

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO LEITE DE TANQUES DE PROPRIEDADES
LEITEIRAS DO ESTADO DO PARANÁ

Autor: Jakeline Fernandes Cabral
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos
Coorientador: Prof. Dr. Ferenc Istvan Bánkuti

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de Concentração Produção Animal.

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro – 2020.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO LEITE DE TANQUES DE PROPRIEDADES
LEITEIRAS DO ESTADO DO PARANÁ

Autor: Jakeline Fernandes Cabral
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos
Coorientador: Prof. Dr. Ferenc Istvan Bánkuti

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de Concentração Produção Animal.

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro – 2020.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e Classificação da Biblioteca Central da UEM

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

C117a

Cabral, Jakeline Fernandes

Avaliação da qualidade do leite de tanques de propriedades leiteiras do Estado do Paraná / Jakeline Fernandes Cabral. -- Maringá, PR, 2020.

125 f.: il. color., figs., tabs., maps.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos.

Coorientador: Prof. Dr. Ferenc Istvan Bánkuti.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2020.

1. Qualidade do leite. 2. Compostos nutracêuticos. 3. Hormônios tireoidianos. 4. Higiene de ordenha. 5. Leite - Contaminantes. I. Santos, Geraldo Tadeu dos, orient. II. Bánkuti, Ferenc Istvan, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

CDD 23.ed. 637.1



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO LEITE DE TANQUES
DE PROPRIEDADES LEITEIRAS DO ESTADO DO PARANÁ

Autora: Jakeline Fernandes Cabral
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos

TITULAÇÃO: Doutora em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 27 de fevereiro de 2020.

Profª Drª Francilaine Eloise De
Marchi

Profª Drª Magali Soares dos
Santos Pozza

Prof. Dr. Rodolpho Martin do
Prado

Profª Drª Marcia Andreazzi

Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos
Orientador

EPÍGRAFE

"Desistir? Eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério.
É que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas,
mais esperança nos meus passos do que tristeza nos meus ombros,
mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça"

Cora Coralina

"Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina"

Cora Coralina

DEDICATÓRIAS

Aos

meus pais Obrensair Fernandes da Silva e Ivanilda Gomes da Silva, por mais um incentivo, apoio e acima de tudo o amor incondicional de pais para filha, vocês são o meu alicerce e minha força para continuar batalhando. É com, e para vocês que realizo mais um sonho;

Aos

meus irmãos Vinícius Fernandes Cabral e Bárbara Fernandes Martins, pela confiança, amor, amizade e apoio;

Ao

meu esposo Rogério Favareto, que sempre esteve ao meu lado nos momentos bons e ruins, sempre me apoiando. Pela compreensão demonstrada durante minhas ausências, companheirismo e pelo incentivo. Obrigada por sempre estar ao meu lado e fazer parte da minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder a vida, por estar sempre presente me dando forças, por me erguer nos momentos de dificuldade nunca deixando que eu desistisse e sempre me mostrando que todo dia é dia para recomeçar e lutar.

Quero expressar minha imensa gratidão ao meu Orientador Professor Dr. Geraldo Tadeu dos Santos, por me conceder a oportunidade de aprimorar meus conhecimentos, pela amizade e pela confiança em mim depositada.

A Universidade Estadual de Maringá, que foi fundamental na minha educação, crescimento profissional e a oportunidade de desenvolver meu trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, que dispôs de excelentes profissionais e saberes para formar pessoas e profissionais melhores e mais qualificados, o meu muito obrigado a todos os professores e os que tiveram contribuição especial no meu trabalho, meu coorientador Ferenc Istivan, João Daniel, Magali Pozza, Claudete, Júlio Damasceno e colaboradores Francilaine Eloise, Ranulfo, Érica Barizão, Angélica, Luciano Lima, Ana Caroline, Larissa, Solange (secretária), e grupo GISPA, EMATER - PR.

Aos professores e alunos de outros departamentos Toxicologia, Farmácia, Química, Agronomia, Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, que me auxiliaram tirando dúvidas e me ensinado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos.

Aos meus amigos e companheiros do grupo de pesquisa NUPEL, Jesus Cardozo, Micheli Sippert, Kleves Almeida, Jean Lourenço, Karol Guimarães, Thomer Durman, Monique Figueiredo e os alunos de IC Beatriz e Regina. Sem vocês nada disso seria possível, vocês dedicaram tempo, conhecimentos e esforços para me ajudar a tornar este trabalho realidade. Deus foi perfeito em juntar todos nós no mesmo lugar.

E com muita gratidão e emoção que agradeço uma pessoa muito querida e especial que me ajudou, puxou orelha e se tornou grande amiga e confidente, Fran você é a peça do quebra-cabeça que não poderia faltar.

Aos funcionários do setor de bovinocultura de leite, da Fazenda de Iguatemi – FEI que estiveram sempre de prontidão e ajudaram em todos os trabalhos, certamente sem vocês tudo seria mais difícil, Célio, Dú, André e Agamenon.

A EMBRAPA Soja (Laboratório de solos), por disponibilizar o equipamento nos testes de digestão das amostras.

Aos meus amigos e colegas de pós-graduação, Bruna Calvo e Nadine Woruby, que me auxiliaram nas análises de antioxidantes, Pedro Loesia, que auxiliou nas análises estatística e aos demais Lidiane Staub, Jailton Bezerra, Kariny Moreira e Vanessa Pontes.

A todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Jakeline Fernandes Cabral, filha de Ivanilda Gomes da Silva e Obrensair Fernandes da Silva. Nasceu em 24 de fevereiro de 1988 na cidade de Rio Verde no sudoeste do estado de Goiás. Irmã de Vinícius Fernandes Cabral e Bárbara Fernandes Martins. Deu início em sua formação acadêmica no Centro Federal de Educação Tecnológica de Rio Verde – Goiás no curso Técnico em Zootecnia no ano de 2004. Em 2006, trabalhou na área de formação, atuando em vendas de produtos veterinários e consultoria. Em 2007, iniciou a Graduação em Zootecnia no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde e concluiu o curso em 2011. No segundo semestre de 2011, iniciou o Mestrado no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia na área de Produção Animal e defendeu em 2012. Em 2013, foi aprovada no processo seletivo para professor de cargo temporário no Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde. Ministrou disciplinas de microbiologia geral, microbiologia de alimentos, tecnologia de carnes e derivados e tecnologia de ovos e mel nos cursos de graduação em engenharia de alimentos, técnico e proeja em alimentos. No curso de Ciências Biológicas, microbiologia geral. Em 2015, foi contratada pelo Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial – SENAI, como profesora e ministrou aulas no curso de Química Industrial. Em 2016, iniciou no doutorado na Universidade Estadual de Maringá no Programa de Pós-graduação em Zootecnia área de Concentração Produção Animal. No dia 22 de março de 2019, submeteu-se à banca examinadora para o exame de qualificação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de doutora em Zootecnia e foi aprovada. Em fevereiro de 2020 defendeu a tese de doutorado e foi aprovada.

ÍNDICE

	Páginas
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
1 Composição Química.....	4
1.2 Gordura.....	5
1.2.1 Ácidos Graxos.....	6
1.3 Proteínas.....	9
1.4 Lactose.....	11
1.5 Contagem de células somáticas (CCS).....	12
2.0 Antioxidantes.....	13
2.1. Carotenoides.....	14
2.1.2 Polifenóis.....	15
3. Iodo.....	16
3.1 Metabolismo do Iodo - Síntese e secreção dos hormônios da tireoide.....	19
3.2 Deficiência e Excesso de iodo.....	23
4.0 Antibacterianos.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
III. OBJETIVOS.....	36
Objetivos Gerais:.....	36
Objetivos específicos:.....	36
IV – Alteração da concentração de iodo do leite, por uso de agentes iodados durante a ordenha.....	38
RESUMO.....	38
ABSTRACT.....	38

INTRODUÇÃO	39
MATERIAL E MÉTODOS	40
Local e Experimento:.....	40
Animais e Delineamento experimental.....	40
Coleta de alimentos e análise de alimentos	42
Coleta e análise de sangue	43
Coleta e análise de urina	43
Coleta e análise do leite	43
Análise Estatística.....	45
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
V - Concentração de iodo no leite cru e seus indicadores em regiões do Estado do Paraná	56
RESUMO.....	56
ABSTRACT.....	56
INTRODUÇÃO	57
MATERIAIS E MÉTODOS	59
Análise das amostras de leite	60
Análise Estatística.....	64
RESULTADOS	67
DISCUSSÃO	78
CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS.....	86
VI – Identificação e quantificação de resíduos de antibióticos (ceftiofur, cloxacilina, enrofloxacina) no leite da região norte central do estado do Paraná – Brasil.....	90
Resumo	90
Abstract.....	90
1 Introdução	91
2 Material e Métodos	92
2.1 Local	92
2.2 Amostras experimentais.....	93
2.3 Preparo das amostras	94
2.4 Análise de antimicrobianos.....	95
2.5 Curva de calibração	95
2.6 Análise Estatística.....	96
3 Resultados.....	97

4 Discussão	975
5 Conclusão.....	104
6 Referências bibliográficas.....	105

ÍNDICE DE TABELAS

	Páginas
II. REVISÃO DE LITERATURA	4
Tabela 1: Percentual da composição química do leite de diferentes espécies	4
Tabela 2: Principais proteínas constituintes do leite bovino.....	10
IV – Alteração da concentração de iodo do leite, por uso de agentes iodados durante a ordenha.....	38
Tabela 1: Dieta total misturada	41
Tabela 2: Concentração de iodo no leite e na urina e concentração dos hormônios T3 e T4 de vacas da raça Holandês submetidas a <i>pré</i> e <i>pós-dipping</i> com sanitizantes contendo níveis diferentes de iodo.....	47
Tabela 3: Correlação entre o iodo dos alimentos da dieta com o do leite, urina, T3 e T4 ..	49
Tabela 4 – Porcentagem de proteína, gordura, lactose, nitrogênio ureico do leite, contagem de células somáticas em amostras de leite de vacas da raça Holandês, submetidas a <i>pré</i> e <i>pós-dipping</i> com sanitizante contendo níveis diferente de iodo.	51
V - Concentração de iodo no leite cru e seus indicadores em regiões do Estado do Paraná	56
Tabela 1: Variáveis relativa ao questionário, níveis de medida e análise estatística.....	66
Tabela 2: Análise de Cluster – Agrupamento usando Método Ward com distância Euclidiana	67
Tabela 3: Concentração de iodo nas amostras de leite avaliado, oriundo das diferentes regiões do estado.....	68
Tabela 4: Textura do solo e concentração de iodo no leite.....	68
Tabela 5: Comparações entre <i>cluster</i> nas variáveis métricas	69
Tabela 6: Verificação da adequação da análise	71
Tabela 7: Autovalor e variância explicada de cada fator.....	71
Tabela 8: Resultados das Cargas fatoriais	72

Tabela 9: Valores médios dos indicadores de cada fator na concentração de iodo	74
VI – Identificação e quantificação de resíduos de antibióticos (ceftiofur, cloxacilina, enrofloxacina) pelo método QuEChERS modificado no leite da região norte central do estado do Paraná – Brasil.....	90
Tabela 1: Frequência de propriedades leiteiras com presença de resíduo de diferentes antibióticos no leite.....	98
Tabela 2: Resultado das quantificações dos resíduos de antibiótico no leite	98
Tabela 3: Comparação entre o tempo de descarte e a presença de resíduo de antibiótico ..	99
Tabela 4: Comparação entre as variáveis do manejo de ordenha do questionário com os resultados de resíduos de antibiótico no leite	100
Tabela 5: Frequência das variáveis dos questionários, referentes ao manejo sanitário em relação a presença de antibiótico no leite da região norte do Paraná	101

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
II. REVISÃO DE LITERATURA	4
Figura 1: Formação e Estrutura do triglicerídeo. Fonte: Adaptado de Jun et al., (2016).	6
Figura 2: Metabolismo ruminal dos lipídeos e origem do CLA depositado no leite e carne de ruminantes. Adaptado de Tanaka (2005).	8
Figura 3: Esquema de um corte histológico da tireoide com algumas estruturas identificadas. Fonte: http://lab-siviero.icb.usp.br	19
V - Concentração de iodo no leite cru e seus indicadores em regiões do Estado do Paraná	56
Figura 1: Estado do Paraná e Mesorregiões Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia Estatística – IBGE 2018.....	59
VI – Identificação e quantificação de resíduos de antibióticos (ceftiofur, cloxacilina, enrofloxacina) pelo método QuEChERS modificado no leite da região norte central do estado do Paraná – Brasil.....	90
Figura 1: Imagem demarcada da área e perímetro da região de coleta de dados. Fonte: Google Earth (2020).	93

RESUMO

O objetivo com este estudo foi identificar em propriedades leiteiras fatores que influenciam a qualidade do leite com o propósito de buscar um leite naturalmente enriquecido com compostos nutracêuticos principalmente como os ácidos graxos da família ômega 3, ômega 6 e ácido linoleico conjugado (CLA) e os polifenóis como antioxidantes. Consequentemente identificar sistemas de produção com os melhores componentes físico-químicos do leite, além de compreender as fontes e fatores de contaminação do leite com iodo e avaliando as práticas higiênicas-sanitárias realizadas no processo diário da produção de leite, além da contaminação por antimicrobianos. Para isto, três trabalhos foram desenvolvidos. **Capítulo IV:** Neste experimento foi avaliada a influência do uso de diferentes concentrações de iodo na solução *pré* e *pós-dipping* no processo de higienização dos tetos de vacas da raça Holandês sobre a concentração de iodo do leite, urina e sobre os níveis de hormônios séricos tiroídianos. Foi utilizado no experimento 4 vacas holandesas, com aproximadamente 120 dias de lactação, com produção média de 18 kg de leite, pesando 566 ± 64 kg, em quadrado latino 4x4 com 21 dias de duração e destes 14 dias de adaptação, alojadas em sistema *tie-stall*, alimentando com dieta na proporção 60:40 volumoso e concentrado, ajustada de acordo com NRC. As concentrações de iodo da solução do *pré* e *pós-dipping* experimentais foram: clorexidina (controle), 0,5%; 1% e 2%. As amostras de leite, urina e sangue foram coletadas de cada vaca a partir do 18º dia de experimento. Para análise de iodo no leite, urina e alimento, foi utilizado o método de extração ácida seguido de oxirredução entre Ce^{4+} e AS^{3+} . Análise por infravermelho dos componentes do leite e da CCS utilizou o método citometria de fluxo. A estatística dos dados foi analisada no programa SAS utilizando o modelo PROC MIXED e PROC CORR com 5% de significância. Houve efeito linear do uso de soluções iodadas na concentração de iodo no leite ($P < 0,05$) e para urina e hormônios séricos os resultados não foram significativos. No entanto, o uso de soluções com iodo no *pré* e *pós-dipping* influencia na concentração de iodo do leite de vacas lactantes. **Capítulo V:** Objetivou-se neste trabalho conhecer a concentração de iodo e os fatores que contribuem na concentração de iodo no leite cru, a qualidade do leite em relação aos componentes químicos, antioxidantes e ácidos graxos do leite de propriedades leiteiras de diferentes regiões do estado do Paraná. Foram visitadas 168 propriedades, aleatoriamente, sem aviso prévio, em três regiões do estado do Paraná: norte central, oeste e centro oriental. Amostras de leite para análise de iodo, composição química, CCS, antioxidante e ácido graxo foram coletadas junto com os dados de produção, sanidade e nutrição em um questionário previamente elaborado. A análise de iodo no leite, foi realizada pelo método de extração ácida seguido de oxirredução entre Ce^{4+} e AS^{3+} e a leitura em microleitor de placas - ELISA. Os componentes do leite foram analisados por infravermelho e a CCS por o método ultrassônico, os antioxidantes foram analisados por espectrofotometria

em espectrofotometro UV-VIS e os ácidos graxos por cromatografia gasosa. Os dados estatísticos foram analisados por análise multivariada com modelo fatorial exploratório (AFE) usando como critério de extração dos fatores componentes principais, mais análise não paramétrica dos dados quantitativos usando o teste de *Kruskal-Wallis* e análise de QUP² para avaliar a frequência das variáveis na concentração de iodo. Houve diferença ($P > 0,05$) entre as regiões oeste, centro oriental e norte central onde a maior concentração de iodo no leite foi observada nas propriedades da mesorregião oeste (615,45 µg/L) e a menor na região norte central (352,99 µg/L). A partir da análise fatorial e de *cluster* das concentrações de iodo mostrou quais das variáveis indicadoras do questionário contribuíram para a variação de iodo no leite. O fator limpeza de ordenha apresentou diferença ($P > 0,05$), em dois grupos de iodo, o de baixa 121 µg/L e de média 372 µg/L concentração, respectivamente, todavia, observou que a limpeza da máquina interfere na concentração de iodo do leite. As propriedades que faziam uso de pastagem com adubação orgânica apresentaram menor concentração de iodo no leite e apresentaram maior frequência de animais criados em pastagem 97,30%. Já 55,70% das propriedades que forneceram dieta total teve maior concentração de iodo no leite. No entanto, as concentrações de iodo são influenciadas por fatores que compõem o sistema de produção, regiões do estado, tipo de solo, dieta e manejo de higiene de ordenha, além desses fatores o leite com maior concentração de iodo apresentou importantes características nutracêuticas, como aumento na capacidade antioxidante, maior concentração de CLA e menor relação ômega 6 e 3. **Capítulo VI:** Foi estudado a presença de contaminação do leite por resíduo de antibióticos: ceftiofur, cloxacilina e enrofloxacina utilizando o método modificado QuEChERS na região norte do estado do Paraná. Foram coletadas amostras de leite em 116 propriedades com dados de produção em um questionário. O leite foi submetido a dois métodos de identificação de resíduos de antibiótico, primeiro usando *kits* comerciais e segundo laboratorial, realizando a extração pelo QuEChERS modificado e analisando em UPLC-MS/MS. Para comparação dos dados, utilizou-se o método de Qui-quadrado de aderência e independência. Do total das propriedades estudadas 10 (8,63%) apresentaram resultados de leite contaminados com resíduo de antibiótico. Houve diferença ($P < 0,05$) entre o tempo de descarte do leite e a presença de antibióticos, e as propriedades com resultado positivo faziam descarte com menos de 5 dias e dentro do período de carência. As variáveis de manejo sanitário e de higiene durante ordenha não houve diferença ($P > 0,05$). Contudo a contaminação do leite por antibióticos é proveniente do armazenamento do leite de animais em fase de tratamento com substâncias antimicrobianas dentro do período de carência, as amostras do leite positivos apresentaram concentrações dentro do limite máximo de resíduo, portanto, sendo próprio para o consumo, o método de extração QuEChERS modificado e a quantificação por UPLC-MS/MS foi eficiente na detecção de baixas concentrações de resíduos de antibióticos no leite cru de tanques a granel.

Palavras-chave: Ácidos graxos, antibióticos, antioxidantes, hormônios tireoidianos, indicadores, iodo, qualidade do leite

ABSTRACT

The aimed of this study was to identify in dairy properties factors that influence milk quality with the purpose of seeking a milk naturally enriched with nutraceutical compounds mainly as the omega 3, omega 6 and conjugated linoleic acid (CLA) fatty acids and the polyphenols as antioxidants. Consequently, to identify production systems with the best milk physicochemical components in addition to understanding the sources and factors of milk contamination with iodine and evaluating the hygienic-sanitary practices carried out in the daily process of milk production, in addition to contamination by antimicrobials. For this, three works were carried out. Chapter IV: In this experiment it was evaluated the influence of iodine different concentrations use in the pre and post-dipping solution in the ceiling cleaning process of Holstein cows on the iodine concentration in milk, urine and on the serum hormones thyroid levels. Four Holstein cows were used in the experiment, with approximately 120 days of lactation, with an average production of 18 kg of milk, weighing 566 ± 64 kg, in a latin-square 4x4 with 21 days of experimental period and 14 days of adaptation, housed in tie system -stall, feeding on a roughage and concentrated 60:40 diet, adjusted according to NRC. The pre- and post-dipping experimental solution concentrations were chlorhexidine (control), 0.5%; 1 and 2%. Milk, urine and blood samples were collected from each cow in the 18th day of the experiment. For iodine the analysis in milk, urine and food, the acid extraction method was used followed by redox between Ce^{4+} and AS^{3+} . Milk infrared analysis and CCS components by flow cytometry method were also carried out. The data statistics were analyzed in the SAS program, using the PROC MIXED and PROC CORR model with 5% significance. There was a linear effect of the iodine solutions use in the iodine concentration in milk ($P < 0.05$) and for urine and serum hormones the results were not significant. However, the iodine solutions use in pre- and post-dipping influences the iodine concentration of lactating cows' milk. Chapter V: The objective of this work was to know the iodine concentration and the factors that contribute to the iodine concentration in raw milk, the milk quality in relation to the chemical components, antioxidants and milk fatty acids from dairy properties in different regions of the Paraná state. 168 properties were visited randomly without prior notice, in three regions of the Paraná state: central north, west and eastern center. Milk samples for analysis of iodine, chemical composition, CCS, antioxidant and fatty acid were collected together with production, health and nutrition data in a previously prepared questionnaire. The iodine analysis in milk was carried out by the acid extraction method followed by oxidoreduction between Ce^{4+} and AS^{3+} and the reading in a microplate reader - ELISA. The milk components were analyzed by infrared and CCS by the ultrasonic method, antioxidants were analyzed by spectrophotometry in UV-VIS spectrophotometer and fatty acids by gas chromatography. The statistical data were analyzed by multivariate analysis with exploratory factorial model (AFE) using the main component factors as an extraction

criterion, plus non-parametric analysis of quantitative data using the Kruskal-Wallis test and QUI² analysis to assess the frequency of variables in iodine concentration. There was a difference ($P > 0.05$) between the western, eastern central and northern central regions where the highest iodine concentration in milk was observed in the western mesoregion properties (615.45 $\mu\text{g} / \text{L}$) and the lowest in the northern central region (352.99 $\mu\text{g} / \text{L}$). The factor and cluster analysis of iodine concentrations, showed which of the questionnaire's indicator variables contributed to the iodine variation in milk. The milking cleaning factor showed a difference ($P > 0.05$) in two iodine groups, the low 121 $\mu\text{g} / \text{L}$ and the average 372 $\mu\text{g} / \text{L}$ concentration, respectively, however, he observed that the machine cleaning interferes with iodine concentration in milk. The properties that used pasture with organic fertilization showed lower iodine concentration in milk and also showed a higher frequency of animals raised on pasture 97.30%. 55.70% of the properties that provided a total diet had a higher iodine concentration in milk. However, iodine concentrations are influenced by factors that make up the production system, regions of the state, soil type, diet and milking hygiene management. In addition to these factors, milk with a higher iodine concentration showed important nutraceutical characteristics, such as increased in antioxidant capacity, higher CLA concentration and lower omega 6 and omega 3 ratio. Chapter VI: The contamination presence in milk by antibiotics residues was studied: ceftiofur, cloxacillin and enrofloxacin using the modified QuEChERS method in the northern region of the Paraná state. Milk samples were collected from 116 farms with production data in a questionnaire. The milk was subjected to two methods of identifying antibiotic residues, first using commercial kits and second laboratory using extraction by the modified QuEChERS and analyzed in UPLC-MS / MS. To compare the data, the Chi-square method of adherence and independence was used. From the total of properties studied, 10 (8.63%) presented results of milk contaminated with antibiotic residue. There was a difference ($P < 0.05$) between the time of milk disposal and the presence of antibiotics, where the properties with a positive result were discarded within 5 days and within the grace period. The variables of sanitary management and hygiene during milking were not different ($P > 0.05$). However, the milk contamination by antibiotics comes from the milk storage from animals undergoing treatment with antimicrobial substances within the grace period, the samples of positive milk showed concentrations within the maximum residue limit, therefore being suitable for consumption, the modified QuEChERS extraction method and UPLC-MS / MS quantification was efficient in detecting low concentrations of antibiotic residues in raw milk from tanks.

