.241-247, 2013.
- VARGAS, D.P. de; NÖRNBERG, J.L.; MELLO, R. de O.; SHEIBLER, R.B.; BREDA, F.C.; MILANI, M.P. Correlações entre contagem de células somáticas e parâmetros físico-químicos e microbiológicos de qualidade do leite. **Ciência Animal Brasileira**, v.15, p.473-483, 2014. DOI: 10.4322/rbcv.2014.009.

Recebido em 13 de janeiro de 2015 e aprovado em 6 de outubro de 2015