Keywords: Milk quality, indicators, iodine, thyroid hormones, antioxidants, fatty acids, antibiotics

INTRODUÇÃO

A busca por uma alimentação saudável tem despertado o interesse do consumidor por alimentos que apresentam características benéficas para a saúde como compostos ativos que enriquece a nutrição humana (Khan et al., 2019a).

O leite e seus derivados são ingredientes importantes na alimentação humana, especialmente na alimentação de crianças e idosos (Green et al., 2015) contribuindo com a ingestão de micronutrientes e numerosos compostos bioativos, além de conter em sua composição: água, carboidratos, gorduras, proteínas, minerais e vitaminas.

O consumo de leite pela população em 2017 foi de 166 litros/habitante (Embrapa, 2019). Os números evidenciam o constante crescimento do consumo e um dos motivos desse crescimento é a diversificação dos produtos lácteos e o maior poder aquisitivo das pessoas que proporciona a capacidade de compra (Istvan and Marques, 2018). Com isso, é importante produzir leite de boa qualidade. Um dos meios para gerenciar a produção, transporte e processamento é a criação e o efetivo exercício de leis que regulamentam esses requisitos.

A Instrução Normativa nº 51 (IN 51) em 2002 determinou normas para a produção do leite cru refrigerado e exigências higiênico-sanitárias para obtenção de leite, com qualidade no país (Brasil, 2002).

A IN 51 passou por modificações, veio a IN 62 em 2011 e em 2018 entrou em vigor duas novas Instruções Normativas (IN 76 e 77) que estipulam critérios e parâmetros mínimos atualizados para um leite de boa qualidade (Brasil, 2018).

Segundo as normativas o leite deve ser oriundo de animais sadios e que não estejam em fase colostrual, com bons aspectos nutricionais, que sejam livres de doenças

contagiosas, isentos de qualquer resíduo de medicamentos e estimulantes, que tenham às características conservadas durante o transporte para adequação aos valores mínimos de tolerância quanto aos parâmetros físico-químicos e de qualidade (Brasil, 2018).

Simultaneamente a esses aspectos, há outros fatores que podem contribuir com a variação da composição química e conseqüentemente com a qualidade do leite, estes fatores estão ligados às condições de produção e manejo, dentre eles podem ser citados alguns de importante relevância, como a individualidade do animal, alimentação, clima, estágio de lactação, idade e aspectos fisiológicos como a gestação (Weiss, 2012; Rangel et al., 2013).

Desta forma, considerando os diversos fatores e a influência na composição química do leite, a IN-76 estabelece uma adequação nos valores mínimos para os componentes, sendo de 3,0 g/100 g para a gordura, 2,9 g/100 g proteína total; lactose anidra de 4,3 g/100 g; sólidos não gordurosos de 8,4 g/100 g e sólidos totais de 11,4 g/100 g, a fim de padronizar a matéria-prima (Brasil, 2018).

A padronização é garantir um leite e derivados de qualidade e nesse sentido, outros compostos têm sido estudados com o intuito de que elementos nutracêuticos estejam presentes na composição do leite (Matt et al., 2011).

Um destes elementos é a gordura, pois a gordura oferece uma variedade de ácidos graxos (AG) que apresentam benefícios para a saúde de quem consome. Esses ácidos graxos podem ser classificados em ácido graxo saturado (AGS), ácido graxo insaturado (AGI), ácido graxo monoinsaturado (AGMI) e ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) (Visentainer et al., 2012).

Dentre os AGPI, o ácido linoleico conjugado (*conjugated linoleic acid* – CLA) é encontrado naturalmente no leite e derivados, como resultado do metabolismo dos ruminantes e estes compostos apresentam propriedades funcionais como a atividade anticarcinogênica, atividade antiestrogênica, a redução lipídica corporal, além dos efeitos benéficos relacionados a doenças cardiovasculares, anti-inflamatória, no sistema imune e até mesmo na doença de Alzheimer (Lucatto et al., 2014; Meneses et al., 2015).

Assim, estratégias alimentares dos animais e de manejo tem sido utilizada para que o leite contenha e até mesmo aumente o CLA em sua composição, pela importância na saúde humana.

Outros compostos que têm despertado a atenção são os antioxidantes. O potencial antioxidante tem sido amplamente estudado em leite e derivados, pois além da capacidade

antioxidante endógena há também os antioxidante exógenos, que derivam da dieta como as vitaminas lipossolúveis (vitamina A e vitamina E), vitaminas hidrossolúveis (vitamina C), carotenoides e composto secundários (Polifenóis) (Wojcik et al., 2010).

Em relação à presença de micronutrientes, o leite é considerado importante fonte de minerais, especialmente de iodo. Em alguns países o leite é considerado uma das fontes mais importante de iodo nutricional (Schöne and Rajendram, 2009). O iodo é um oligoelemento essencial para animais e humanos pelo seu papel fundamental na atividade celular, desenvolvimento do cérebro e do funcionamento da glândula tireoide, visto que a deficiência ou excesso de iodo na alimentação pode interferir na produção de hormônio tireoidianos, levando a redução ou aumento dos hormônios T3 (triiodotironina) e T4 (tiroxina) que são fundamentais para o bom funcionamento do metabolismo (Ouattara, 2013).

Este elemento deve ser monitorado para o pleno conhecimento de sua concentração no leite, visto que as dietas normalmente consumidas por seres humanos são capazes de suprir aproximadamente 1.000 µg/dia de iodo, que teoricamente, não seria prejudicial no caso de adultos que possuem maior tolerância à ingestão diária de iodo (1.100 µg/dia) (Castro et al., 2010). Todavia, isso passa a ter maior relevância quando se trata da nutrição infantil cujos limites de ingestão de iodo são bem menores sendo (200 µg/dia para crianças de até um ano de idade e 300 µg/dia para crianças de oito anos de idade) (Efsa, 2014).

Por fim, quando se fala em limites de tolerância de compostos no leite, não se pode deixar de citar os resíduos indesejáveis de antimicrobianos no leite por falta de adoção de descarte no período certo de carência (Schlemper & Sachet, 2017). O uso indiscriminado de antimicrobianos no tratamento de enfermidades como a mastite, por exemplo, tem sido preocupante, pois implica em risco à saúde que podem ser manifestados causando reações de hipersensibilidade e resistência bacterianas à β-lactâmicos, estreptomicinas, cefalosprinas dentre outros compostos (Santiago-Neto et al., 2014).

Diante do exposto o objetivo de realizar este trabalho foi diagnosticar fatores que influenciam a qualidade do leite com o propósito de buscar um leite enriquecido naturalmente com compostos nutracêuticos, como os ácidos graxos da família dos ômega 3, ômega 6, o ácido linoleico conjugado (CLA) e antioxidantes, além de compreender as fontes e fatores de contaminação do leite com iodo e por antimicrobianos, utilizado no manejo sanitário das vacas leiteiras.

II. REVISÃO DE LITERATURA

1 Composição Química

O leite é produzido nas glândulas mamárias de fêmeas mamíferas e é um alimento rico em carboidratos, proteínas, gorduras, minerais e vitaminas que são ajustados efetivamente para atender as necessidades específicas de desenvolvimento do recém-nascido em crescimento (Rezaei et al., 2016).

O leite é um fluido composto por uma parte líquida e a outra por partículas em suspensão constituindo uma emulsão natural, estável em condições normais de temperatura e/ou de refrigeração (Sgarbieri, 2004).

A composição do leite varia entre regiões, espécie, necessidade do recém-nascido e até mesmo entre raças da mesma espécie (Tabela 1) (Kailasapathy, 2016).

Tabela 1: Percentual da composição química do leite de diferentes espécies.

Espécie	Água	Gordura	Proteína	Lactose	Minerais
Asinino	90,0	1,3	1,7	6,5	0,5
Bubalino	84,2	6,6	3,2	5,2	0,8
Bovino	86,6	4,6	3,4	4,9	0,5
Caprino	86,5	4,5	3,5	4,7	0,8
Camelus	86,5	3,1	4,0	5,6	0,6
Equino	89,1	1,6	2,7	6,1	0,5
Humano	87,7	3,6	1,8	6,8	0,1
Ovino	79,4	8,6	6,7	4,3	1,0

Fonte: Kailasapathy (2016).

1.1 Água

A água é o nutriente mais essencial exigido pelos animais, pois funciona na digestão e metabolismo dos nutrientes, na eliminação de resíduos do corpo via urina, fezes e respiração, também no transporte de nutrientes e outros compostos para dentro e fora das células; equilíbrio eletrolítico no corpo e confere um ambiente fluido para o feto em desenvolvimento (Beede, 2006).

Uma vaca leiteira em lactação tem mais exigência de água do que outros animais, contudo isso ocorre porque 56 a 81% do seu peso corporal é água e ela precisa compensar

a perda de água pela produção de leite, já que a água do leite representa a cerca de 87% da composição total (Murphy, 1992).

A água é importante por suas propriedades solventes e bom veículo de componentes endógenos ou exógenos do leite (Grădinaru et al., 2015). A água é o meio no qual todos os outros componentes do leite (sólidos totais) são dissolvidos ou suspensos, já que pequenas quantidades de água no leite são ligadas quimicamente à lactose, sais e algumas proteínas (Kailasapathy, 2016).

Murphy (1992) relata que a água está distribuída em compartimentos nos tecidos corporais. Fisiologicamente, a maior parte da água fica no meio extracelular, deste modo podendo ser dividida em intersticial, plasmática e transcelular. A água intersticial desempenha o papel de preencher os espaços celulares circundantes e tecido conjuntivo e a transcelular preenche o trato gastrointestinal podendo chegar a 15 e 35% do peso corporal em ruminantes, isso, considerando que estas proporções podem variar de acordo com as práticas alimentares e condições ambientais.

1.2 Gordura

A gordura do leite é o constituinte que mais sofre variação ambiental e nutricional, variando de 3,5 a 5% de lipídeos totais. A molécula de gordura se constitui em um glóbulo emulsionado com diâmetro de 2 a 4 μm e é revestido com uma membrana derivada da célula secretora, sendo que, aproximadamente 98% ou mais dos lipídios é triacilglicerol, cerca de 0,5 a 1% são os fosfolipídios e os esteróis são de 0,5 a 0,5% dos lipídios totais (Jensen et al., 1991).

As gorduras são produzidas a partir de moléculas individuais de ácido graxo (AG) ligadas ao glicerol, uma molécula de três carbonos, conhecida como triglicerídeo, ou triacilglicerol, que contém três AG ligados à cadeia de carbonos do glicerol (NRC, 2001).

A síntese dos AG ocorre na glândula mamária e seu principal precursor são o acetato e o β -hidroxibutirato. A cerca de 10% dos AG circulantes são provenientes da mobilização dos lipídios corpóreos, enquanto o restante é de origem dietética (Eifert et al., 2006). O acetato é a maior fonte de energia e substrato na síntese de gordura do leite de vacas. Os autores evidenciaram aumento linear no rendimento de gordura do leite e transferência líquida superior a 30% de acetato para a gordura do leite em um trabalho com infusão ruminal de acetato neutralizado (Urrutia et al., 2019).

Existem alguns fatores que estão associados e podem modificar os AG da dieta em relação aos absorvidos pelo intestino, sendo o primeiro: a bio-hidrogenação ruminal, em que os microrganismos agem sobre os AG insaturados transformando-os em saturados; segundo: através da microbiota ruminal que sintetiza AG semelhante à *síntese de novo* e ou estearoil CoA desaturase (SCD) (Chilliard et al., 2000).

Há décadas os componentes do leite bovino têm sido estudados, pois o leite é um fluído quimicamente complexo, nutritivo e constituído por centenas de componentes diferentes, que ainda não teve todas as suas estruturas catalogadas.

Foroutan et al. (2019) usou a técnica de metabolômica quantitativa e obtiveram caracterização mais abrangente e atualizada dos compostos químicos do leite de vaca, e identificaram e/ou quantificaram cerca de 972 metabólitos ou espécies de metabólitos, correspondentes a 2355 estruturas metabólicas únicas no leite bovino, sendo triglicerídeos a grande maioria dos compostos identificados 1053, neste estudo compostos ou espécies compostas estão sendo relatadas pela primeira vez, assim, pode-se concluir que há mais no que avançar nos próximos anos quando se trata de componentes do leite bovino.

1.2.1 Ácidos Graxos

As gorduras e óleos são ésteres formados a partir de AG e glicerol, estes ésteres são denominados de glicerídeos, diglicerídeos ou triglicerídeos e podem ser formados por ácidos graxos iguais ou diferentes entre si (Figura 1) (Vázquez et al., 2015).

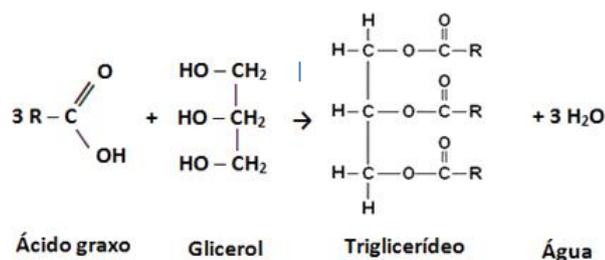


Figura 1: Formação e Estrutura do triglicerídeo. Fonte: Adaptado de Jun et al. (2016).

Os triacilgliceróis são as formas de lipídios mais abundante e estão presentes em óleos e gorduras sendo importante forma de armazenamento de energia (Visentainer et al., 2012).

As unidades fundamentais mais comuns dos lipídios são os AG, que no tecido dos animais a maioria apresenta entre 14 a 24 átomos de carbono e pode variar de 2 a 36

átomos ou mais, podendo também ser saturados ou insaturados com 1 a 6 duplas ligações. (Delatorre et al., 2011; Visentainer et al., 2012).

Os AG da gordura do leite são classificados em cadeia curta (4 a 8 carbonos), média (10 a 14 carbonos) e longa (> 16 carbonos), podendo ser saturado, insaturado, monoinsaturado e poli-insaturado com configuração *cis-trans* (Souza et al., 2003). Os ácidos graxos poli-insaturados *cis* e *trans* são isômeros derivados de ácido linoleico (18:2n-6) (Glasser et al., 2008).

No leite os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e média (AGCM) surgem quase que exclusivamente da *síntese de novo*, no entanto, os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) derivam da absorção intestinal e outros lipídios da circulação sanguínea, também podendo ser de ambas as fontes (Neville and Picciano, 1997; McManaman, 2012). Ao contrário dos AGCC e AGCM, os AGCL devem ser ingeridos por meio de ingredientes da ração para que essas porções estejam presentes no leite (Chilliard et al., 2007).

A quantidade de AGMI é semelhante na gordura do leite de ovelha, vaca e cabra e pode variar a cerca de 20% a 35%, neste grupo o ácido oleico (C18:1) é o mais abundante e típico do leite da maioria dos ruminantes (Butler et al., 2011).

Os AGS no leite de ruminantes representam 60% a 70% dos AG (Józwik et al., 2010). Na maioria dos mamíferos o principal AGS da gordura do leite são os de cadeia média, como o láurico (C12:0), mirístico (C14:0) e o palmítico (C16:0) (Markiewicz-Keszycka et al., 2013).

Estes AG (láurico, mirístico e o palmítico) tendem a aumentar os níveis de colesterol sanguíneos, por isso, pesquisas recentes têm utilizado suplementação lipídica com AGPI para diminuir a concentração dos AGS no leite, pois as glândulas mamárias expressam alta atividade de Δ^9 -desaturase que converte ácido esteárico em ácido oleico (cis-9 C18:1) (Chilliard et al., 2007).

A suplementação com lipídios tem sido utilizada com o objetivo de aumentar a densidade energética da dieta e melhorar o perfil de AG do leite aumentando a concentrações dos AGPI em especial o linoleico (C18:2n-6), e α -linolênico (C18:3n-3) (Glasser et al. 2008), pois esses AG, apresentam propriedades que diminuem o risco de doenças cardiovasculares e apresentam características anticarcinogênicas e melhoram a resposta do sistema imune, atuam na prevenção da arterosclerose, redução de acúmulo de gordura no corpo, melhora da capacidade de crescimento, apresentam efeitos

antidiabéticos e a mineralização óssea (Tanaka, 2005; Nakamura et al., 2008; Harvatine & Bauman, 2011; Kozloski, 2016; Yang et al., 2016).

O grande interesse em manipular os AG na composição da gordura do leite é pelo leite ser importante fontes de gordura na dieta dos seres humanos (Khanal & Dhiman 2004).

Dietas ricas em carboidratos fermentáveis e AGPI podem resultar em depressão da gordura do leite através de uma mudança para a chamada via alternativa de bio-hidrogenação ruminal, levando à formação de isômeros de AG, que diminuem a expressão de genes relacionados com a *síntese de novo* (Harvatine and Bauman, 2011).

Há duas origens na formação do CLA na gordura do leite (Chilliard et al., 2000; Woolpert et al., 2016). Uma fonte é o CLA formado durante o processo de isomeração, fase anterior a biohidrogenação do ácido linoleico e a segunda fonte é o CLA sintetizado pelo tecido adiposo e pela glândula mamária, através da *síntese de novo* e ou esteroil CoA desaturase (SCD), que converte o ácido vacênico (*trans*-11 C_{18:1}), intermediário na bio-hidrogenação de ácidos graxos insaturados, (Figura 2) Tanaka (2005) em CLA *cis*-9 *trans*-11 C_{18:2}.

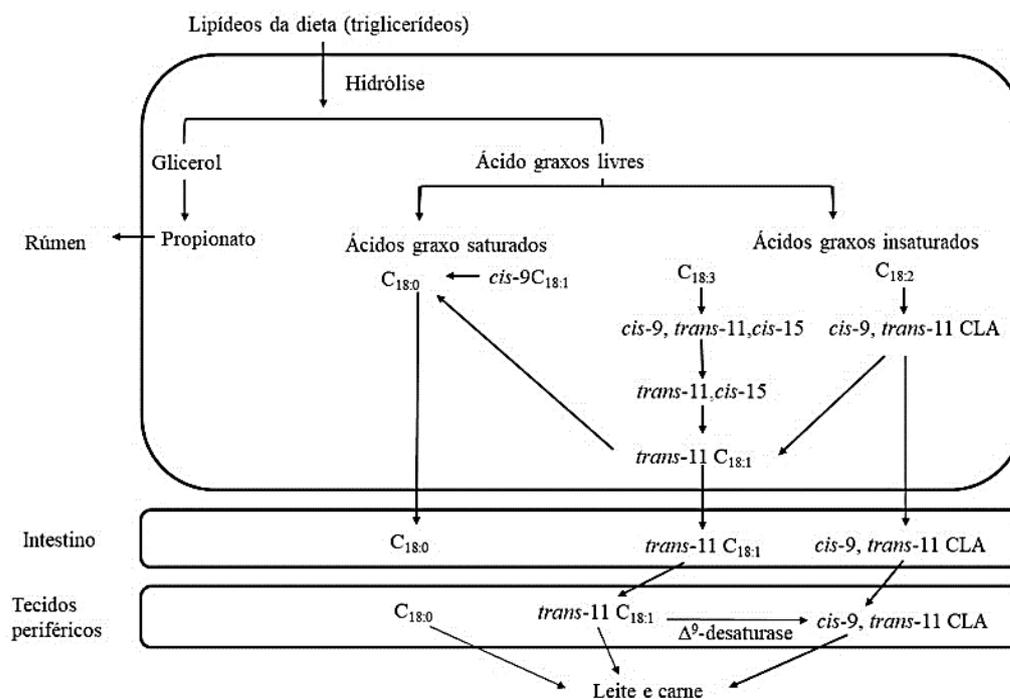


Figura 2: Metabolismo ruminal dos lipídeos e origem do CLA depositado no leite e carne de ruminantes. Adaptado de Tanaka (2005).

No entanto, a composição lipídica da dieta das forragens consiste, principalmente, de glicolipídios e fosfolipídios, e a composição lipídica dos óleos de sementes dos alimentos concentrados é predominantemente triglicerídeos. Assim, quando consumidos, os lipídios sofrem duas transformações, inicialmente as lipases microbianas promovem hidrólise das ligações ésteres e posteriormente, agindo como precursor da bio-hidrogenação dos AGPI (Palmquist et al., 2005).

1.3 Proteínas

As proteínas do leite bovino compreendem, aproximadamente 3,5% do leite e desempenha o papel de fornecer aminoácidos essenciais que são imprescindíveis aos mamíferos para o seu desenvolvimento, além de seu papel na indústria de lácteos, pois possuem propriedades de grande importância e benefícios nutricionais com particularidades estruturais e físico-química únicas (Ye, 2011). Leite e produtos lácteos representam fonte importante de proteínas com níveis nutritivos superiores pelo seu conteúdo em todos os aminoácidos essenciais (Grădinaru et al., 2015).

As proteínas são distribuídas basicamente em duas grandes classes, sendo 80% de caseína e 20% de proteínas do soro (Tabela 2), percentual que pode variar em função da raça dos animais e da dieta fornecida (Haraguchi et al., 2006).

As caseínas são secretadas pelo aparelho de Golgi em micelas, associadas ao cálcio e fósforo (Grădinaru et al., 2015). É o componente orgânico mais abundante no leite, juntamente com a lactose e a gordura e existem vários tipos de caseína catalogados (α , β , γ e κ) sendo todas semelhantes quanto a sua estrutura, formando micelas através de um agregado de grânulos insolúveis podendo conter água e minerais como o cálcio e fósforo (González et al., 2001).

A estrutura da caseína micelar é importante por sua atividade biológica na glândula mamária, por conferir estabilidade no leite e durante o processamento do leite em outros produtos, bem como para a boa digestibilidade dos nutrientes que compõem as micelas, para o recém-nascido as proteínas do leite são carreadores naturais, que fornecem micronutrientes essenciais como o cálcio (Ca) e o fósforo (P), aminoácidos e também componentes do sistema imune (imunoglobulinas e lactoferrina) (Semo et al., 2007).

As micelas de caseína no leite são partículas coloidais proteicas essenciais e de valor econômico e nutricional importante para a produção de produtos floculados e gelificados, já que os principais produtos lácteos como iogurte, queijo e sorvete, derivam suas propriedades texturais, sensoriais e nutricionais da caseína, além de ser muito

estáveis ao processamento e manter sua identidade estrutural básica durante a maioria desses processos (Tuinier et al., 2002; De Kruif et al., 2012).

Tabela 2: Principais proteínas constituintes do leite bovino.

Proteínas	Quantidade no leite (g/L)	
Caseínas	24	28
α_{s1}	12	15
α_{s2}	3	4
β	9	11
K	3	4
Proteínas do Soro	5	7
β -lactoglobulina	2	4
α -lactalbumina	1	1,5
Albumina sérica	0,1	0,4
Imunoglobulinas	0,6	1,0
Lactoferrina		~0,1
Proteínas das membranas dos glóbulos de gordura		~0,4
Total de proteínas do leite	30	35

Fonte: Adaptada de Semo et al. (2007).

As proteínas do soro do leite são constituídas de β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, albumina do soro bovino, imunoglobulinas e glico-macropéptídeos e apresentam estrutura globular com pontes dissulfeto que conferem estabilidade estrutural (Haraguchi et al., 2006).

As duas principais proteínas do soro são α -lactalbumina e β -lactoglobulina, sendo que a β -lactoglobulina é o peptídeo de maior concentração no soro (45% a 57%), representando, no leite bovino, a cerca de 3,2 g/L, tem peso molecular médio de 18,4 a 36,8 kDa, e lhe confere resistência à ação de ácidos e enzimas proteolíticas do estômago, deste modo sendo absorvida no intestino delgado (Brasil et al., 2015).

Kelleher et al. (2003) corroboraram que quantitativamente a α -lactalbumina é o segundo peptídeo do soro do leite com, aproximadamente, 15%-25%. A α -lactalbumina participa da síntese de lactose e tem a capacidade de se ligar a alguns minerais, como zinco e cálcio, além destes mecanismos esta molécula possui capacidade antimicrobiana,

atuando contra microrganismos patógenos, dentre eles, as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* (Haraguchi, 2006).

O colostro bovino apresenta quantidade predominante de proteínas do soro como as imonoglobulinas (IgG), importante logo após o nascimento do neonato, já que a elevada concentração de IgG no colostro transfere imunidade passiva ao recém-nascido, melhorando o sistema imunológico e protegendo a cria de bactérias e vírus que possam desencadear alguma doença, enquanto as demais proteínas do soro, coletivamente, promovem o desenvolvimento e a maturação dos tecidos epiteliais do sistema gastrointestinal, ainda não completamente desenvolvido funcionalmente (Sgarbieri, 2004).

1.4 Lactose

Os carboidratos do leite são constituídos por lactose e outros açúcares como a glicose e galactose. Eles são os segundos mais abundantes compostos da composição do leite, considerando a água o primeiro (Grădinaru et al., 2015). De todos os componentes do leite analisados por Foroutan et al. (2019), os carboidratos estão em maior concentração, a lactose é o composto mais abundante (114–122 mM), seguido pelos outros açúcares galactose (0,3 mM), e glicose (0,2–0,3 mM).

A síntese da lactose acontece nas células epiteliais que envolvem os alvéolos na glândula mamária (Grădinaru et al. 2015), seu principal precursor é a glicose, 79% da glicose que é proveniente do sangue vai para a síntese, além dos outros precursores como propionato, glicerol, pentoses-fosfato e lactato (González et al., 2001).

A lactose tem como principal função a osmorregulação, sendo responsável por aproximadamente 50% da pressão osmótica do leite, e ocorre a fixação de 90 litros de água sempre que 50 gramas de lactose são sintetizadas pela glândula mamária, o restante se deve ao citrato, íons e proteínas (Menéndez González et al., 2010; Lin et al., 2016). Esta função influencia a produção e o volume de leite diretamente (Niemann et al., 2011).

Dentre as proteínas é importante destacar a participação da α -lactoalbumina no complexo enzimático responsável pela síntese de lactose na glândula mamária (Sgarbieri, 2004). A α -lactoalbumina é uma proteína do soro do leite que apresenta similaridade com a lisozima, esta proteína altera a afinidade da galactosiltransferase (subunidade enzimática ativa da lactose sintetase) para com a glicose, assim, a lactose é produzida com mais eficiência (Grădinaru et al., 2015).

Outro fator que influencia a síntese de lactose é a sanidade, a associação de agentes patogênicos com outros fatores externos pode contribuir com a redução da produção de leiteira e comprometer o tecido secretor, esse somatório de fatores contribui com a redução na síntese da lactose (Cabral et al., 2013).

1.5 Contagem de células somáticas (CCS)

As células somáticas são células de descamação do epitélio dos alvéolos e ductos mamário, por isso, a presença dessas células no leite é um fenômeno fisiológico normal e necessário para a regeneração do tecido mamário (Alhussien and Dang, 2018).

Entretanto, durante processos patológicos a CCS aumenta, pois células de defesa do organismo que migram do sangue para a glândula mamária, no intuito de combater microrganismos causadores de doenças (Alhussien and Dang, 2018). Essas células brancas podem ser leucócitos, neutrófilos, macrófagos ou linfócitos (Quintão et al., 2017).

A CCS do leite sofre influência da produção de leite, raça, clima, saúde, ordem de parto e estágio de lactação sendo que qualquer mudança nas práticas de produção, condições climáticas e até mesmo situações estressantes pode contribuir para o aumento das células somáticas (Alhussien and Dang, 2018).

Deste modo, na inflamação intramamária, acompanhada de alterações imunológicas e patológicas no tecido da glândula, ocorre em diferentes graus de intensidade e resulta em ampla gama de consequências em relação às alterações físicas, químicas e frequentemente microbiológicas do leite secretado (Ezzat et al., 2014).

A presença aumentada de células de defesa no leite é um indicativo de inflamação intramamária, e a contagem de células somáticas a partir de 200 mil CS/mL é considerada inflamação do tecido mamário (Medeiros et al., 2011). A mastite na grande maioria dos casos é a principal causa do aumento das células somáticas no leite (Quintão et al., 2017).

Existem diversos tipos de microrganismos que podem ser a causa da inflamação intramamária, até o momento são conhecidas mais de 200 causas infecciosas de mastite bovina e os principais patógenos em bovinos são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus* e *Coliformes* (Mesquita et al., 2019).

Existem dois tipos de mastite: a clínica e a subclínica. Sendo que na mastite clínica os sintomas podem ser visto a olho nu como alterações no comportamento alimentar, intumescimento, vermelhidão do úbere e dos tetos, além da presença de grumos, mudança na coloração, presença de pus ou sangue no leite, o aumento da CCS, o conteúdo

bacteriano, o aumento de sal e a plasmina (enzima resistente a pasteurização que destrói a caseína, além de diminuir o teor de lactose, gordura consequentemente a redução da qualidade do leite) (Izquierdo et al., 2017).

A mastite subclínica é caracterizada por sintomas que não são perceptíveis no leite e no úbere, mas diminui o volume da produção e aumenta a contagem de células somáticas (Abebe et al., 2016). Esta forma da doença é considerada o tipo de mastite mais importante economicamente por sua maior prevalência e efeitos de dano em longo prazo, quando comparada com a mastite clínica (Mungube et al., 2005). As perdas da produção por mastite subclínica podem chegar a 90%, desta forma, técnicas de rastreamento devem ser incorporadas nos manejo de ordenha para diminuir e controlar o impacto da doença (Birhanu et al., 2017).

Segundo Alhussien and Dang, (2018) existem meios de reverter os danos causados por estes fatores, boa nutrição junto com boa higiene podem diminuir a CCS, além de aumentar a vida útil dos produtos e derivados do leite.

A detecção da doença em estágio subclínico é mais eficaz para prevenir a ocorrência da doença do que a detecção em estágio clínico (Ruegg, 2017). Deste modo, a CCS é uma medida utilizada para determinar a prevalência de mastite subclínica em rebanhos leiteiros fornecendo o estado de saúde da glândula mamária. Uma vez que a prevalência da doença nos rebanhos leiteiros significa baixa produção e baixa qualidade do leite (Sumon et al., 2018).

Em diversos países, inclusive no Brasil, a CCS tem sido utilizada como ferramenta para monitorar a qualidade do leite e a prevalência de mastite em rebanhos leiteiros e é usada como indicador geral de condições higiênico-sanitárias (Alhussien and Dang, 2018). Assim, no Brasil, o Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), criou uma Instrução Normativa (IN 76 de novembro de 2018) que estipula a Contagem de Células Somáticas no leite cru refrigerado, como meio de padronizar a qualidade do produto, permitindo o resultado da média geométrica do trimestral de no máximo 400 mil CS/mL (quinhentas mil células por mililitro) (Brasil, 2018).

2.0 Antioxidantes

Antioxidantes são substâncias químicas que podem neutralizar os radicais livres (ROS) que são produzidos continuamente no corpo. Os antioxidantes podem ser classificados em endógenos e exógenos e tem como principal função, impedir a formação

descontrolada de ROS e espécies reativas de O_2 , ou mesmo inibir a reação com as estruturas biológicas (Khan et al., 2019b).

Dentre os antioxidantes, os naturais são: superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase e pequenas moléculas antioxidantes não enzimáticas, como glutathione e vitaminas C e E (Yazdanparast & Ardestani, 2007). No leite, a quantidade de antioxidante pode ser indicativa de qualidade, pois as estruturas celulares retardam a lipoperoxidação (Castillo et al., 2013).

A oxidação excessiva resulta em estresse oxidativo e pode danificar as proteínas, DNA e lipídios que, conseqüentemente, provêm de desequilíbrio entre os sistemas de defesa antioxidante e a formação ROS (Yazdanparast & Ardestani, 2007; Nita and Grzybowski, 2016).

Os ROS compreendem em superóxido de radicais livres (O_2^-), radical hidroxila (OH^\bullet) e oxigênio singlete (1O_2), podendo também ser espécies de radicais não livres, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Phaniendra et al., 2015). Quando a ação dos radicais livres é muito intensa ocorre alto grau de estresse oxidativo e se por um período prolongado, ocorre danos às células e mudanças permanentes nas estruturas das moléculas biológicas ativas e nos tecidos (Grażyna et al., 2017). Estas mudanças cessam as funções biológicas das moléculas como proteínas, lipídios, DNA e ocasiona perturbações no metabolismo celular (Dröge, 2002; Valko et al., 2007).

A homeostase pró-oxidante e antioxidante do corpo humano tem forte aliado no sistema de defesa, os antioxidantes do leite tem papel fundamental neste equilíbrio e podem ser classificados como lipofílicos e hidrofílicos, os quais são representados pelo CLA, α -tocoferol, β -caroteno, vitaminas A e D3, coenzima Q_{10} , fosfolipídios e os antioxidantes hidrofílicos: proteínas, peptídeos, vitaminas, minerais e oligoelementos respectivamente, (Grażyna et al., 2017).

2.1. Carotenoides

Os carotenoides estão entre os grupos de pigmentos naturais e comuns, uma vez que existem mais de 600 compostos diferentes caracterizados (Olson & Krinsky, 1995). Dentre eles, destaca-se o β -caroteno (Stahl & Sies, 2003). Segundo Kiokias & Gordon, (2004) o β -caroteno é o principal carotenoide da dieta, seguido por luteína, α -caroteno criptoxantina e licopeno.

Os carotenoides estão presentes em todos os organismos capazes de realizar fotossíntese, embora estes não sejam sintetizados pelo corpo humano e pelos animais, eles podem ser obtidos por meio da dieta (Stahl & Sies, 2003).

Nos animais os carotenoides estão presentes nos tecidos e sangue desempenhando a função de foto-proteção e também de precursor da vitamina A (Fiedor & Burda, 2014).

Na alimentação de ruminantes, a pastagem é a principal fonte de carotenoides, a presença destas substâncias pode modificar a cor do leite e gorduras dos produtos lácteos (Nozière et al., 2006).

O carotenoide mais importante na alimentação de ruminantes é a pró-vitamina A que não é sintetizada pelas plantas, e sim pelos precursores que são os próprios carotenoides (Darwish et al., 2016).

A principal característica dos carotenoides é a capacidade química e física de inibir a atividade dos ROS e conseqüentemente o estresse oxidativo que resulta em processos patogênicos, como doenças cardiovasculares, vários tipos de câncer ou doenças neurológicas, bem como distúrbios fotossensíveis ou relacionados aos olhos (Fiedor & Burda, 2014).

Os carotenoides são moléculas lipofílicas com tendência a se acumular na membrana celular (Khan et al., 2019b). Essa característica é pelo polieno, elemento principal do esqueleto dos carotenoides, que compreende uma série de duplas ligações conjugadas (C = C), sendo também o responsável pelas suas propriedades pigmentadas (Young and Lowe, 2018).

O leite é um alimento propício a sofrer lipoperoxidação, principalmente quando as vacas são alimentadas com gorduras poli-insaturadas, pois as duplas ligações são mais suscetíveis à perdas de elétrons, desencadeando a lipoperoxidação (Ryan et al., 2006). Diante disto, o uso de fontes de alimentos ricos em antioxidantes, ajuda no equilíbrio entre a formação de ROS e a capacidade antioxidante endógena do animal, e os antioxidantes são transferidos ao leite e retardam a lipoperoxidação (Rafałowski et al., 2014).

2.1.2 Polifenóis

Com o intuito de melhorar as propriedades nutricionais e terapêuticas do leite e derivados, plantas medicinais ricas em antioxidantes e compostos fenólicos naturais têm sido empregadas na produção de laticínios (El-Sayed & Youssef, 2019). Os compostos

fenólicos são fitoquímicos naturais da dieta e podem ser transferidos para o leite via ingestão de forrageiras incluídas na alimentação das vacas (Tsen et al., 2014).

Podem ser encontrados no leite quantidades consideráveis de compostos fenólicos, como fenol, cresol, timol e carvacrol, estes podem desempenhar papel significativo nas propriedades microbiológicas e organolépticas do leite, além de ser ingrediente funcional e nutritivo para a saúde humana (Ertan et al., 2017).

De acordo com Cutrim & Cortez, (2018) os polifenóis podem ser classificados pelo número dos anéis fenólicos presentes em sua estrutura e pelos componentes estruturais que unem esses anéis, diferenciando as moléculas em ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e lignanas, contudo, o grupo comum destes compostos são os flavonoides. Os compostos fenólicos apresentam benefícios à saúde que incluem efeitos antitumorais, o anti-inflamatório além de reduzir o desenvolvimento de espécies reativas de oxigênio (ERO) em células (Yahfoufi et al., 2018).

Antioxidantes encontrados no leite ou adicionados ao leite podem reduzir a oxidação dos compostos lipídicos, que ocorrem em consequência pela exposição à luz, ao calor, contaminação por íons metálicos ou atividade de enzimas pró-oxidativas, dessa maneira, incorporar produtos naturais com propriedades benéficas, como a atividade antioxidante na dieta de ruminantes, pode contribuir positivamente para a saúde do animal, do leite e beneficiar aqueles que consomem o produto (Cottica et al., 2019).

3. Iodo

O iodo é um dos elementos minerais mais antigos com relação ao reconhecimento de sua importância na saúde humana e de animais. Sua classificação baseada no critério quantitativo é de microelemento e baseado na função biológica e de elemento essencial (Wada, 2004) e pode ser volatilizado pela ação da luz solar e do calor (Andrade, 2001). O iodo é relativamente raro, sendo a sua ocorrência espalhada no ar ($0,7 \mu\text{g}/\text{m}^3$), solo ($300 \mu\text{g}/\text{kg}$), água ($5 \mu\text{g}/\text{litro}$), água do mar ($50 \mu\text{g}/\text{litro}$), corpo animal ($0,4 \text{mg}/\text{kg}$) sendo encontrado em todos os tecidos e fluídos do corpo, provavelmente em todas as células, mas, a maior concentração está na glândula tireoide (Risher et al., 2001).

A concentração de iodo nas plantas depende da espécie, tipo de solo, aplicação de fertilizantes no solo e das condições climáticas. Solos que apresentam alto teor de iodo, como os solos aluviais e argilosos, geralmente produzem plantas ricas em iodo. Solos

derivados de granito apresentam baixos teores de iodo e o solo perto do oceano tende a fornecer iodo adequado as plantas (NRC, 2001).

Algumas plantas *Cruciferas brassicaceae* apresentam substâncias goitrogênicas, como os glicosídeos cianogênicos e esses compostos interferem na síntese e/ou secreção de hormônios tireoidianos e podem ser encontrados em alguns alimentos com soja crua, milho, trevo branco e milheto e uma vez ingeridas são metabolizadas em tiocianato a isotiocianato e esses compostos alteram o transporte de iodeto através das membranas de células foliculares da tireoide reduzindo a retenção de iodeto, este efeito antinutricional pode ser reduzido com o suplemento do iodo na dieta até certo ponto (Laurberg et al., 2002).

O método de iodação de sais para prevenção do bócio, que é um aumento da glândula tireoide normalmente causado por deficiência de iodo foi sugerido inicialmente em 1831 e sua adoção profilática em 1924 reduziu a ocorrência de bócio de 38,6% para 9%, após 5 anos de consumo de sal iodado (González et al., 2001). Desde então, alguns países adotaram como medida profilática o uso obrigatório de sal iodado.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) revisou os teores de iodo adicionados ao sal destinado ao consumo humano e estabeleceu que a partir de abril de 2013, o sal comercializado no Brasil deve conter entre 15 e 45 mg/kg de iodo e não mais entre 20 e 60 mg/kg de iodo (Anvisa, 2013).

Os órgãos de saúde recomendam a ingestão de iodo diária de acordo com a faixa etária (Tabela 3).

Tabela 3: Recomendação de ingestão de iodo por dia de acordo com a faixa etária.

Idade	IOM µg/dia	OMS µg/dia
0 – 12 meses	110 - 130	-
1 – 8 anos	90	90
9 -13 anos	120	120
Acima de 14 anos	150	150
Grávidas	220	250
Lactantes	290	250

Fonte: Who/Unicef, (2007); Efsa, (2014); Lima and Navarro,(2018).

De forma geral, as dietas normalmente consumidas por seres humanos são capazes de suprir aproximadamente 1.000 µg/dia de iodo, e teoricamente não seria prejudicial

para os adultos que possuem maior tolerância à ingestão diária de iodo (1.100 µg/dia) (Castro et al., 2010). Todavia, isto passa a ter maior relevância quando se trata da nutrição infantil cujos limites de ingestão de iodios são bem menores (200 µg/dia para crianças de até um ano de idade e 300 µg/dia para crianças de oito anos de idade) (Who/Unicef, 2007).

Em relação à presença de micronutrientes, o leite é considerado importante fonte de iodo (Dahl et al., 2003; Schöne & Rajendram, 2009). O iodo contido no leite bovino tem como principal origem a dieta do animal. Estima-se que entre 70 e 90% do iodo ingerido pelas vacas é absorvido, e a maioria do iodo que não é captado pela glândula tireoide é excretada via urina (Miller et al., 1975). E, também que a transferência de iodo da dieta para o leite é na ordem de 20%, dependendo da quantidade de alimento consumido pelo animal (Kaufmann & Rambeck, 1998; Norouzian, 2011).

A quantidade de iodo na alimentação animal e os níveis de tolerância pelos animais se baseia nos sinais clínicos de intoxicação, no entanto, a maioria dos animais toleram altas concentrações de iodo na dieta em relação as exigências, conforme o (NRC 2001) os níveis máximos de iodo tolerável são de 50 mg/kg da dieta, sendo que essa concentração pode resultar em níveis indesejados de iodo no leite.

Nos mamíferos, aproximadamente 80% do iodo total é metabolizado pela glândula tireoide e o restante é encontrado em outros tecidos (Kaufmann & Rambeck, 1998).

Os teores mínimos de iodo no suplemento mineral de bovinos leiteiros em lactação é de 40 mg/kg de produto final, contudo vacas alimentadas com suplementos contendo 40 mg/kg de iodo apresenta concentração de 8 µL/L no leite (NRC, 2001).

Os efeitos da suplementação com iodo na dieta de vacas leiteiras e da desinfecção dos tetos com soluções contendo diferentes concentrações de iodo sobre a concentração de iodo no leite foi estudada por (O'Brien et al., 2013) e os autores observaram que tanto a suplementação quanto a desinfecção dos tetos influenciaram na concentração deste mineral no leite, os autores relataram ainda que houve aumento na concentração de iodo no leite de 217 µg/kg no grupo de animais em que não houve suplementação alimentar ou desinfecção dos tetos para mais de 1.000 µg/kg em relação ao grupo de animais que foi suplementado.

3.1 Metabolismo do Iodo - Síntese e secreção dos hormônios da tireoide

A tireoide possui um mecanismo de captura de iodo eficiente, normalmente mantém um gradiente de 100:1 entre o conteúdo de iodo das células da tireoide e o iodo extracelular (Ahad & Ganie, 2010).

A glândula contém diversos folículos, revestidos por células foliculares que repousam sobre uma membrana basal e esses folículos são preenchidos por um material claro e viscoso chamado de coloide (Figura 3). Esse coloide consiste em uma glicoproteína chamada tireoglobulina (Tg) que funciona como precursora, agindo como pró-hormônio na síntese de T3 e T4 (Ahad & Ganie, 2010).

A Tg é secretada no lúmen dos folículos e apresenta em sua composição 115 resíduos de tirosina, que são sítios potenciais de ligação para a adição de iodo, a maior parte de iodo dessa molécula se encontra ligada a precursores inativos: monoiodotirosina (MIT) e diiodotirosina (DIT) e a menor parte ligada a resíduos de iodotironil, T3 e T4 (Lunardelli, 2007).

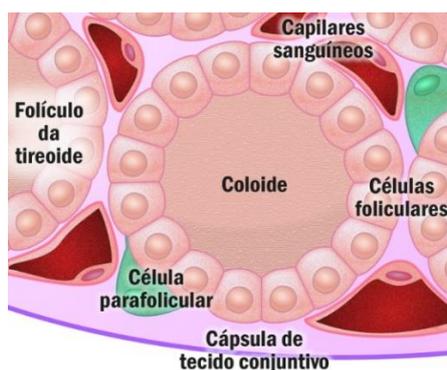


Figura 3: Esquema de um corte histológico da tireoide com algumas estruturas identificadas. Fonte: <http://lab-siviero.icb.usp.br>

Os hormônios da tireoide são os únicos que contêm iodo em sua composição, sendo assim, um oligoelemento indispensável no metabolismo dos hormônios tireoidianos, contudo o iodo compreende 65% do peso do T4 e 58% do peso do T3 (Figura 4) (Morse, 2012).

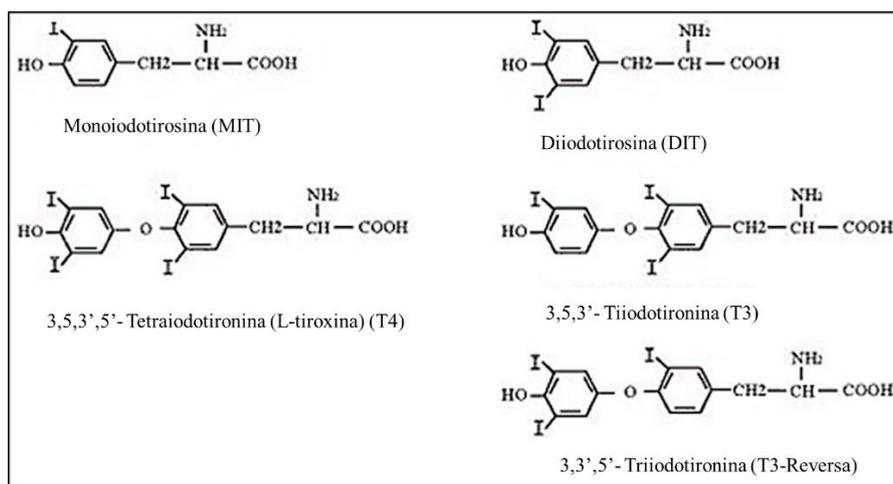


Figura 4: Estrutura química dos hormônios da tireoide e seus compostos precursores.
Fonte: Adaptado de Rodrigues (2004).

A secreção dos hormônios tireoidianos é regulada pela hipófise através do TSH que opera em mecanismo de *feedback* voltado para o nível de T4 no sangue. No entanto, quando ocorre uma queda no nível de T4 a hipófise é estimulada a aumentar a secreção de TSH, que por sua vez estimula a tireoide a liberar T4 na circulação para manter o nível normal do hormônio no sangue (Mezzomo & Nadal, 2016; Pirahanchi and Jialal, 2018)

O metabolismo do iodo e a síntese dos hormônios tireoidianos consistem nas seguintes etapas (Figura 5).

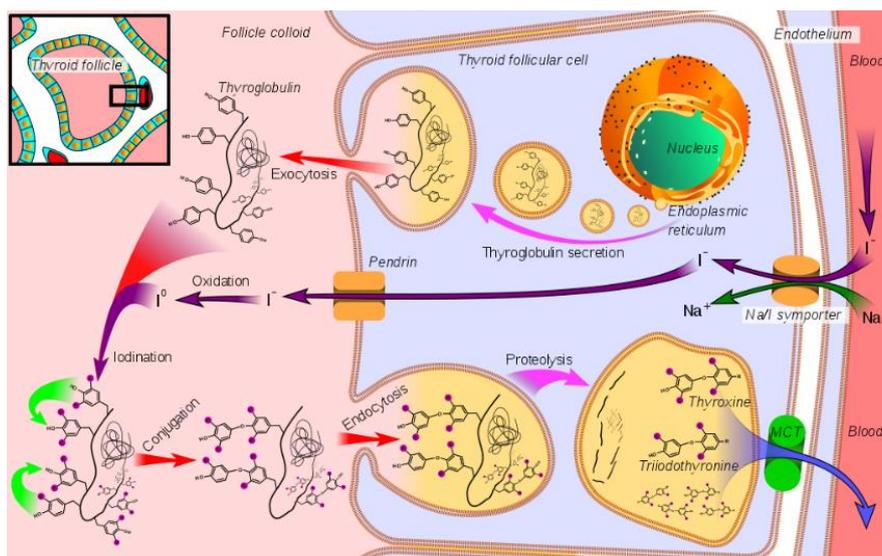


Figura 5: Síntese dos hormônios da tireoide. Fonte: Portulano et al. (2014).

O NIS é um symporter que transloca ambos os substratos (Na^+ e I^-) simultaneamente na mesma direção utilizando da força motriz gerada pela bomba de Na^+/K^+ ATPase (Riedel et al., 2001; Carvalho & Ferreira, 2007).

A síntese e secreção da Tg é o segundo passo e ocorre por processo independente dentro da célula folicular começando no retículo endoplasmático rugoso como unidade peptídica, a molécula se encontra contida em pequenas vesículas que se movem na direção da superfície apical da membrana plasmática antes de ser liberada na luz folicular (Ahad & Ganie, 2010).

No interior da célula o iodeto se difunde, conforme o gradiente eletroquímico em direção à superfície apical da membrana plasmática para o espaço luminal (Vaisman et al., 2004). Esse transporte acontece por uma proteína transportadora de iodeto/cloreto, independente de sódio chamado pendrina (*Pendrin*), diante disso o iodeto (I^-) é imediatamente oxidado em iodo (I_2) (Bizhanova & Kopp, 2009). Esta etapa ocorre seguindo pela organificação da Tg (Sendeski, 2011). A organificação do iodo à molécula de Tg depende da oxidação prévia do iodeto catalisada pela TPO na presença de peróxido de hidrogênio (Vaisman et al., 2004).

A iodinação ocorre primeiro na terceira posição da Tg para formar monoiodotirosina (MIT) e em seguida na quinta posição para formar diiodotirosina (DIT) (Di Jeso & Arvan, 2016). A iodinação da tirosina é seguida da reação de acoplamento de duas moléculas DIT que se unem e formam o tiroxina (T_4), e quando uma molécula de MIT e uma de DIT se unem e formam a triiodotirosina (T_3), essa reação é catalisada pela tireoperoxidase (TPO) (Mansourian, 2011).

Logo em seguida, por um processo facilitado pela megalina, o coloide contendo Tg iodada sofre endocitose, passando para o lúmen da célula na forma de gotículas e entra no citoplasma se movendo na direção da membrana basal, provavelmente através de microtúbulos ou microfilamentos e se fundem com as vesículas dos lisossomos que contêm enzimas proteolíticas (Marinò & McCluskey, 2000).

Segundo Rousset et al., (2015) a proteólise de Tg ocorre em duas etapas sequenciais; as clivagens precoces e seletivas para liberar resíduos (T_3 e T_4) e a proteólise atrasada e completa, entretanto estes processos ocorrem para o processo enzimático digerir a molécula de Tg e liberar T_4 , T_3 , DIT e MIT no citoplasma. Após a digestão da Tg, T_4 e T_3 devem passar dos compartimentos lisossômicos para o citoplasma e do citoplasma para fora da célula para entrar na circulação (Mansourian, 2011). Acredita-se

que os hormônios da tireoide são liberados por difusão simples dos tireócitos (Rousset et al., 2015).

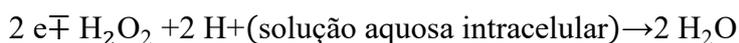
Os precursores DIT e o MIT são rapidamente deiodados pela enzima desiodinase e ocorre a recuperação do iodeto para a reciclagem junto com a tirosina (Ahad and Ganie, 2010).

Na corrente sanguínea, T4 e T3 podem circular na forma ligada ou livre porém, 99% de T4 e T3 circulam na forma ligada, menos de 1% circula na forma livre (Ladenson, 2012). Os hormônios da tireoide podem atender as exigências do corpo por até três meses, já que eles são armazenados nos folículos da glândula tireoide na forma de coloides por um tempo prolongado (Toda et al., 2011).

Enquanto a maior parte do iodo está concentrada na tireoide, o iodo não hormonal é encontrado em vários tecidos corporais, como glândulas mamárias, glândulas salivares, olhos, mucosas gástricas e colo do útero (Porterfield, 2000).

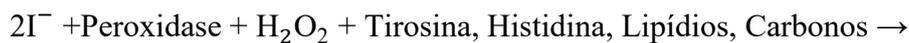
A acumulação de iodo na glândula mamária desempenha papel importante no desenvolvimento do feto, do neonato e exerce função antioxidante (van Der Reijden et al., 2017).

Na presença do peróxido de hidrogênio e peroxidase, o iodo atua como doador de elétrons diminuindo o dano por radicais livres de oxigênio (Esquema 1) (Ahad & Ganie, 2010; Venturi & Venturi, 2014).



Esquema 1: Mecanismo bioquímico antioxidante proposto para iodetos. Adaptado de (Venturi & Venturi, 2014).

Além dessas funções, o iodo desempenha papel imunológico (Esquema 2) (Bilal et al., 2017).



Iodo composto: Iodo-Tirosina, Iodo-Histidina, Iodo-Lipídios, Iodo-Carbonos.

Esquema 2: Mecanismo bioquímico antioxidante proposto para iodetos. Adaptado de (Venturi & Venturi, 2014).

3.2 Deficiência e Excesso de iodo

Quando há iodo insuficiente na dieta, a produção de tiroxina diminui, aumentando a glândula tireoide, fenômeno conhecido como bócio endêmico e é causado pela hipertrofia compensatória da glândula, visualmente o sintoma de deficiência se manifesta com um inchaço (Knobel & Medeiros-Neto, 2007).

Além dessa particularidade sintomatológica, outros possíveis problemas podem surgir como estro suprimido ou irregular. No macho, a fertilidade pode ser reduzida (Mohamed & Salwa, 1999). A anormalidade reprodutiva é uma das consequências mais notáveis da redução da função tireoidiana (NRC, 2001) nos animais, os reprodutores geram crias sem pelo, fracos ou mortos além do desenvolvimento cerebral prejudicado.

Algumas doenças são provocadas pela deficiência do iodo no organismo, que pode provocar retardo mental grave e irreversível, surdo-mudez em crianças e anomalias congênitas. No entanto, para minimizar e até mesmo reparar a causa de doenças ligadas ao iodo, à quantidade do nutriente tem sido revista ao longo dos anos, em virtude das mudanças no padrão de alimentação dos brasileiros, pois o excesso deste nutriente também pode trazer danos à saúde (Anvisa, 2013).

4.0 Antibacterianos

O leite é um alimento delicado e altamente perecível tendo suas características físicas, químicas e biológicas facilmente alteradas pela ação de microrganismos e pela manipulação a que é submetido (Oliveira et al., 2015). Outro problema recorrente que vem sendo noticiado é a adulteração do leite pela adição de substâncias ilegais e, em alguns casos, a constatação da presença de contaminantes que oferecem riscos a saúde humana como resíduos de antibióticos, produtos químicos e outros (Fischer et al., 2011).

Vale ressaltar que em qualquer sistema convencional de criação de animais, a utilização de drogas veterinárias de forma profilática ou terapêutica é necessária (Landers et al., 2012). Todavia, na prática muitos abusos no uso de fármacos são observados. Muitas situações de uso indiscriminado de antibióticos fazem com que os microrganismos desenvolvam resistência aos mesmos, fazendo com que percam sua eficácia (Who, 2018).

Assim, como para outras substâncias, os fármacos são absorvidos para a corrente sanguínea e podem alcançar a glândula mamária e serem excretado via leite. Quando humanos ingerem leite com resíduos de antibióticos, por exemplo, passa-se a desenvolver

resistência e em momentos de necessidade de uso deste tipo de medicamento de forma terapêutico o efeito não é alcançado (Aarestrup & Wegener, 1999).

Na pecuária leiteira, os antimicrobianos são usados mais frequentemente no tratamento de doenças relacionadas com a glândula mamária, na maioria das vezes o uso é no tratamento de mastite e também no processo de terapia da vaca seca (Scherpenzeel et al., 2016).

A terapia da vaca seca consiste numa alternativa na redução de gastos no tratamento de mastite, usando medicamentos no início do período de secagem do leite, ou seja, no final da lactação, essa técnica tem sido uma alternativa no controle de mastite subclínica promovendo a cura de infecções mamárias pré-existentes no momento da secagem, assim como prevenir novos casos de infecções no retorno da lactação (Bhutto et al., 2011).

O uso de antimicrobiano tem sido utilizado de forma indiscriminada, tanto para fins profiláticos como para tratamentos. Estes procedimentos acarretam o acúmulo de resíduos de antimicrobianos no leite, representando risco aos consumidores e problema de saúde pública (Nascimento et al., 2001).

O acúmulo de resíduos de antimicrobianos no leite é decorrente de uso abusivo e inadequado da medicação, não só como o desrespeito ao período de carência do antimicrobiano de acordo com as recomendações de descarte do fabricante, quanto a retenção prolongado de alguns princípios (Martins et al., 2016).

Estudos recentes mostram que grande parte de produtores quando fazem uso de medicamentos para tratamento de vaca seca ou para mastite usam o período de descarte curto, por volta de 3 a 5 dias, no entanto, o mais indicado seria períodos mais prolongados de descarte. Resultados positivos de antimicrobianos no leite devem servir de alerta para o produtor, já que o leite contaminado pode acabar sendo incorporado junto ao leite isento de antimicrobianos (Estevão Neto et al., 2015).

Os antibióticos como são comumente conhecidos os antimicrobianos, compreendem em variedade de compostos, podem ser naturais e semissintéticos, apresentam propriedades antibacterianas e se dividem em cinco classes: β -lactâmicos (penicilina e cefalosporina), tetraciclina, macrolídeos, aminoglicosídeos e anfenicóis (Kennedy et al., 1998).

Nos Estados Unidos (EUA), aproximadamente, 16% de todas as vacas de leite, recebem antibioticoterapias no tratamento de mastite clínica todo ano, e praticamente

todas as vacas leiteiras, após a lactação, recebem dose de antibiótico intramamário como profilaxia para prevenir e controlar futuras infecções, sendo que os principais fármacos empregados são as penicilinas, cefalosporinas, ou outros fármacos β -lactâmicos (Landers et al., 2012).

Os antibióticos mais frequentemente utilizados nos tratamento de mastite em rebanhos leiteiros no Brasil são do grupo dos β -lactâmicos, como a penicilina G, as cefalosporinas e a ampicilina, como também amoxicilina e neomicina (Tomazi & Santos 2020) e o uso excessivo desses medicamentos tem causado resistência as principais cepas bacterianas causadoras da mastite, além de deixar resíduos no leite (Tomazi et al., 2019).

Navrátilová et al. (2011) analisaram o conteúdo de resíduos de antibióticos no leite cru e observaram que o mais encontrado frequentemente foi enrofloxacina e o seu resíduo indicador, a ciprofloxacina. Um controle eficiente dos resíduos de medicamentos veterinários, especificamente, os antibióticos no leite são muito importantes para garantir a segurança do consumidor e a qualidade do leite e seus derivados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarestrup, F.M., and H.C. Wegener. 1999. The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*. *Microbes Infect.* 1:639–644. doi:10.1016/S1286-4579(99)80064-1.
- Abebe, R., H. Hatiya, M. Abera, B. Megersa, and K. Asmare. 2016. Bovine mastitis: Prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. *BMC Vet. Res.* 12:1–11. doi:10.1186/s12917-016-0905-3.
- Ahad, F., and S.A. Ganie. 2010. Iodine, Iodine metabolism and Iodine deficiency disorders revisited.. *Indian J. Endocrinol. Metab.* 14:13–7.
- Alhussien, M.N., and A.K. Dang. 2018. Milk somatic cells, factors influencing their release, future prospects, and practical utility in dairy animals: An overview. *Vet. World* 11:562–577. doi:10.14202/vetworld.2018.562-577.
- Andrade, J.C. de. 2001. Determinações iodométricas. *Rev. Chemkeys* 1–6. doi:10.20396/chemkeys.v0i2.9623.
- Anvisa. 2013. Resultado do monitoramento do teor de iodo no sal ano : 2013 1–6.
- Beede, D.K. 2006. Evaluation of Water Quality and Nutrition for Dairy Cattle. *High Plains Dairy Conf.* 129–154.
- Bhutto, A.L., R.D. Murray, and Z. Woldehiwet. 2011. The effect of dry cow therapy and internal teat-sealant on intra-mammary infections during subsequent lactation. *Res. Vet. Sci.* 90:316–320. doi:10.1016/j.rvsc.2010.06.006.
- Bilal, M.Y., S. Dambaeva, J. Kwak-Kim, A. Gilman-Sachs, and K.D. Beaman. 2017. A role for iodide and thyroglobulin in modulating the function of human immune cells. *Front. Immunol.* 8:1–13. doi:10.3389/fimmu.2017.01573.
- Birhanu, M., S. Leta, G. Mamo, and S. Tesfaye. 2017. Prevalence of bovine subclinical mastitis and isolation of its major causes in Bishoftu Town, Ethiopia. *BMC Res. Notes* 10:1–6. doi:10.1186/s13104-017-3100-0.
- Bizhanova, A., and P. Kopp. 2009. Minireview: The sodium-iodide symporter NIS and pendrin in iodide homeostasis of the thyroid. *Endocrinology* 150:1084–1090. doi:10.1210/en.2008-1437.
- Brasil. 2018. Instrução normativa no 76, de 26 de novembro de 2018. Regulamentos técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A Ministério Da Agric. e Abast. D.O.U. 30/11/2018. 230:9.
- Brasil. 2002. Instrução normativa no 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo a, o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado, o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite pasteurizado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. Ministério Da Agric. e Abast. D.O.U., 20/09/2002 1–21.
- Brasil. 2018. Instrução normativa no 77, de 26 de novembro de 2018. Critérios e procedimentos para a produção, acondicionamento, conservação, transporte, Seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial. Ministério Da Agric. e Abast. D.O.U 30/11/2018. 230:1–8.
- Brasil. 2019.. Instrução normativa nº 59. Alterações da instrução normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018. Ministério Da Agric. e Abast. D.O.U 07/11/2019. 0:6–7.

- Brasil, R.B., E.S. Nicolau, J.F. Cabral, and M.A.P. da Silva. 2015. Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino. *Ciência Anim.* 25:71–80.
- Butler, G., S. Stergiadis, C. Seal, M. Eyre, and C. Leifert. 2011. Fat composition of organic and conventional retail milk in northeast England. *J. Dairy Sci.* 94:24–36. doi:10.3168/jds.2010-3331.
- Cabral, J. F.; Silva, M. A. P.; Brasil, R. B.; Carvalho, T. S.; Giovannini, C. I.; Nicolau, E.S. 2013. Effect of different sample collection methods on the results of raw milk analysis. *Rev. Inst. Lact. “Cândido Tostes”* 68:40–44.
- Carvalho, D.P., and A.C.F. Ferreira. 2007. The importance of sodium/iodide symporter (NIS) for thyroid cancer management. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 51:672–682. doi:10.1590/s0004-27302007000500004.
- Castillo, C., V. Pereira, Á. Abuelo, and J. Hernández. 2013. Effect of supplementation with antioxidants on the quality of bovine milk and meat production. *Sci. World J.* 2013. doi:10.1155/2013/616098.
- Castro, S. B., Lacasse, P., Fouquet, A., Beraldin, F., Robichaud, A., & Berthiaume, R. 2010. Iodine Concentration in Milk Sampled from Canadian Farms. *J. Food Prot.* 73:1658–1663. doi:10.4315/0362-028X-73.9.1658.
- Chilliard, Y., A. Ferlay, R.M. Mansbridge, and M. Doreau. 2000. Ruminant milk fat plasticity: Nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Anim. Res.* 49:181–205. doi:10.1051/animres:2000117.
- Chilliard, Y., F. Glasser, A. Ferlay, L. Bernard, J. Rouel, and M. Doreau. 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109:828–855. doi:10.1002/ejlt.200700080.
- Cottica, S.M., D.A.V. Amado, S.C. de Aguiar, J.S. Boeing, S.L. Franco, L.M. Zeoula, And J.V. Visentainer. 2019. Antioxidant activity and lipid oxidation in milk from cows with soybean oil and propolis extract added to their feed. *Food Sci. Technol.* 39:467–474. doi:10.1590/fst.33817.
- Cutrim, C.S., and M.A.S. Cortez. 2018. A review on polyphenols: Classification, beneficial effects and their application in dairy products. *Int. J. Dairy Technol.* 71:564–578. doi:10.1111/1471-0307.12515.
- Dahl, L., J.A. Opsahl, H.M. Meltzer, and K. Julshamn. 2003. Iodine concentration in Norwegian milk and dairy products. *Br. J. Nutr.* 90:679–685. doi:10.1079/bjn2003921.
- Darwish, W.S., Y. Ikenaka, A.E. Morshdy, K.I. Eldesoky, S. Nakayama, H. Mizukawa, and M. Ishizuka. 2016. B-Carotene and Retinol Contents in the Meat of Herbivorous Ungulates With a Special Reference To Their Public Health Importance. *J. Vet. Med. Sci.* 78:351–354. doi:10.1292/jvms.15-0287.
- Delatorre, A.B., P.M. Rodrigues, C. de J. Aguiar, V.V.V. Andrade, A. Arêdes, and V.H. Perez. 2011. Produção de biodiesel: considerações sobre as diferentes matérias-primas e rotas tecnológicas de processos. *Perspect. Online Biológicas e Saúde* 1:21–47. doi:10.25242/8868112011510.
- Dröge, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82:47–95. doi:10.1152/physrev.00018.2001.
- Efsa. 2014. Scientific opinion on dietary reference values for iodine. *EFSA J.* 12:3660. doi:10.2903/j.efsa.2014.3660.
- Eifert, E. da C., R. de P. Lana, D.P.D. Lanna, W.M. Leopoldino, P.B. Arcuri, M.I. Leão, M.R. Cota, and S. de C. Valadares Filho. 2006. Perfil de ácidos graxos do leite de vacas alimentadas com óleo de soja e monensina no início da lactação. *Rev. Bras. Zootec.* 35:219–228. doi:10.1590/s1516-35982006000100028.

- El-Sayed, S.M., and A.M. Youssef. 2019. Potential application of herbs and spices and their effects in functional dairy products. *Heliyon* 5:e01989. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e01989.
- Embrapa. 2019. Sua excelência, o consumidor: novos produtos e novas estratégias da cadeia do leite para ganhar competitividade e conquistar os clientes finais. *Anu. Leite*. 104.
- Ertan, K., D. Bayana, Ö. Gökçe, T. Alatossava, Y. Yılmaz, and O. Gürsoy. 2017. Türkiye’de satışı sunulan uht ve pastörize inek sütü örneklerinin toplam antioksidan kapasitesi ve fenolik madde içeriği. *Akad. Gıda* 15:103–108. doi:10.24323/akademik-gida.333630.
- Eskandari, S., D.D. Loo, G. Dai, O. Levy, E.M. Wright, and N. Carrasco. 1997. Thyroid Na⁺/I⁻ symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity.. *J. Biol. Chem.* 272:27230–8. doi:10.1074/jbc.272.43.27230.
- Estevão Neto, A., F. Garino Júnior, J.C. de A. Santos, L.C.A. da Silva, R.A.T. Matos, A. Estevão Neto, F. Garino Júnior, J.C. de A. Santos, L.C.A. da Silva, and R.A.T. Matos. 2015. Avaliação de resíduo de antibiótico em amostras de leite de vacas após a terapia de vacas secas. *Arq. Inst. Biol. (Sao. Paulo)*. 82:0–0. doi:10.1590/1808-1657000322013.
- Ezzat Alnakip, M., M. Quintela-Baluja, K. Böhme, I. Fernández-No, S. Caamaño-Antelo, P. Calo-Mata, and J. Barros-Velázquez. 2014. The immunology of mammary gland of dairy ruminants between healthy and inflammatory conditions. *J. Vet. Med.* 2014:1–31. doi:10.1155/2014/659801.
- Fiedor, J., and K. Burda. 2014. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients* 6:466–488. doi:10.3390/nu6020466.
- Fischer, W.J., B. Schilter, A.M. Tritscher, and R.H. Stadler. 2011. Contaminants of milk and dairy products: contamination resulting from farm and dairy practices. *Encycl. Dairy Sci. Second Ed.* 887–897. doi:10.1016/B978-0-12-374407-4.00104-7.
- Foroutan, A., A.C. Guo, R. Vazquez-Fresno, M. Lipfert, L. Zhang, J. Zheng, H. Badran, Z. Budinski, R. Mandal, B.N. Ametaj, and D.S. Wishart. 2019. Chemical composition of commercial cow’s milk. *J. Agric. Food Chem.* 67:4897–4914. doi:10.1021/acs.jafc.9b00204.
- Glasser, F., A. Ferlay, and Y. Chilliard. 2008. Oilseed lipid supplements and fatty acid composition of cow milk: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 91:4687–4703. doi:10.3168/jds.2008-0987.
- González, F.H.D., W. Dürr, R.S. Fontaneli, J.R. Peres, L. Barros, and P.P. Ceballo. 2001. Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. *Uso do leite para Monit. a Nutr. e o Metab. vacas leiteiras* 5–22.
- Grădinaru, A.C., Ş. Creangă, and G. Solcan. 2015. Milk - A review on its synthesis, composition, and quality assurance in dairy industry. *Hum. Vet. Med.* 7:173–177.
- Grażyna, C., C. Hanna, A. Adam, and B.M. Magdalena. 2017. Natural antioxidants in milk and dairy products. *Int. J. Dairy Technol.* 70:165–178. doi:10.1111/1471-0307.12359.
- Green, B.P., L. Turner, E. Stevenson, and P.L.S. Rumbold. 2015. Short communication: Patterns of dairy consumption in free-living children and adolescents. *J. Dairy Sci.* 98:3701–3705. doi:10.3168/jds.2014-9161.
- Haraguchi, F. K. A., W.C. de, and H. Paula. 2006. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. *Rev. Nutr., Campinas*, 19(4)479-488, jul./ago., 2006 *Rev. Nutr.* 19:479–488. doi:10.1016/j.ssc.2013.11.032.

- Harvatine, K.J., and D.E. Bauman. 2011. Characterization of the acute lactational response to trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid. *J. Dairy Sci.* 94:6047–6056. doi:10.3168/jds.2011-4657.
- Isabella, A.J., R.B.G. Otvos, I. Paulino, R. Sasounian, V. Tainã, and T. Andreis. 2016. Lipídios, ácidos graxos e fosfolipídeos.
- Istvan, F., and M. Marques. 2018. Geographical milk redistribution in Paraná State , Brazil : Consequences of institutional and market changes. *J. Rural Stud.* 64:63–72. doi:10.1016/j.jrurstud.2018.10.004.
- Izquierdo, A.C., J.E. Guerra Liera, R.E. Cervantes, J.F. Inzunza Castro, E.A. Villa Mancera, R. Huerta Crispin, M. de L. Juarez Mosqueda, A.G. Vazquez, J. Olivares Perez, P.S. Aparicio, and B.E. Rodriguez Denis. 2017. Production of milk and bovine mastitis. *Adv. Dairy Res.* 05:2–5. doi:10.4172/2329-888x.1000174.
- Jensen, R.G., A.M. Ferris, and C.J. Lammi-Keefe. 1991. The composition of milk fat. *J. Dairy Sci.* 74:3228–3243. doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78509-3.
- Di Jeso, B., and P. Arvan. 2016. Thyroglobulin from molecular and cellular biology to clinical endocrinology. *Endocr. Rev.* 37:2–36. doi:10.1210/er.2015-1090.
- Jóźwik, A., E. Bagnicka, N. Strzalkowska, A. Śliwa-Jóźwik, K. Horbańczuk, B. Pyzel, J. Krzyewski, A.H. Świergiel, J.O. Horbańczuk, and R.G. Cooper. 2010. The oxidative status of milking goats after per os administration of N-acetylcysteine. *Anim. Sci. Pap. Reports* 28:143–152.
- Kailasapathy, K. 2016. Chemical composition, physical and functional properties of milk and milk ingredients. *Dairy Process. Qual. Assur.* 75–103. doi:10.1002/9780813804033.ch4.
- Kaufmann, S., and W.A. Rambeck. 1998. Iodine supplementation in chicken, pig and cow feed. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl).* 80:147–152. doi:10.1111/j.1439-0396.1998.tb00517.x.
- Kelleher, S.L., D. Chatterton, K. Nielsen, and B. Lönnerdal. 2003. Glycomacropeptide and α -lactalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutritional status in infant rhesus monkeys. *Am. J. Clin. Nutr.* 77:1261–1268. doi:10.1093/ajcn/77.5.1261.
- Kennedy, D.G.; Mccracken, R.J.; Cannavan, A.; Hewitt, S.. 1998. Use of liquid chromatography–mass spectrometry in the analysis residues of antibiotics in meat and milk. *J. Chromatogr. A* 812:77–98.
- Khan, I.T., M. Bule, R. Ullah, M. Nadeem, S. Asif, and K. Niaz. 2019a. The antioxidant components of milk and their role in processing, ripening, and storage: Functional food. *Vet. World* 12:12–33. doi:10.14202/vetworld.2019.12-33.
- Khan, I.T., M. Nadeem, M. Imran, R. Ullah, M. Ajmal, and M.H. Jaspal. 2019b. Antioxidant properties of Milk and dairy products: A comprehensive review of the current knowledge. *Lipids Health Dis.* 18:1–13. doi:10.1186/s12944-019-0969-8.
- Khanal and Dhiman. 2004. Biosynthesis of conjugated linoleic acid (CLA): A review. *Pakistan J. of Nutri* 2:72-81.
- Kiokias, S., and M.H. Gordon. 2004. Antioxidant properties of carotenoids in vitro and in vivo. *Food Rev. Int.* 20:99–121. doi:10.1081/FRI-120037155.
- Knobel, M., and G. Medeiros-Neto. 2007. Relevance of iodine intake as a reputed predisposing factor for thyroid cancer. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 51:701–712. doi:10.1590/S0004-27302007000500007.
- Kozloski, G.V. 2016. Livro Bioquímica Dos Ruminantes.Pdf. 2nd ed. U.F. de S. Maria, ed. Santa Maria.

- De Kruif, C.G., T. Huppertz, V.S. Urban, and A. V. Petukhov. 2012. Casein micelles and their internal structure. *Adv. Colloid Interface Sci.* 171–172:36–52. doi:10.1016/j.cis.2012.01.002.
- Ladenson, M.K. and P. 2012. Goldman's cecil medicine (Twenty-Fourth Edition) - Thyroid. Volume 2,. 2012.
- Landers, T.F., B. Cohen, T.E. Wittum, and E.L. Larson. 2012. A review of antibiotic use in food animals: Perspective, policy, and potential. *Public Health Rep.* 127:4–22. doi:10.1177/003335491212700103.
- Laurberg, P., S. Andersen, N. Knudsen, L. Ovesen, S.B. Nøhr, and I. Bülow Pedersen. 2002. Thiocyanate in food and iodine in milk: from domestic animal feeding to improved understanding of cretinism. *Thyroid* 12:897–902. doi:10.1089/105072502761016520.
- Lima, L.F., and A.M. Navarro. 2018. Funções plenamente reconhecidas de nutrientes - iodo / ILSI Brasil. *International Life Sciences Institute do Brasil* 22:9-33.
- Lin, Y., X. Sun, X. Hou, B. Qu, X. Gao, and Q. Li. 2016. Effects of glucose on lactose synthesis in mammary epithelial cells from dairy cow. *BMC Vet. Res.* 12:1–11. doi:10.1186/s12917-016-0704-x.
- Lucatto, J.N., S.N.T.G. de Brandão, and D.A. Drunkler. 2014. Ácido linoleico conjugado: estrutura química, efeitos sobre a saúde humana e análise em lácteos. *Rev. do Inst. Laticínios Cândido Tostes* 69:199. doi:10.14295/2238-6416.v69i3.282.
- Lunardelli, E.A. dos R. 2007. Efeito dos modelos experimentais de hipertireoidismo o hipotireoidismo sobre aspectos bioquímicos e comportamentais em ratos adultos. Tese. Departamento de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 125.
- Mansourian, A.R. 2011. Metabolic pathways of tetraiodothyronine and triiodothyronine production by thyroid gland: A review of articles. *Pakistan J. Biol. Sci.* 14:1–12. doi:10.3923/pjbs.2011.1.12.
- Marinò Michele, and and Mccluskey Robert T. 2000. Role of thyroglobulin endocytic pathways in the control of thyroid hormone release. *Am J Physiol Cell Physiol* 279:1295–1306. doi:10.1016/j.envpol.2004.10.021.
- Markiewicz-Keszycka, M., G. Czyzak-Runowska, P. Lipinska, and J. Wójtowski. 2013. Fatty acid profile of milk - A review. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 57:135–139. doi:10.2478/bvip-2013-0026.
- Martins, T., A.F. Rosa, L. Castelani, M.S. de Miranda, J.R.P. Arcaro, and C.R. Pozzi. 2016. Intramammary treatment with gentamicin in lactating cows with clinical and subclinical mastitis. *Pesqui. Vet. Bras.* 36:283–289. doi:10.1590/S0100-736X2016000400006.
- Matt, D., E., Rembalkowska, A, Luik, E. Peetsmann, S., Pehme. 2011. Quality of organic vs. Conventional food and effects on health. Ed. Estonian University of Life Sciences. Estonian UC.
- McManaman, J.L. 2012. Milk lipid secretion: Recent biomolecular aspects. *Biomol. Concepts* 3:581–591. doi:10.1515/bmc-2012-0025.
- Medeiros, E.S., S.B.P. Barbosa, R.B. Jatobá, S.S. Azevedo, J.W. Pinheiro Junior, T.N. Saukas, P.P.F. Albuquerque, and R.A. Mota. 2011. Perfil da contagem de células somáticas na infecção intramamária em búfalas na Região Nordeste do Brasil. *Pesqui. Veterinária Bras.* 31:219–223. doi:10.1590/S0100-736X2011000300006.
- Menéndez González, S., A. Steiner, B. Gassner, and G. Regula. 2010. Antimicrobial use in Swiss dairy farms: Quantification and evaluation of data quality. *Prev. Vet. Med.* 95:50–63. doi:10.1016/j.prevetmed.2010.03.004.

- Meneses, M.A., F.F. Da Silva, R.R. Silva, A.R. Schio, G.M. Da Silva, E.S.O. Rodrigues, A.F. Porto, D.D. Souza, W.P.S.T.S. Ponde, J.S.O. De Oliveira, and L.R. Pimentel. 2015. Composição em ácidos graxos do leite de vacas alimentadas com glicerina de baixa pureza. *Semin. Agrar.* 36:971–984. doi:10.5433/1679-0359.2015v36n2p971.
- Mensink, R.P. 2016. Effects of saturated fatty acids on serum lipids and lipoproteins: a systematic review and regression analysis. *World Heal. Organ.* 1–63.
- Mesquita, A.A., C.M.B.M. Rocha, F.R.P. Bruhn, D.A.C. Custódio, M.S. Braz, S.M. Pinto, D.B. Silva, and G.M. Costa. 2019. *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*: Prevalence, resistance to antimicrobials, and their relationship with the milk quality of dairy cattle herds in Minas Gerais state, Brazil. *Pesqui. Vet. Bras.* 39:308–316. doi:10.1590/1678-5150-PVB-5821.
- Mezzomo, T.R., and J. Nadal. 2016. Efeito dos nutrientes e substâncias alimentares na função tireoidiana e no hipotireoidismo. *DEMETRA Aliment. Nutr. Saúde* 11:427–444. doi:10.12957/demetra.2016.18304.
- Miller, J.K., E.W. Swanson, and G.E. Spalding. 1975. Iodine absorption, excretion, recycling, and tissue distribution in the dairy cow. *J. Dairy Sci.* 58:1578–1593. doi:10.3168/jds.S0022-0302(75)84753-9.
- Mohamed, S.B., 1999. Pattern of clinical features in patients with hypothyroidism presenting to khartoum hospital. MD Thesis. Faculty of medicine, U.of K. U.of K
- Morse, N.L. 2012. Benefits of docosahexaenoic acid, folic acid, vitamin D and iodine on foetal and infant brain development and function following maternal supplementation during pregnancy and lactation. *Nutrients* 4:799–840. doi:10.3390/nu4070799.
- Mungube, E.O., B.A. Tenhagen, F. Regassa, M.N. Kyule, Y. Shiferaw, T. Kassa, and M.P.O. Baumann. 2005. Reduced milk production in udder quarters with subclinical mastitis and associated economic losses in crossbred dairy cows in Ethiopia. *Trop. Anim. Health Prod.* 37:503–512. doi:10.1007/s11250-005-7049-y.
- Murphy, M.R. 1992. Water Metabolism of Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 75:326–333. doi:10.3168/jds.S0022-0302(92)77768-6.
- Nakamura, Y.K., N. Flintoff-Dye, and S.T. Omaye. 2008. Nutrition & metabolism atherosclerosis. *Nutr. Metab. (Lond).* 20:1–20. doi:10.1186/1743-7075-5-22.
- Nascimento, G.G.F. Do, V. Maestro, and M.S.P. De Campos. 2001. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. *Rev. Nutr.* 14:119–124. doi:10.1590/s1415-52732001000200005.
- NRC - National Research Council. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle.* Washington, DC.
- Navrátilová, P., I. Borkovcová, J. Vyhnálková, and L. Vorlová. 2011. Fluoroquinolone residues in raw cow's milk. *Czech J. Food Sci.* 29:641–646. doi:10.17221/22/2011-cjfs.
- Neville, M.C., and M.F. Picciano. 1997. Regulation of Milk Lipid Secretion and Composition. *Annu. Rev. Nutr.* 17:159–184. doi:10.1146/annurev.nutr.17.1.159.
- Niemann, H., B. Kuhla, and G. Flachowsky. 2011. Perspectives for feed-efficient animal production. *J. Anim. Sci.* 89:4344–4363. doi:10.2527/jas.2011-4235.
- Nita, M., and A. Grzybowski. 2016. The role of the reactive oxygen species and oxidative stress in the pathomechanism of the age-related ocular diseases and other pathologies of the anterior and posterior eye segments in adults. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016. doi:10.1155/2016/3164734.
- Norouzian, M.A. 2011. Iodine in raw and pasteurized milk of dairy cows fed different amounts of potassium iodide. *Biol. Trace Elem. Res.* 139:160–167. doi:10.1007/s12011-010-8651-z.

- Nozière, P., B. Graulet, A. Lucas, B. Martin, P. Grolier, and M. Doreau. 2006. Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131:418–450. doi:10.1016/j.anifeedsci.2006.06.018.
- O'Brien, B., D. Gleeson, and K. Jordan. 2013. Iodine concentrations in milk. *Irish J. Agric. Food Res.* 52:209–216.
- Oliveira, G.B. de, L. Favarin, R.H. Luchese, D. McIntosh, G.B. de Oliveira, L. Favarin, R.H. Luchese, and D. McIntosh. 2015. Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know?. *Brazilian J. Microbiol.* 46:313–321. doi:10.1590/S1517-838246220130963.
- Olson, J.A., and N.I. Krinsky. 1995. Introduction: The colorful, fascinating world of the carotenoids: Important physiologic modulators. *FASEB J.* 9:1547–1550. doi:10.1096/fasebj.9.15.8529833.
- Ouattara, L. 2013. Factors determining the risk of iodine excess in bulk milk tanks on canadian dairy farms. Thesis. Maîtrise en économique. Université Laval. Quebec, Canadá.
- Palmquist, D.L., A.L. Lock, K.J. Shingfield, and D.E. Bauman. 2005. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. *Adv. Food Nutr. Res.* 50:179–217. doi:10.1016/S1043-4526(05)50006-8.
- Phaniendra, A., D.B. Jestadi, and L. Periyasamy. 2015. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J. Clin. Biochem.* 30:11–26. doi:10.1007/s12291-014-0446-0.
- Philpot, N. W.; Nickerson, S. C. Vencendo a luta contra a mastite. Piracicaba: Westfalia Surge/Westfalia Landtechnik do Brasil, 2002. 192p.
- Pirahanchi, Y., and I. Jialal. 2018. Physiology, thyroid stimulating hormone (TSH). *Stat Pearls* 10–13.
- Porterfield Susan P. 2000. Thyroid Gland. In: *Endocrine Physiology*. 2nd ed. Mosby's, ed. Georgia, Augusta, GA.
- Portulano, C., M. Paroder-Belenitsky, and N. Carrasco. 2014. The Na⁺/I⁻ Symporter (NIS): Mechanism and medical impact. *Endocr. Rev.* 35:106–149. doi:10.1210/er.2012-1036.
- Quintão, L.C., A.F. da Cunha, L.J. Bragança, K.S. Coelho, M.F. Nunes, and L.H.G. Saraiva. 2017. Evolution and factors influencing somatic cell count in raw milk from farms in Viçosa state of Minas Gerais. *Acta Sci. Anim. Sci.* 39:393. doi:10.4025/actascianimsci.v39i4.35364.
- Rafałowski, R., Z. Zegarska, A. Kuncewicz, and Z. Borejszo. 2014. Oxidative stability of milk fat in respect to its chemical composition. *Int. Dairy J.* 36:82–87. doi:10.1016/j.idairyj.2014.01.002.
- Rangel, A.H. do N., V.M. de Araújo, K.C. Bezerra, M.L. de J. Barreto, H.R. de Medeiros, and D.M. de L. Júnior. 2013. Avaliação da qualidade do leite cru com base na contagem de células somáticas em rebanhos bovinos comerciais no estado do rio grande do norte, brasil. *Arch. Vet. Sci.* 18:40–45.
- van der Reijden, O.L., M.B. Zimmermann, and V. Galetti. 2017. Iodine in dairy milk: Sources, concentrations and importance to human health. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 31:385–395. doi:10.1016/j.beem.2017.10.004.
- Rezaei, R., Z. Wu, Y. Hou, F.W. Bazer, and G. Wu. 2016. Amino acids and mammary gland development: Nutritional implications for milk production and neonatal growth. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 7:2–22. doi:10.1186/s40104-016-0078-8.
- Riedel, C., O. Dohán, A. De la Vieja, C.S. Ginter, and N. Carrasco. 2001. Journey of the iodide transporter NIS: From its molecular identification to its clinical role in cancer. *Trends Biochem. Sci.* 26:490–496. doi:10.1016/S0968-0004(01)01904-1.

- Risher, J., G. Diamond, S.G. Swarts, Richard Amata, and N. Syracuse Research Corporation, North Syracuse. 2001. Toxicological Profile for Iodine. Clifton Ro. 2001, Atlanta, Georgia.
- Rodrigues, C.. 2004. Rastreo Molecular do gene da peroxidase da tiróide em doentes com hipotireoidismo congénito. Tese. Escola de Ciências da Universidade do Minho, Portugal.
- Rousset, B., C. Dupuy, and J.D. Françoise Miot. 2015. Chapter 2 thyroid hormone synthesis and secretion. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, ed. Endotext [Internet]., South Dartmouth (MA).
- Ruegg, P.L. 2017. A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *J. Dairy Sci.* 100:10381–10397. doi:10.3168/jds.2017-13023.
- Ryan, E., K. Galvin, T.P. O'Connor, A.R. Maguire, and N.M. O'Brien. 2006. Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of brazil, pecan, pine, pistachio and cashew nuts. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 57:219–228. doi:10.1080/09637480600768077.
- Santiago-Neto, W., G. Machado, D.S. Paim, T. de Campos, M.A.V.P. Brito, M.R.I. Cardoso, and L.G. Corbellini. 2014. Relação da idade na presença de bactérias resistentes a antimicrobianos em rebanhos leiteiros no Rio Grande do Sul. *Pesqui. Veterinária Bras.* 34:613–620. doi:10.1590/S0100-736X2014000700001.
- Scherpenzeel, C.G.M., S.H.W. Tijds, I.E.M. den Uijl, I.M.G.A. Santman-Berends, A.G.J. Velthuis, and T.J.G.M. Lam. 2016. Farmers' attitude toward the introduction of selective dry cow therapy. *J. Dairy Sci.* 99:8259–8266. doi:10.3168/jds.2016-11349.
- Schlemper, V., and A.P. Sachet. 2017. Antibiotic residues in pasteurized and unpasteurized milk marketed in southwest of Paraná, Brazil. *Ciência Rural* 47. doi:10.1590/0103-8478cr20170307.
- Schöne, F., and Rajkumar Rajendram, Iodine in Farm Animals. In: Victor R. Preedy, Gerard N. Burrow and Ronald Watson, editors, *Comprehensive Handbook of Iodine*. Oxford: Academic Press, 2009. 151-170.
- Semo, E., E. Kesselman, D. Danino, and Y.D. Livney. 2007. Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals. *Food Hydrocoll.* 21:936–942. doi:10.1016/j.foodhyd.2006.09.006.
- Sendeski, M.M. 2011. Pathophysiology of renal tissue damage by iodinated contrast media. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 38:292–299. doi:10.1111/j.1440-1681.2011.05503.x.
- Sgarbieri, V.C. 2004. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. *Rev. Nutr.* 17:397–409. doi:10.1590/s1415-52732004000400001.
- Souza, L.G. de, G.T. dos Santos, J.C. Damasceno, M. Matsushita, E.S. Sakaguti, N.P. Ribas, and R.G. Villalba. 2003. Avaliação da composição e do perfil de ácidos graxos do leite de vaca cru e pasteurizado em minilaticínios. *Acta Sci. Anim. Sci.* 25:331–337. doi:10.4025/actascianimsci.v25i2.2019.
- Stahl, W., and H. Sies. 2003. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol. Aspects Med.* 24:345–351. doi:10.1016/S0098-2997(03)00030-X.
- Sumon, S.M.M.R., M.G. Haider, M.A. Islam, S.H. M F Siddiki, and M.R. Karim. 2018. Prevalence and antibiogram profile of staphylococcus aureus isolated from milk samples of lactating cows with subclinical mastitis in Gazipur, Bangladesh. *Annu. Bangladesh Agric.* 22:51–60.
- Tanaka, K. 2005. Occurrence of conjugated linoleic acid in ruminant products and its physiological functions. *Anim. Sci. J.* 76:291–303. doi:10.1111/j.1740-0929.2005.00268.x.

- Toda, S., S. Aoki, K. Uchihashi, A. Matsunobu, M. Yamamoto, A. Ootani, F. Yamasaki, E. Koike, and H. Sugihara. 2011. Culture models for studying thyroid biology and disorders. *ISRN Endocrinol.* 2011:1–9. doi:10.5402/2011/275782.
- Tomazi, T., G. Freu, B.G. Alves, A.F. de Souza Filho, M.B. Heinemann, and M.V. dos Santos. 2019. Genotyping and antimicrobial resistance of *Streptococcus uberis* isolated from bovine clinical mastitis. *PLoS One* 14:1–15. doi:10.1371/journal.pone.0223719.
- Tomazi, T., and M.V. dos Santos. 2020. Antimicrobial use for treatment of clinical mastitis in dairy herds from Brazil and its association with herd-level descriptors. *Prev. Vet. Med.* 176:104937. doi:10.1016/j.prevetmed.2020.104937.
- Tsen, S.Y., J. Siew, E.K.L. Lau, F. Afiqah Bte Roslee, H.M. Chan, and W.M. Loke. 2014. Cow's milk as a dietary source of equol and phenolic antioxidants: Differential distribution in the milk aqueous and lipid fractions. *Dairy Sci. Technol.* 94:625–632. doi:10.1007/s13594-014-0183-4.
- Tuinier, R., and C.G. De Kruif. 2002. Stability of casein micelles in milk. *J. Chem. Phys.* 117:1290–1295. doi:10.1063/1.1484379.
- Urrutia, N., R. Bomberger, C. Matamoros, and K.J. Harvatine. 2019. Effect of dietary supplementation of sodium acetate and calcium butyrate on milk fat synthesis in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 102:5172–5181. doi:10.3168/jds.2018-16024.
- Vaisman, M., D. Rosenthal, and D.P. Carvalho. 2004. Enzimas envolvidas na organificação tireoideana do iodo. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 48:9–15. doi:10.1590/s0004-27302004000100003.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, M.M.T.J. (2007) F. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39:44–84.
- Vázquez, C.V., M.G.V. Rojas, C.A. Ramírez, J.L. Chávez-Servín, T. García-Gasca, R.A. Ferriz Martínez, O.P. García, J.L. Rosado, C.M. López-Sabater, A.I. Castellote, H.M.A. Montemayor, and K. De La Torre Carbot. 2015. Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin-Ciocalteu method. *Food Chem.* 176:480–486. doi:10.1016/j.foodchem.2014.12.050.
- Venturi, S., and M. Venturi. 2014. Iodine, PUFAs and iodolipids in health and diseases: An evolutionary perspective. *Hum. Evol.* 29:185–205.
- Visentainer, J.V., M.R.B. Franco, and N.E. Souza. 2012. Ácidos Graxos Em Óleos e Gorduras: Identificação e Queantificação. EDUEM. Maringá.
- Wada, O. 2004. What are Trace Elements ? — Their deficiency and excess states. *Jpn Med Assoc J* 47:351.
- Weiss, W.P. 2012. Use of a corn milling product in diets for dairy cows to alleviate milk fat depression. *J. Dairy Sci.* 95:2081–2090. doi:10.3168/jds.2011-5026.
- Who/Unicef. 2007. Iodine deficiency in Europe - A continuing public health problem. *World Heal. Organ. - UNICEF* 283:3–86.
- Who. 2018. Antibiotic Resistance. Accessed December, 2019. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>.
- Wojcik, M., I. Burzynska-Pedziwiatr, and L. Wozniak. 2010. A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. *Curr. Med. Chem.* 17:3262–3288. doi:10.2174/092986710792231950.
- Woolpert, M.E., H.M. Dann, K.W. Cotanch, C. Melilli, L.E. Chase, R.J. Grant, and D.M. Barbano. 2016. Management, nutrition, and lactation performance are related to bulk tank milk de novo fatty acid concentration on northeastern US dairy farms. *J. Dairy Sci.* 99:8486–8497. doi:10.3168/jds.2016-10998.

- Yahfoufi, N., N. Alsadi, M. Jambi, and C. Matar. 2018. The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients* 10:1–23. doi:10.3390/nu10111618.
- Yang, Y., N. Zheng, X. Zhao, Y. Zhang, R. Han, J. Yang, S. Zhao, S. Li, T. Guo, C. Zang, and J. Wang. 2016. Metabolomic biomarkers identify differences in milk produced by Holstein cows and other minor dairy animals. *J. Proteomics* 136:174–182. doi:10.1016/j.jprot.2015.12.031.
- Yazdanparast, R., and A. Ardestani. 2007. In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of *Cyperus rotundus*. *J. Med. Food* 10:667–674. doi:10.1089/jmf.2006.090.
- Ye, A. 2011. Functional properties of milk protein concentrates: Emulsifying properties, adsorption and stability of emulsions. *Int. Dairy J.* 21:14–20. doi:10.1016/j.idairyj.2010.07.005.
- Young, A.J., and G.L. Lowe. 2018. Carotenoids—antioxidant properties. *Antioxidants* 7:10–13. doi:10.3390/antiox7020028.

III OBJETIVOS

Objetivos Gerais:

Diagnosticar em propriedades leiteiras fatores que influenciam a qualidade do leite com o propósito de buscar um leite naturalmente enriquecido com compostos nutracêuticos, principalmente, como os ácidos graxos da família dos ômega 3, ômega 6, e ácido linoleico conjugado (CLA) e os polifenóis como antioxidantes. Conseqüentemente, identificar sistemas de produção com os melhores componentes físico-químicos do leite, além de compreender as fontes e fatores de contaminação do leite com iodo por práticas higiênicas-sanitárias realizadas no processo diário da produção de leite, além da contaminação por antimicrobianos.

Objetivos específicos:

Capítulo IV: Estudar e avaliar a influência do uso de soluções com iodo no *pré-dipping* e no *pós-dipping* sobre a concentração de iodo no leite e na urina e sobre os níveis séricos dos hormônios tireoidianos.

Capítulo V: Conhecer a concentração de iodo no leite produzido em algumas propriedades leiteiras em diferentes regiões do estado do Paraná, avaliar os fatores que contribuem com as concentrações de iodo no leite cru armazenado nessas propriedades rurais e avaliar a qualidade do leite em relação aos componentes químicos, antioxidantes e ácidos graxos.

Capítulo VI: Investigar a existência de contaminação do leite por resíduos de antimicrobianos. Identificar e quantificar esses resíduos e detectar a fonte de origem da contaminação do leite.

IV – Alteração da concentração de iodo do leite, por uso de agentes iodados durante a ordenha

Change in the iodine concentration in milk by using iodized agents during milking

(Journal of Dairy Science)

RESUMO

Objetivou com este estudo avaliar e estudar o uso de soluções com iodo no *pré-dipping* e *pós-dipping* na concentração de iodo no leite, urina e sobre os níveis séricos dos hormônios tireoidianos de vacas da raça Holandês. A pesquisa foi realizada na Fazenda experimental da Universidade Estadual de Maringá, em quadrado latino 4x4, com quatro vacas multíparas, produzindo média de 18 kg de leite, em sistema *tie-stall*. As soluções experimentais foram: clorexidina (controle), 0,5%; 1% e 2% de iodo. O iodo do leite, das dietas e da urina foram analisados por extração ácida, seguindo de oxirredução entre Ce^{4+} e AS^{3+} e a leitura realizada em microplaca – ELISA. As análises dos hormônios séricos T3 e T4 foram realizadas por *kit* comercial e analisados através de imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência. A composição do leite foi analisada por absorção diferencial de ondas infravermelhas e a CCS por citometria de fluxo. A análise estatística foi realizada no programa SAS, usando o modelo misto (PROC MIXED) por meio de análise de regressão, mas o (PROC CORR) com 5% de significância. Observou-se que houve diferença linear quando se usou de diferentes concentrações de iodo na solução no *pré* e *pós-dipping* no leite. Não houve diferença para urina e hormônios séricos T3 e T4. Houve correlação positiva entre o iodo da dieta com o do leite. O uso de iodo na solução *pré* e *pós-dipping* influencia na concentração de iodo do leite. Já o perfil dos hormônios, excreção de iodo pela urina e a composição química do leite não foram afetados pelos níveis de iodo das soluções desinfetantes.

Palavras-chave: Ordenha, *pré-dipping*, hormônios tireoidianos, urina, composição do leite

ABSTRACT

The aimed of this study was to evaluate and study the use of iodine solutions in pre-dipping and post-dipping in the iodine concentration in milk, urine and on the thyroid hormones serum levels in Holstein cows. The research was carried out at the experimental farm of the State University of Maringá, in a Latin square 4x4, with four multiparous cows, producing an average of 18kg of milk, in a tie-stall system. Iodine from milk, food and urine were analyzed by acid extraction, followed by oxi-reduction between Ce^{4+} and AS^{3+} and the reading performed on a microplate - ELISA. The analysis of serum hormones T3 and T4 were performed by a commercial kit and analyzed using microparticle immunoassay by chemiluminescence. The milk composition was analyzed by differential absorption of infrared waves and CCS by flow cytometry. Statistical analysis was performed in the SAS program, using the mixed model (PROC MIXED) by means of regression analysis, but the (PROC CORR) with 5% significance. It was observed that there was a linear difference when using different iodine concentrations in the solution in the pre and post-dipping in milk. There was no difference for urine and serum hormones T3 and T4. There was a positive correlation between food iodine and milk, however it was not linear. The use of iodine in the pre- and post-dipping solution

influences the iodine concentration in milk. The hormone profile, iodine excretion status in urine and the milk chemical composition were not affected by the iodine levels of disinfectant solutions.

Keywords: Milking, pre-dipping, thyroid hormones, urine, milk composition.

INTRODUÇÃO

O agronegócio tem grande importância econômico-social no Brasil (Bánkuti et al., 2017). O mercado do leite e derivados é abastecido por uma extensa e complexa cadeia de valor que gerou a cerca de R\$ 67 bilhões de reais em 2017. Presente em, 99% dos municípios brasileiros, em 2019, a produção brasileira de leite inspecionado foi de 24,4 bilhões de litros (IBGE, 2019; Embrapa 2019). A produção de leite cresceu 78% nos últimos cinco anos e empregou mais de 4 milhões de trabalhadores rurais e pouco mais de 1,3 milhões de produtores (Embrapa, 2019).

A busca pelo aumento da produtividade animal e atendimento das exigências sanitárias no Brasil, tem demandado aos produtores de leite a adoção de rígidos controles no sistema de produção e em seus animais, especialmente, em relação à saúde da glândula mamária (Izquierdo et al., 2017).

A baixa qualidade do leite tem sido correlacionada com falhas nas práticas de higiene no processo de ordenha (Vissers and Driehuis, 2009; Picinin et al., 2019). Assim, a busca pela adequação sanitária tem contribuído com o aumento na utilização de soluções desinfetantes, com o objeto de prevenir e reduzir a ocorrência de mastite em vacas leiteiras.

Neste sentido, a assepsia do teto com soluções à base de iodo é bastante comum e tem, de fato sido apontada como prática que reduz a ocorrência de mastite (Rasmussen and Petersson, 1991; Galton 2004; Ouattara 2013). Contudo, o iodo pode ser um problema se estiver presente em concentrações elevadas (Castro et al., 2012; USDA, 2015).

A exposição ou ingestão de iodo fora dos limites pode ser aceita pelo organismo, contudo, alguns indivíduos apresentam ser mais suscetíveis, dentre eles os que possuem

alguma doença na tireoide, pacientes com fatores de risco, idosos, crianças, fetos e recém-nascidos pode desenvolver disfunção induzida por iodo, como hipotireoidismo ou hipertireoidismo (Leung and Braverman, 2014).

O'brien et al. (2013) relataram que os efeitos da desinfecção dos tetos com soluções com diferentes concentrações de iodo e da suplementação com iodo na dieta de vacas leiteiras influenciam a concentração deste mineral no leite. Na urina, o iodo tem sido utilizado como indicador de ingestão de iodo (Who/Unicef, 2007).

O iodo desempenha importante função no metabolismo e está ligado diretamente à formação dos hormônios da tireoide que tem papel fundamental no metabolismo dos macronutrientes, como também no desenvolvimento de vários órgãos e crescimento e síntese hormonal dos hormônios T3 e T4 da tireoide (Diaz González, 2001).

Diante disso, buscou-se avaliar, o uso de soluções com iodo no *pré-dipping* e no *pós-dipping* sobre a concentração de iodo no leite e na urina e sobre os níveis séricos dos hormônios tiroidianos, a composição do leite e CCS.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e Experimento:

O experimento foi realizado no setor de bovinocultura leiteira na Fazenda Experimental de Iguatemi - FEI da Universidade Estadual de Maringá, localizada a 550 m de altitude na Latitude 23° 25' 0.0" S e longitude 51 ° 57' 0.0", com média anual de pluviosidade de 1297 mm. A proposta experimental foi submetida à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) e foi aprovada e protocolada sob o CEUA nº 5899220217.

Animais e Delineamento experimental

Os animais utilizados no protocolo experimental foram quatro vacas multíparas, da raça Holandês pesando aproximadamente 566±64 kg, com aproximadamente 120±20

dias de lactação e lactação média de 18 kg. Os animais foram alojados no sistema “*tie-stall*” em baias individuais. O manejo de ordenha foi realizado duas vezes ao dia, sendo a primeira ordenhas as 6 horas e a segunda as 15 horas.

A dieta das vacas foi ajustada de segundo o (NRC, 2001) em uma dieta total misturada na proporção 60:40, composta por silagem de milho e ração concentrada à base de milho, farelo de soja, trigoilho, premix vitamínico e mineral (5%) (Tabela 1).

Tabela 1: Dieta total misturada.

Ingredientes	(g/kg de MS)
Silagem de milho	600,0
Milho moído	202,8
Farelo de soja	165,2
Melaço Pó	5,0
Suplemento mineral e vitamínico	22,0
Calcário	5,0
Nutrientes	
Matéria seca (g/kg de MN)	453,0
Matéria orgânica (g/kg de MS)	934,0
Proteína bruta (g/kg de MS)	145,0
Extrato etéreo (g/kg de MS)	27,80
Fibra em detergente neutro (g/kg de MS)	332,0
Carboidratos não fibrosos (g/kg de MS)	427,0
Nutrientes digestíveis totais (g/kg de MS)	694,0
Iodo da silagem de milho (mg/kg de MS)	30,88
Iodo do concentrado (mg/kg de MS)	39,01

Os animais foram distribuídos aleatoriamente de acordo com os tratamentos (concentração de iodo no *pré-dipping* e *pós-dipping*), em um quadrado latino 4x4 com quatro períodos de 21 dias e 14 dias de adaptação. Os tratamentos foram: 0,5%; 1%; 2% de iodo, respectivamente e controle com clorexidina (Prima Contact®; G3

Química. Lajeado/RS – Brasil), as concentrações de 0,5% e 1% de iodo foram baseadas nos produtos comerciais vendidos no mercado e 2% valor extrapolado.

Os sanitizantes de 0,5%, 1% e 2% foram preparados a partir de uma solução de iodo 10% Vansil® (Vansil Saúde Animal; Descalvado – Sp), composição: iodo (9,75g) + iodeto de potássio (2,20g) + glicerina bi-destilada (Zafalon et al., 2008).

No manejo de ordenha, os tetos das vacas foram lavados com água corrente e secados com papel toalha somente quando estavam sujos de barro. O teste de mastite clínica foi realizado com o uso da caneca de fundo preto e a antissepsia “*pré-dipping*” realizada com os respectivos tratamentos experimentais com o auxílio de um aplicador tipo copo, em que o teto foi imerso por completo na solução desinfetante e após 30 s foi feita a remoção do excesso de produto com o uso do papel toalha (Zafalon et al., 2008).

Após o manejo de higienização dos tetos, o conjunto de teteiras foi acoplado para a completa e ininterrupta retirada do leite. Após a ordenha, realizou-se o *pós-dipping* com as soluções experimentais com as mesmas concentrações.

Coleta de alimentos e análise de alimentos

As amostras de silagem e ração concentrada foram coletadas no dia 17 do período experimental em uma coleta homogênea, resultando em uma única amostra por animal/tratamento/período.

Esta amostra foi congelada em ultra freezer -80°C para posterior análise bromatológica e de iodo (AOAC, 1990). As amostras de concentrados, silagem de milho e sobras foram analisadas quanto aos teores de matéria seca, matéria inorgânica, nitrogênio total proteína bruta, extrato etéreo, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido (AOAC, 1990).

A concentração de iodo das amostras de alimentos foi determinado baseado na técnica de Sandell and Kolthoff (1937), por meio de extração ácida seguindo de uma reação de oxirredução entre Ce^{4+} e AS^{3+} fundamentada na metodologia de Hedayati et al. (2007).

Coleta e análise de sangue

O sangue foi coletado em duplicata em tubos Vacutainer® de 10 mL, contendo heparina (Vaculplast® Cotia/SP – Brasil) no dia 19 do período experimental. Para a separação do plasma o sangue foi centrifugado 3000 rpm por 10 minutos a 15°C armazenado em eppendorf e congelados a -80°C para análise de T3 e T4 total (Schöne and Rajendram, 2009). As análises de T3 e T4 foram realizadas usando *kit* comercial (Architect Total T3 e Architect Total T4, Abbott Laboratories® (Abbott Laboratórios Do Brasil LTDA; Cidade Monções - São Paulo/SP- Brasil) para análise de imunoenensaio de micropartículas por quimioluminescência (Refsal et al., 1984; Schöne et al., 2009).

Coleta e análise de urina

Foram coletadas 150 mL de urina de cada vaca no 20º dia de cada período para análise de iodo. As amostras foram congeladas em freezer -18°C para serem analisadas posteriormente (Moxon and Dixon, 1980; Mehdi Hedayati et al., 2007).

Para a análise, as amostras de urina foram descongeladas em banho-maria em uma temperatura entre 36°C a 38°C. e em seguida o iodo foi determinado por meio de extração ácida seguindo de uma reação de oxirredução entre Ce^{4+} e AS^{3+} baseada na metodologia de Ohashi et al. (2000).

Coleta e análise do leite

As amostras de leite foram coletadas por meio de uma amostra composta com o leite colhidos dos últimos 3 dias (19 a 21) para análise de iodo, de composição química e CCS.

O leite foi coletado de cada animal em frascos de 100 mL, em cada amostra por animal/tratamento/período para a análise de iodo, composição e CCS e a amostra composta foi congelada em ultra freezer a -80°C . Para análise de composição química do leite, o mesmo foi armazenado em frascos contendo conservante bronopol.

Para a análise, as amostras de leite foram descongeladas em banho-maria em uma temperatura entre 36°C a 38°C . Em seguida o iodo foi determinado por meio de extração ácida seguindo de uma reação de oxirredução entre Ce^{4+} e AS^{3+} baseada na metodologia de Hedayati et al. (2007) com modificações, em que a solução de digestão foi substituída por ácido nítrico e a temperatura máxima do bloco foi de 150°C .

Uma alíquota de $50\ \mu\text{l}$ de amostra de leite cru foi adicionada em tubos de digestão, com dimensões de $25 \times 250\ \text{mm}$ mais $2000\ \mu\text{l}$ de HNO_3 , após os tubos serem tampados, eles foram colocados no bloco digestor e a temperatura foi elevada a cada 50°C e permanecendo por 30 minutos em aquecimento até completar 150°C , deste modo continuando então por 1 hora em digestão. Ao finalizar o processo de digestão, por segurança as amostras ficaram arrefecendo na capela.

Em seguida, para a reação de oxirredução, $50\ \mu\text{l}$ da solução digerida foi adicionada nos poços de microtitulação em placas de poliestireno com 96 poços em quadriplicada. Mais $100\ \mu\text{l}$ de ácido arsenioso foi adicionado e por último $50\ \mu\text{l}$ de solução de amônio cério com auxílio de uma pipeta multicanal foi rapidamente adicionado.

As amostras foram lidas em $405\ \text{nm}$ após 20 min de incubação em um leitor de microplaca (Molecular devices – Versa max, tunnable, LabCommerce, INC. TM; San Jose, CA- EUA).

A curva de calibração foi preparada a partir de uma solução estoque de $1000\ \mu\text{g/mL}$ de iodeto de potássio (IK) com concentrações: zero; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e $1\ \mu\text{g/mL}$, respectivamente, e o branco foi água ultrapura Milli-Q (Ohashi et al., 2000;

Hedayati et al., 2007; Benkhedda et al., 2009). O coeficiente de linearidade para a regressão das médias logarítmicas de absorvância entre o ponto zero e 1 µg/mL foi de $R^2 = 0,9941$. E o limite de detecção calculado pela equação $LD = DP \cdot 3 / \text{inclinação da curva}$ foi de 0,12 µg/mL (Ohashi et al., 2000; Sobrinho et al., 2008).

A coleta de leite para a análise química e CCS foi realizada em frascos de 40 mL contendo conservante Bronopol formando uma amostra composta representativa a produção diária.

Os teores de gordura, proteína, lactose e extrato seco desengordurado (ESD) e nitrogênio-ureico foram determinadas por espectrofotômetro (Bentley 2000; Bentley Instrument, Inc., Chaska, MN, EUA) e a contagem de células somáticas foi obtida por meio de um contador eletrônico (Somacount 500®, Chaska, MN, EUA) (Voltolini et al., 2001), realizados pelo laboratório de controle leiteiro da Associação Paranaense dos Criadores de Rebanho Bovino da Raça Holandesa, localizado em Curitiba, PR.

Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi um quadrado latino 4 x 4, composto por 4 vacas, 4 períodos e 4 níveis de iodo em solução pré-dipping e pós-dipping.

As variáveis avaliadas foram submetidas à análise de variância segundo modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + T_j + \beta_j + e_{ijk},$$

em que: Y_{ijk} = variáveis observadas, μ = média geral; α_i = efeito do animal i , variando de 1 a 4; T_j = efeito do período j , variando de 1 a 4; β_j = efeito dos níveis de iodo (produto) k , variando de 1 a 4; e_{ijk} = erro aleatório.

Todos os efeitos foram considerados fixos, exceto o efeito de animal que foi aleatório. As diferenças entre as médias dos tratamentos foram determinadas pelo teste de Tukey considerando ($\alpha = 0,05$) de significância.

A concentração de iodo no leite, urina e hormônios tireoidianos T3 e T4 foram avaliadas usando o modelo misto (proc MIXED), por meio de análises de regressão linear ($\alpha = 0,05$). Já a relação do iodo dos alimentos e os parâmetros sanguíneos, do leite e urina foram correlacionados com o pacote (proc corr), ambas análises foram realizadas com o auxílio do programa SAS (Statistical Analysis System, versão 9.2. - 2013) (SAS/STAT software: changes and enhancements, 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de desinfetante na antisepsia dos tetos à base de iodo em diferentes concentrações, apresentaram efeito linear para o tratamento *pré* e *pós-dipping* com a concentração de iodo do leite ($P = 0,002$) (Tabela 2).

Esse efeito pode ser visualizado pelo modelo da regressão linear:

$$[\text{Iodo}] = 0,11991 * \text{NIV} + 0,34068,$$

À medida que aumenta a concentração de iodo no desinfetante do tratamento *pré* e *pós-dipping* (0, 0,5, 1 e 2%) o mesmo efeito 368,9; 400,5; 444,4, 604,2 $\mu\text{g/L}$ ($P < 0,05$) ocorre no leite, respectivamente (Tabela 2).

Esta prática tem sido apontada como fator de aumento na concentração de iodo no leite, tanto por contaminação direta, quanto por absorção pelo epitélio dos tetos (Flachowsky et al., 2007; Galton, 2004; O'Brien and Jordan, 2013). O que pode ter ocorrido no presente estudo, uma vez que esse, efeito foi visível pela dissipação da cor amarela na pele dos tetos da vaca.

A mesma evidência foi observada por Flachowsky et al. (2014) que concluíram que o modo primário de absorção de iodo, parece ser pela pele. Ainda, Nesvadbova et al. (2015) relatam que a absorção de iodo pela pele acontece 12% por meio de contato direto. Do mesmo modo, Abraham (2008) também observou que uma parte do iodo evapora e o restante que permanece em contato com a pele penetra de forma gradual.

A explicação fisiológica da absorção de iodo pela pele é a transferência do iodo pelo Symporter NIS para a glândula mamária, e é translocado para o leite para desempenhar o papel na síntese de hormônio da tireoide da cria (Dohán et al., 2003; Miot et al., 2015; Ravera et al., 2017).

Tabela 2: Concentração de iodo no leite e na urina e concentração dos hormônios T3 e T4 de vacas da raça Holandês submetidas a *pré* e *pós-dipping* com sanitizantes contendo níveis diferentes de iodo.

Amostras	Níveis de iodo no <i>pré</i> e <i>pós-dipping</i>					Efeito <i>P</i>		
	0%	0,5%	1%	2%	EPM	Nível	Linear	Quadrático
Leite ($\mu\text{g/L}$)	368,9	400,5	444,4	604,2	0,312	0,013	0,002	0,353
Urina ($\mu\text{g/L}$)	593,4	634,4	660,1	572,5	0,057	0,842	0,793	0,425
¹ T3 (ng/dL)	69,93	66,65	71,75	64,31	3,187	0,843	0,623	0,721
² T4 ($\mu\text{g/dL}$)	3,60	3,40	3,64	3,20	0,141	0,637	0,373	0,664

¹ Triiodotironina total, ² tiroxina total. Resultados $P < 0,05$ diferem pelo teste de Tukey a 0,05%.

O aumento de iodo no leite foi 35% superior quando se fez uso da solução desinfetante de 1% comparado com a de 2%, pois variou de 444,4 para 604,2 $\mu\text{g/L}$ de iodo, (Tabela 2).

Essa mesma tendência de adesão à pele foi observado por Castro et al. (2012) quando avaliaram o uso de diferentes concentrações de iodo aplicado com copo e *spray*, pois quando o teto foi imerso na solução 1% em copo (dip) os níveis de iodo foram (360 $\mu\text{g/kg}$) uma vez que quando utilizaram a solução em *spray* à concentração de iodo no leite foi superior (409 $\mu\text{g/kg}$), os autores concluíram que a solução em *spray* abrange uma maior área do úbere e predispõe a contaminação direta do leite, quando comparado com o copo que tem contato somente com a pele do teto.

Todavia, Rasmussen and Petersson (1991) também sugeriram que o resíduo de iodo no leite é pela contaminação com a superfície do teto e não da absorção da pele, pois quando os tetos foram limpos com toalha o aumento de iodo no leite foi insignificante. Entretanto, o manejo de *pré-dipping* incluindo o uso de toalhas se mostrou eficiente tanto para a qualidade do leite, quanto para evitar contaminação direta por iodo.

Resultados semelhantes foram observados por French et al. (2016) que avaliaram diferentes tipos de aplicadores (dip, barreira e spray) juntamente com o uso de desinfetantes com diferentes concentrações de iodo (0, 0,25% e 0,50%) e concluíram que houve aumento de 20 ± 7 $\mu\text{g/L}$ de iodo na concentração do leite quando usaram as fórmulas, no mesmo trabalho a forma de aplicação da solução no teto, teve efeito na concentração de iodo no leite pois à aplicação com *spray* aumentou a concentração em relação ao procedimento realizado com o copo.

A concentração de iodo do *pré-dipping* influenciou a concentração de iodo do leite neste trabalho, o mesmo foi observado por Flachowsky et al. (2007) que concluíram que o uso de iodo no *pré-dipping* contribui essencialmente para a concentração deste elemento no leite, sobretudo a transferência de iodo do desinfetante, para teta e para o leite, depende do conteúdo do desinfetante, da produção de leite e da frequência de imersão do teto.

A contaminação de leite por iodo relacionada com práticas de manejo alimentar tem sido estudada em outros países como o Canadá e a Suíça e os autores observaram que as concentrações de iodo nas amostras variaram de 54 a 1.902 $\mu\text{g/kg}$ de leite (Castro et al., 2010; Reijden et al., 2018).

A concentração de iodo na urina não foi afetada pelo *pré* e *pós-dipping* com diferentes concentrações de iodo ($P > 0,05$) (Tabela 2). O iodo na urina tem sido utilizado como indicador para monitorar o *status* de iodo dietético (Zaralis, 2015).

A participação do iodo no organismo está ligada a formação dos hormônios tireoidianos, e, por isso podem interferir na síntese metabólica do T3 e T4, contudo os as concentrações estudadas e a absorção do iodo via cutânea não influenciou a concentração sanguínea de T3 e T4 ($P = 0,843$, $P = 0,637$), respectivamente. Resultados semelhantes foram observados por Castro et al. (2012), em que não houve efeito do tratamento *pré e pós-dipping* nos teores de tiroxina (T4) no dia 1 de tratamento e no dia 19.

Houve correlação positiva entre o iodo dos alimentos com o do leite $0,636 \times 0,008$ (Tabela 3). A excreção de iodo no leite aumentou com o aumento de iodo na dieta, mas não linearmente, pois a glândula mamária atua como um regulador biológico. A quantidade de iodo total na dieta experimental foi 69 mg/kg de MS. De acordo com NRC (2001) a dieta estava com 13,8% de iodo acima das exigências. Com as demais variáveis estudadas, não houve correlação.

Aproximadamente, 70-80% do iodo na dieta são absorvidos diretamente pelo rúmen e 10% no abomaso, 30% são excretados nas fezes e 40% são excretados na urina. Estima-se também que a transferência de iodo da dieta para o leite é na ordem de 10 a 40%, dependendo da quantidade de iodo no alimento consumido pelo animal (Kaufmann, 1998).

Tabela 3: Correlação entre o iodo dos alimentos da dieta com o do leite, urina, T3 e T4

	N	Média	DP	Mínimo	Máximo	Correlação de Pearson	
Alimento (mg/kg MS)	16	36,97	8,13	30,85	50,39		
Leite ($\mu\text{g/L}$)	16	0,5	0,14	0,25	0,88	A x L	$0,636 \times 0,008$
Urina ($\mu\text{g/L}$)	16	0,61	0,2	0,39	1,1	A x U	$-0,100 \times 0,711$
¹ T4 ($\mu\text{g/dL}$)	16	68,15	9,42	51,41	81,38	A x T4	$-0,218 \times 0,415$
² T3 (ng/dL)	16	34,6	0,53	2,58	4,66	A x T3	$-0,273 \times 0,305$

¹ Triiodotironina total, ² tiroxina total.

Do mesmo modo, resultados observados por Weiss et al. (2015) quando alimentaram vacas com farelo de canola mostraram que houve redução da concentração

de iodo no leite, porém, a concentração sérica de iodo aumentou linearmente. Provavelmente, o aumento sérico foi causado pela transferência reduzida de iodo para o leite e outros órgãos, como a tireoide, concluíram os autores.

Alguns alimentos causam esse efeito de transferência reduzida de iodo, pois apresentam em sua composição substâncias goitrogênicas que inibem a ligação de iodo na proteína precursora dos hormônios (tireoglobulina), reduzindo a concentração hormonal e de iodo no leite (Efsa, 2014).

Resultados semelhantes foram vistos por Antaya et al. (2015) que avaliaram macroalgas (*Ascophyllum nodosum*) na dieta de vacas leiteiras e observaram que a concentração de iodo no leite aumentou a ponto de ser tóxicos para seres humanos.

Semelhante ao exposto neste trabalho, O'Brien and Jord (2013) avaliaram os efeitos da suplementação com iodo na dieta de vacas leiteiras e da desinfecção dos tetos com soluções contendo diferentes concentrações de iodo sobre a concentração de iodo no leite. Foi observado que tanto a suplementação quanto a desinfecção dos tetos influenciam na concentração deste mineral no leite. Os autores relataram aumento considerável na concentração de iodo no leite passando de 217 µg/kg no grupo de animais que não houve suplementação e desinfecção dos tetos para >1.000 µg/kg no grupo de animais suplementados e com desinfecção dos tetos com solução de iodo.

Limites de tolerância mais altos foram propostos pelo Instituto de medicina para crianças e adolescentes, entre de 200 a 600 µg/dia, adultos e gestantes 1,100 µg/dia (Institute of Medicine, 2001; Flachowsky et al., 2007; EFSA, 2014). Dessa forma, considerando a ingestão de leite nas dietas normais dificilmente forneceria mais de 1 mg de iodo por dia (Institute of Medicine, 2001).

Mediante ao exposto, os resultados deste trabalho contribuem para reforçar que medidas de prevenção de contaminação do leite no momento da ordenha devem ser

tomadas. Assim, uma das recomendações é manter os níveis de 0,5% de iodo no *pós-dipping* tanto para efetiva desinfecção quanto para prevenção de contaminação (Castro et al., 2012). Ainda, deve-se manter a suplementação de acordo com as doses diárias (50 mg/kg de MS) recomendadas para que tenha menor efeito sobre o leite (NRC, 2001)

Para as variáveis: proteína, gordura, lactose, Nitrogênio ureico no leite e CCS não foi encontrado efeito significativo ($P > 0,05$) com a concentração de iodo (Tabela 4).

Tabela 4 – Porcentagem de proteína, gordura, lactose, nitrogênio ureico do leite, contagem de células somáticas em amostras de leite de vacas da raça Holandês, submetidas a *pré* e *pós-dipping* com sanitizante contendo níveis diferente de iodo.

Variáveis	Tratamentos				P
	0%	0,50%	1%	2%	
Proteína (%)	3,3	4,1	4,1	3,0	0,29
Gordura (%)	3,3	3,4	3,6	3,2	0,45
Lactose (%)	4,8	4,4	4,3	4,5	0,11
Nitrogênio Ureico do leite (mg/dL)	12,1	13,4	12,2	13,2	0,77
CCS - Log10 (CS/mL)	2,07	2,39	2,76	2,27	0,71

* $P > 0,05$ não apresenta diferença significativa.

Observado que a utilização de sanitizantes até a concentração de 2% de iodo no *pré* e *pós-dipping* não influenciou a concentração de gordura, proteína, lactose, nitrogênio ureico do leite (NUL) e a CCS do leite ($P > 0,05$).

Os valores de gordura, proteína, lactose e CCS apresentaram resultados dentro do padrão exigido pela legislação vigente (Brasil, 2018) e os resultados de NUL, que variaram de 12,1 à 13,2 mg/dL podem ser relacionados aos valores de proteínas, pois são correlacionados (Cabral et al., 2016). De acordo com Silva et al., (2019) valores de NUL no leite entre 11 mg/dL e 18 mg/dL se mantêm adequados.

Resultados semelhantes foram obtidos por Castro et al. (2012) que verificaram que não houve efeito do uso de iodo do tratamento *pré* e *pós-dipping* nos níveis de gordura, proteína ($P = 0,76$ e $0,99$) e CCS do leite ($P = 0,53$). O mesmo resultado foi obtido por Grace and Waghorn, (2004) que também, não observaram diferença ($P > 0,05$) na composição do leite, gordura e proteína com a suplementação com iodo injetável.

CONCLUSÃO

O uso de iodo na solução desinfetante empregado no *pré* e *pós-dipping* de vacas da raça Holandês influenciou a concentração de iodo do leite. Mas, não afetou o nível dos hormônios T3 e T4, a excreção de iodo pela urina e a composição química do leite e CCS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antaya, N.T., K.J. Soder, J. Kraft, N.L. Whitehouse, N.E. Guindon, P.S. Erickson, A.B. Conroy, and A.F. Brito. 2015. Incremental amounts of *Ascophyllum nodosum* meal do not improve animal performance but do increase milk iodine output in early lactation dairy cows fed high-forage diets¹. *J. Dairy Sci.* 98:1991–2004. doi:10.3168/jds.2014-8851.
- Bánkuti, F.I., M.M. Caldas, S.M.S. Bánkuti, and G. Granco. 2017. Spatial dynamics: A new milk corridor in Paraná state, Brazil. *Semin. Agrar.* 38:2107–2117. doi:10.5433/1679-0359.2017v38n4p2107.
- Benkhedda, K., A. Robichaud, S. Turcotte, F.J. Béraldin, and K.A. Cockell. 2009. Determination of total iodine in food samples using inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 92:1720–1727.
- Brasil. 2018. Instrução Normativa No 76, de 26 de novembro de 2018 o. Ministério Da Agric. E Abast. - MAPA 230:9.
- Cabral, J.F., M.A.P. da Silva, T.S. Carvalho, R.B. Brasi1, J.C. Garcia, and L.E.C. do Nascimento. 2016. Relação da composição química do leite com o nível de produção, estágio de lactação e ordem de parição de vacas mestiças. *Rev. do Inst. Laticínios Cândido Tostes* 71:244–255. doi:10.14295/2238-6416.v71i4.536.
- Castro, S. B., Lacasse, P., Fouquet, A., Beraldin, F., Robichaud, A., & Berthiaume, R. 2010. Iodine concentration in milk sampled from canadian farms. *J. Food Prot.* 73:1658–1663. doi:10.4315/0362-028X-73.9.1658.
- Castro, S. B., Berthiaume, R., Robichaud, A., & Lacasse, P. (2012). Effects of iodine intake and teat-dipping practices on milk iodine concentrations in dairy cows. *Journal of dairy science*, 95-1:213-220.
- Dohán, O., A. De La Vieja, V. Paroder, C. Riedel, M. Artani, M. Reed, C.S. Ginter, and N. Carrasco. 2003. The sodium/iodide symporter (NIS): Characterization, regulation, and medical significance. *Endocr. Rev.* 24:48–77. doi:10.1210/er.2001-0029.
- Efsa. 2014. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for iodine. *EFSA J.* 12:3660. doi:10.2903/j.efsa.2014.3660.

- Embrapa. 2019. Sua excelência, o consumidor: novos produtos e novas estratégias da cadeia do leite para ganhar competitividade e conquistar os clientes finais. *Anu. Leite* 104.
- Flachowsky, G., K. Franke, U. Meyer, M. Leiterer, and F. Schöne. 2014. Influencing factors on iodine content of cow milk. *Eur. J. Nutr.* 53:351–365. doi:10.1007/s00394-013-0597-4.
- Flachowsky, G., F. Schöne, M. Leiterer, D. Bemann, M. Spolders, and P. Lebzien. 2007. Influence of an iodine depletion period and teat dipping on the iodine concentration in serum and milk of cows. *J. Anim. Feed Sci.* 16:18–25. doi:10.22358/jafs/66722/2007.
- French, E.A., M. Mukai, M. Zurakowski, B. Rauch, G. Gioia, J.R. Hillebrandt, M. Henderson, Y.H. Schukken, and T.C. Hemling. 2016. Iodide residues in milk vary between iodine-based teat disinfectants. *J. Food Sci.* 81:T1864–T1870. doi:10.1111/1750-3841.13358.
- Galton, D.M. 2004. Effects of an automatic postmilking teat dipping system on new intramammary infections and iodine in milk. *J. Dairy Sci.* 87:225–231. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73161-6.
- Diaz Gonzalez, F. H. (2001). *Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo em vacas leiteiras.* Porto Alegre: UFRGS. p. 5-21.
- Grace, N.D., G.C. Waghorn, and G.C. Waghorn. 2004. Impact of iodine supplementation of dairy cows on milk production and iodine concentrations in milk. *N. Z. Vet. J.* 53:10–13. doi:10.1080/00480169.2005.36462.
- Guy E. Abraham, M. 2008. The Bioavailability of Iodine Applied to the Skin. *Orig. Internist* 15:77–79.
- Institute of Medicine (U.S.). Panel on Micronutrients. 2001. *DRI : Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc : A Report of the Panel on Micronutrients ... and the Standing Committee on the Scientific.*
- Izquierdo, A.C., J.E. Guerra Liera, R.E. Cervantes, J.F. Inzunza Castro, E.A. Villa Mancera, R. Huerta Crispin, M. de L. Juarez Mosqueda, A.G. Vazquez, J. Olivares Perez, P.S. Aparicio, and B.E. Rodriguez Denis. 2017. Production of Milk and Bovine Mastitis. *Adv. Dairy Res.* 05:2–5. doi:10.4172/2329-888x.1000174.
- Leung, A., and L. Braverman. 2014. Consequences Of Excess. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10:136–142. doi:10.1038/nrendo.2013.251.Consequences.
- Hedayati, M.A. Ordookhani, A. Maryam Sadat Daneshpour, and F. Azizi. 2007. Rapid Acid Digestion and Simple Microplate Method for Milk Iodine Determination. *J. Clin. Lab. Anal.* 21:286–292. doi:10.1002/jcla.
- Miot, F., C. Dupuy, J. Dumont, and B. Rousset. 2015. Thyroid Hormone Synthesis and Secretion. *Thyroid Dis. Manag.* 1–60.
- Moxon, R.E.D., and E.J. Dixon. 1980. Semi-automatic Method for the Determination of Total Iodine in Food. *Analyst* 105:344–352. doi:10.1039/an9800500344.
- National Research Council (NRC). 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle.* Washington, DC.
- Nesvadbova, M., M. Crosera, G. Maina, and F. Larese Filon. 2015. Povidone iodine skin absorption: An ex-vivo study. *Toxicol. Lett.* 235:155–160. doi:10.1016/j.toxlet.2015.04.004.
- O'Brien, B., D. Gleeson, and K. Jordan. 2013. Iodine concentrations in milk. *Irish J. Agric. Food Res.* 52:209–216.

- Ohashi, T., M. Yamaki, C.S. Pandav, M.G. Karmarkar, and M. Irie. 2000. Simple microplate method for determination of urinary iodine. *Clin. Chem.* 46:529–536.
- Ouattara, L. 2013. Factors Determining the Risk of Iodine Excess in Bulk Milk Tanks on Canadian Dairy Farms.
- Picinin, L.C.A., M.T. Bordignon-Luiz, M.M.O.P. Cerqueira, I.M. Toaldo, F.N. Souza, M.O. Leite, L.M. Fonseca, A.M.Q. Lana, L.C.A. Picinin, M.T. Bordignon-Luiz, M.M.O.P. Cerqueira, I.M. Toaldo, F.N. Souza, M.O. Leite, L.M. Fonseca, and A.M.Q. Lana. 2019. Effect of seasonal conditions and milk management practices on bulk milk quality in Minas Gerais State - Brazil. *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.* 71:1355–1363. doi:10.1590/1678-4162-10063.
- Rasmussen, M.D., D.M. Galton, and L.G. Petersson. 1991. Effects of Premilking Teat Preparation on Spores of Anaerobes, Bacteria, and Iodine Residues in Milk. *J. Dairy Sci.* 74:2472–2478. doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78423-3.
- Ravera, S., A. Reyna-Neyra, G. Ferrandino, L.M. Amzel, and N. Carrasco. 2017. The Sodium/Iodide Symporter (NIS): Molecular Physiology and Preclinical and Clinical Applications. *Annu. Rev. Physiol.* 79:261–289. doi:10.1146/annurev-physiol-022516-034125.
- Refsal, K.R., R.F. Nachreiner, and C.R. Anderson. 1984. Relationship of season, herd, lactation, age, and pregnancy with serum thyroxine and triiodothyronine in holstein cows. *Domest. Anim. Endocrinol.* 1:225–234. doi:10.1016/0739-7240(84)90003-1.
- Sandell, E.B., and I.M. Kolthoff. 1937. Micro determination of iodine by a catalytic method. *Mikrochim. Acta* 1:9–25. doi:10.1007/BF01476194.
- SAS/STAT software: changes and enhancements, release 9. 2. Procedure. 2013. SAS INSTITUTE.
- Schöne, F., M. Leiterer, P. Lebzien, D. Bemann, M. Spolders, and G. Flachowsky. 2009. Iodine concentration of milk in a dose-response study with dairy cows and implications for consumer iodine intake. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 23:84–92. doi:10.1016/j.jtemb.2009.02.004.
- Schöne, F., and R. Rajendram. 2009. In book: *Comprehensive Handbook of Iodine: Nutritional, Biochemical, Pathological and Therapeutic Aspects* Edition: 1st Chapter: Iodine in farm animals Publisher: Academic Press Editors: VR Preedy, GN Burrow, RR Watson
- Silva, T.I. de S., A.J. da S. Macêdo, A. Joelson Netto, E.J.S. Alencar, W.S. Alves, I.T.R. Cavalcante, and S. Gonzaga Neto. 2019. Nitrogênio ureico no leite (NUL) e nitrogênio ureico no plasma (NUP) de vacas leiteiras em pastejo: Revisão. *Pubvet* 14:1–10. doi:10.31533/pubvet.v13n4a314.1-10.
- Sobrinho, T.J. da S.P., C.H.T.P. da Silva, J.E. do Nascimento, J.M. Monteiro, Albuquerque, U.P. De, Amorim, and E.L.C. de Amorim. 2008. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. *Rev. Bras. Ciências Farm. J. Pharm. Sci.* 44:683–689. doi:10.1590/S1516-93322008000400015.
- Usda. 2015. Iodine Livestock. *Tech. Eval. Rep. Compil. by Pestic. Res. Inst. USDA Natl. Org. Progr.* Page 2:1–22.
- van Der Reijden, O.L., V. Galetti, M. Hulmann, A. Krzystek, M. Haldimann, P. Schlegel, E. Manzocchi, J. Berard, M. Kreuzer, M.B. Zimmermann, and I. Herter-Aeberli. 2018. The main determinants of iodine in cows' milk in Switzerland are farm type, season and teat dipping. *Br. J. Nutr.* 119:559–569.
- Vissers, M. M. M. and Driehuis, F. (2009). On-Farm Hygienic Milk Production. In A. Y. Tamime (Ed.), *Milk Processing and Quality Management* (pp. 1-22). Chichester: Wiley-Blackwell doi:10.1017/S0007114517003798.

- Voltolini, T.V., G. Tadeu, M.A. Zambom, N.P. Ribas, E.E. Müller, J.C. Damasceno, L. Carlos, and V. Ítavo. 2001. Influência dos estádios de lactação sobre a contagem de células somáticas do leite de vacas da raça holandesa e identificação de patógenos causadores de mastite no rebanho 961–966.
- Weiss, W.P., D.J. Wyatt, D.H. Kleinschmit, and M.T. Socha. 2015. Effect of including canola meal and supplemental iodine in diets of dairy cows on short-term changes in iodine concentrations in milk. *J. Dairy Sci.* 98:4841–4849. doi:10.3168/jds.2014-9209.
- Who/Unicef. 2007. Iodine deficiency in Europe - A continuing public health problem. *World Heal. Organ. - UNICEF* 283:3–86.
- Zafalon, L.F., C.R. Pozzi, F.P. De Campos, J.R.P. Arcaro, P. Sarmiento, and S.V. Matarazzo. 2008. Boas práticas de ordenha. Embrapa Pecuária Sudeste 49.
- Zaralis, K. 2015. *SOLID Participatory Research from UK : Reducing Antibiotic Use for Mastitis Control in Organic Dairy Farms*. 7th ed.

V - Concentração de iodo no leite cru e seus indicadores em regiões do Estado do Paraná

Iodine concentration in raw milk and its indicators in regions of the Paraná State

(Journal of Dairy Science)

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho quantificar a concentração de iodo, avaliar os compostos antioxidantes e a concentração química em amostras de leite cru de propriedades de três mesorregiões do Estado do Paraná e determinar quais os fatores de manejo podem contribuir com o conteúdo de iodo no leite. As amostras de leite foram coletadas em frascos tipo *falcon* de 50 mL nos tanques de 168 propriedades, junto com as informações de produção, manejo de criação e de ordenha em um questionário previamente elaborado. O iodo foi analisado pelo método de extração ácida, seguido de oxirredução entre Ce^{4+} e AS^{3+} e a leitura em leitor de microplaca - ELISA. Também foi analisado antioxidantes por espectrofotometria, ácidos graxos por cromatografia gasosa, composição química do leite por método ultrassônico e CCS por infravermelho. Para comparação dos dados estatísticos foi realizada uma análise multivariada com modelo fatorial exploratório (AFE) usando como critério de extração dos fatores componentes principais, mais análise não paramétrica dos dados quantitativos usando o teste de *Kruskal-Wallis* e análise de QUI² para avaliar a frequência das variáveis na concentração de iodo. Os resultados mostraram que houve diferença ($p > 0,05$) entre as regiões oeste, centro oriental e norte central onde a maior concentração de iodo no leite foi observada nas propriedades da mesorregião oeste (615,45 $\mu\text{g/L}$) e a menor na região norte central (352,99 $\mu\text{g/L}$). A partir da análise fatorial e de *cluster* das concentrações de iodo pode comparar quais das variáveis indicadoras do questionário, contribuíram para a variação de iodo no leite. O fator limpeza de ordenha apresentou diferença ($p > 0,05$), em dois grupos de iodo, o de baixa 121 $\mu\text{g/L}$ e de média 372 $\mu\text{g/L}$ concentração, respectivamente, todavia, nota-se que a limpeza da máquina interfere na concentração de iodo do leite. A dieta também influenciou. As propriedades que faziam uso de pastagem com adubação orgânica apresentaram menor concentração de iodo no leite, deste modo apresentaram maior frequência de animais criados em pastagem 97,30%. Já 55,70% das propriedades que forneceram dieta total teve maior concentração de iodo no leite. No entanto, as concentrações de iodo são influenciadas por fatores que compõem o sistema de produção, regiões do estado, tipo de solo, dieta e manejo de higiene de ordenha, além desses fatores os leites com maiores concentrações de iodo apresentaram importantes características nutracêuticas, como aumento na capacidade antioxidante, maior concentração de CLA e menor razão ômega 6 e 3.

Palavras-chave: compostos nutracêuticos, dieta, *pré-dipping*, qualidade do leite.

ABSTRACT

This study aimed to quantify the iodine concentration, evaluate the antioxidant compounds and chemical concentration in samples of raw milk from properties in three mesoregions of the Paraná State and determine which management factors can contribute with the iodine content in milk. The milk samples were collected in 50 ml falcon

flasks in the tanks of 168 properties, together with production, breeding and milking information in a previously prepared questionnaire.

The iodine was analyzed by the acid extraction method, followed by oxireduction between Ce4 + and AS3 + and reading in a microplate reader - ELISA. Antioxidants were also analyzed by spectrophotometry, fatty acids by gas chromatography, milk chemical composition by ultrasonic method and CCS by infrared. To compare the statistical data, a multivariate analysis with exploratory factorial model (AFE) was performed using the main component factors as an extraction criterion, plus non-parametric analysis of the quantitative data using the Kruskal-Wallis test and QUI² analysis to assess the frequency of iodine concentration. The results showed that there was a difference ($p > 0.05$) between the west, eastern center and central north regions where the highest iodine concentration in milk was observed in the properties of the western mesoregion (615.45 $\mu\text{g} / \text{L}$) and the lowest in the north central region (352.99 $\mu\text{g} / \text{L}$). From the factor and cluster analysis of iodine concentrations, it was possible to compare which of the questionnaire's indicator variables contributed to the iodine variation in milk. The milking cleaning factor showed a difference ($p > 0.05$), in two groups of iodine, the low 121 $\mu\text{g} / \text{L}$ and the average 372 $\mu\text{g} / \text{L}$ concentration, respectively, however, it is noted that the machine cleaning interferes in the milk iodine concentration. The diet also influenced. The properties that used pasture with organic fertilization showed a lower iodine concentration in milk, thus showing a higher frequency of animals raised on pasture 97.30%. 55.70% of the properties that provided a total diet had a higher concentration of iodine in the milk. However, iodine concentrations are influenced by factors that make up the production system, regions of the state, soil type, diet and milking hygiene management. In addition to these factors, milk with a higher iodine concentration showed important nutraceutical characteristics, such as increased in antioxidant capacity, higher CLA concentration and lower omega 6 and omega 3 ratio.

Key words: diet, milk quality, nutraceutical compounds, pre-dipping

INTRODUÇÃO

A maior concentração de iodo no organismo humano e animal se encontra na glândula tireoide, como um componente necessário para a síntese dos hormônios tireoidianos triiodotironina (T3) e tetraiodotironina ou tiroxina (T4), os quais têm importante função metabólica e desempenha papel fundamental no metabolismo celular, na regulação da taxa de oxidação dentro das células, no crescimento e desenvolvimento do feto, no funcionamento do sistema nervoso central e dos tecidos musculares, na atividade circulatória e no metabolismo de todos nutrientes do recém-nascido (Tazebay, 2011; Goff, 2018).

Enquanto a maior parte do iodo é encontrada na glândula tireoide, parte do iodo de origem não hormonal é encontrada em vários tecidos corporais, como glândulas mamárias e salivares, olhos, mucosa gástrica e colo do útero (Ahad and Ganie, 2010). O

acúmulo do iodo nas glândulas mamárias está relacionado com o desenvolvimento do feto e neonatos e ocorre durante o final da gestação e início da lactação (Venturi, 2001; Venturi and Venturi, 2014).

Leiterer and Franke (2001) relatam que a principal forma do iodo encontrado no leite de vaca é o iodeto e também em traços de iodato. Reijden and Galetti (2017) relatam que a concentração desse oligoelemento no leite de vacas varia entre 33 e 534 $\mu\text{g/L}$, ficando próximo de 100 e 300 $\mu\text{g/L}$.

É recomendado que a ingestão de iodo para crianças de 0-12 meses seja de 110-130 $\mu\text{g/dia}$, de 1-8 anos de 90-120 $\mu\text{g/dia}$, acima de 14 anos 150-220 $\mu\text{g/dia}$ e para grávidas e lactantes 250-290 $\mu\text{g/dia}$, respectivamente, (Anvisa, 2013; Blaško et al., 2010; Institute of Medicine, 2001; Unicef 2019).

Já na nutrição animal, a recomendação do consumo de iodo para vacas lactantes é de 0,5 mg/kg/MS (NRC, 2001). Todavia, alguns fatores podem contribuir para a variação na concentração de iodo no leite como a ingestão de iodo, o consumo de alimentos goitrogênicos e o uso de desinfetantes iodados (Van Der Reijden et al., 2017).

Borucki Castro et al. (2010) analisaram dados de propriedades leiteiras no Canadá e encontraram a concentração média de 265 μg de iodo/L. Considerando as recomendações de ingestão de leite pelo o Guia de alimentação do Canadá, que sugere ingestão de 500 a 750 mL de leite por dia, a concentração de iodo teria que ser de 200 $\mu\text{g/L}$.

No Brasil, a concentração de iodo em fórmulas infantis está de acordo com a recomendada pela ANVISA, no entanto, não há estudos aprofundados para saber se de fato as concentrações dos rótulos estão em equidade com a concentração da fórmula (Anvisa 2008; Campos and Ramos 2014).

Macedo et al. (2012) avaliaram o *status* nutricional de crianças na região de Minas Gerais – Brasil através da excreção de iodo via urina, e evidenciaram que a ingestão de iodo era deficiente, ou seja, a ingestão diária deste mineral não alcança os limites recomendado pelos órgãos de saúde.

Objetivou-se neste estudo caracterizar algumas propriedades leiteiras no estado do Paraná, avaliar a concentração de iodo, antioxidantes e a concentração química em amostras de leite cru e determinar se o manejo influencia a concentração de iodo no leite avaliado.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragens – Área de abrangência do estudo

A pesquisa foi aprovada e protocolada na Comissão de Ética no uso de animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) nº 5899220217 e no Comitê Permanente de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – (COPEP) nº 2.396.173/2017, realizada em 168 propriedades leiteiras do Estado do Paraná – Brasil, distribuídas em três mesorregiões: região centro-oriental, região norte central e região oeste (Figura 1).



Figura 1: Estado do Paraná e Mesorregiões Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia Estatística – IBGE 2018

A delimitação geográfica escolhida foi referente à representatividade da produção leiteira beneficiamento e heterogeneidade do sistema produtivo das mesorregiões (Bánkuti et al., 2017; Zimpel et al., 2017; Casali et al., 2020). Juntas estas regiões representaram 39,86% da produção de leite no Estado do Paraná em 2018, com total de 4,37 bilhões de litros, alcançando a segunda colocação do ranking nacional de produção de leite (IBGE, 2019).

As visitas nas propriedades leiteiras ocorreram de forma aleatória e as entrevistas com os produtores foram realizadas através de um questionário previamente elaborado com perguntas baseada em Castro et al. (2010) com o objetivo de caracterizar a produção leiteira, o rebanho, o sistema de criação, o tipo de solo, o manejo sanitário, o manejo de ordenha e o manejo nutricional de cada propriedade.

No mesmo dia da aplicação do questionário, autorizado mediante assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido foram coletadas amostras de leite nos tanques de expansão, após homogeneização em frascos tipo *falcon* de 50 mL e acondicionadas em caixa isotérmica com gelo seco. Em seguida foram estocadas em ultra freezer -80°C para posterior análise.

Análise das amostras de leite

Para a análise de iodo, as amostras de leite foram descongeladas em banho-maria em temperatura de 36°C a 38°C. Em seguida, o iodo foi determinado por meio de extração ácida seguindo de reação de oxirredução entre Ce^{4+} e AS^{3+} (Sandell and Kolthoff, 1937; Vorlová et al., 2014) baseada na metodologia de Hedayati et al. (2007) com modificações, e o ácido nítrico (HNO_3) foi utilizado na substituição da solução de digestão e a temperatura máxima do bloco foi de 150°C, como segue: uma alíquota de 50 μ L de

amostra de leite cru foi adicionada em tubos de digestão com dimensões de 25 x 250 mm, juntamente com 2000 μL de HNO_3 .

Após os tubos serem tampados e colocados no bloco digestor (Marconi Equipamentos Para Laboratórios Ltda; Piracicaba/SP - Brasil), em que a temperatura foi elevada 50°C a cada 30 minutos, permanecendo em aquecimento até completar 150°C , deste modo totalizando 1 hora em digestão. Ao finalizar o processo de digestão, as amostras ficaram arrefecendo na capela por segurança.

Para a reação de oxirredução, 50 μL da solução digerida foram adicionados em quadruplicata nos poços de placas de poliestireno de 96 poços. Logo, 100 μL de ácido arsenioso foram adicionados e com auxílio de uma pipeta multicanal mais 50 μL de solução de amônio cério foi rapidamente adicionada.

As amostras foram mensuradas em um leitor de microplaca (Molecular devices – Versa max, tunnable, LabCommerce, INC. TM; San Jose, CA - EUA) a 405 nm, após 20 min de incubação. A curva de calibração foi preparada a partir de uma solução estoque de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de iodeto de potássio (IK) com concentrações de zero; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, em que o branco foi água ultrapura Milli-Q (Hedayati et al., 2007; Benkhedda et al., 2009).

O coeficiente de linearidade para a regressão das médias logarítmicas de absorvância entre o ponto zero e 1 $\mu\text{g/mL}$ foi de $R^2 = 0,9941$. E o limite de detecção calculado pela equação $LD = DP*3/\text{inclinação da curva}$ foi de 0,12 $\mu\text{g/mL}$ (Sobrinho et al., 2008).

A composição química do leite foram determinadas por método ultrassônico (Analisador de leite Ekomilk Total[®], CapLab, São Paulo, SP, Brasil) (Melo et al., 2018).

A contagem de células somáticas (CS) foi realizada por infravermelho, pelo equipamento (Ekomilk Scan[®], CapLab, São Paulo, SP, Brasil) e o resultado foi expresso em CS/mL.

As amostras de leite foram solubilizadas na proporção de 9 mL de metanol mais 1 mL de leite para realizar as análises da capacidade antioxidante total (CAT) e polifenóis totais. A mistura foi agitada em vortex durante 5 minutos e centrifugada a 3000 rpm / 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado com filtro PTFE e utilizado nas análises.

O conteúdo total de polifenóis foi determinado usando o procedimento de Folin-Ciocalteu como descrito por Singleton and Rossi, (1965) e usando o polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) de acordo com Han et al. (2011). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Thermo Scientific[™] Evolution[™] 350 UV-Vis) a 765 nm e o resultado foi expresso em equivalente ácido gálico (mg GAE/mL).

A CAT das amostras de leite foi determinada como descrito por Rufino et al. (2007) com a adição do radical ABTS⁺⁻ (2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico]) (Sigma, código A188) ao extrato. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis a 734 nm após 6 minutos de reação. A CAT foi expressa em equivalente Trolox (μ M Trolox/mL).

A análise de produção de hidroperóxidos dieno conjugados foi realizada conforme Kiokias et al. (2006), sendo adicionado 50 μ L de leite à 2,5 mL de uma solução isoocetano/2-propanol (2:1, v/v) em um tubo e agitado por um minuto em vortex. A mistura foi filtrada em filtro de membrana PTFE 0,22 μ m e a absorbância foi determinada em espectrofotômetro UV-Vis a 232 nm (Thermo Scientific[™] Evolution[™] 350 UV-Vis), sendo expressa em mmol/kg de gordura.

A análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada segundo Vyncke (1970) com modificações, sendo adicionado 500 μ L de leite a 2 mL de

solução composta por ácido tiobarbitúrico (10:990, v/v), ácido tricloroacético (150:850, v/v) e ácido clorídrico (0,05:999,95, v/v). A mistura foi agitada em vortex e submetida à 100°C durante 15 minutos, seguido por um banho frio durante 5 minutos, centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para cubeta e a absorbância determinada em espectrofotômetro UV-Vis a 538 nm (Thermo Scientific™ Evolution™ 350 UV-Vis). Os valores foram expressos como mmol de malonaldeído/kg de gordura.

Foram analisadas 135 amostras do total do leite das propriedades para ácidos graxos. Para extração e análise do perfil de ácidos graxos da matéria graxa de leite, utilizou-se a técnica descrita por (Murphy et al., 1995) por congelamento-descongelamento e centrifugação. Após serem descongeladas, as amostras foram transferidas para tubos apropriados e centrifugadas a 6000 mil RPM, por 15 minutos a 4°C.

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram obtidos através da transesterificação dos triacilgliceróis, conforme método 5509 da ISO, (1978), em solução de n-heptano e KOH/metanol. Aproximadamente, 100 mg da matéria graxa foram transferidas para tubo de ensaio com tampa rosqueável com capacidade de 10 mL, adicionados 2,0 mL de n-heptano e agitada até solubilização total da matéria graxa, mais 2,0 mL de solução 2 mol/L de KOH em metanol foi adicionada e agitada durante 5 minutos.

Após separação das fases, a fase superior contendo os ésteres metílicos de ácidos graxos foi transferida para tubo eppendorff e analisada. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados por um cromatógrafo a gás (Thermo, modelo Trace Ultra 3300), equipado com coluna capilar de sílica fundida (SP – 2560, Select FAME, 100 m x 0,25 mm d.i. e 0,25 µm de cianopropil) e detector de ionização de chama (Martin et al., 2008). O fluxo dos gases foi de 2 mL/min para o gás de arraste (H₂), 30 mL/min para o gás

auxiliar (N₂) e 35 mL/min para o H₂ e 350 mL/min para o gás sintético. O volume do material injetado foi de 2,0 µL, usando o método *split flow*.

As temperaturas do injetor e do detector foram 240°C. A temperatura da coluna foi de 50°C durante 4 minutos, seguida pela primeira rampa de aquecimento de 200°C/min, mantida por 15 minutos com 8 minutos de aquecimento, seguida pela segunda rampa de aquecimento de 240°C/min, por 8 minutos, totalizando 35 minutos de análise. As áreas dos picos e os tempos de retenção foram determinados através do software ChromQuest 5.0. Os AG identificados baseados em comparações dos tempos de retenção com o padrão 189-19 (Sigma- Aldrich, São Paulo, Brasil).

Para a quantificação absoluta dos AG foi realizada a normalização interna, sendo utilizado como padrão o éster metílico do ácido tricosanoico e o padrão CLA (10E, 12Z) (Sigma-Aldrich Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Os cálculos foram realizados conforme o método de Joseph and Ackman, (1992) e os fatores correção teóricos Visentainer et al. (2012) foram empregados para determinar as concentrações. As quantidades de AG foram calculadas em mg/g de lipídios totais (mg AG/g LT).

Análise Estatística

Para a definição do número de *clusters* foi utilizado o método Ward que obtém a medida de distância da mínima variância, usando o critério de variância externa entre *clusters* superior a 75% e variância interna entre os SPL de cada *cluster* inferior a 25% (Fávero et al., 2009). As comparações foram realizadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com 0,05% de significância e foi aplicado por comparação entre três ou mais grupos independentes.

Foi realizada uma análise multivariada com um modelo fatorial exploratório (AFE) usando como critério de extração dos fatores, componentes principais.

O modelo de AFE que é apresentado da seguinte forma (1):

$$X_1 = a_{11} * F_1 + a_{12} * F_2 + \dots + a_{1m} * F_m + e_p$$

$$X_2 = a_{21} * F_1 + a_{22} * F_2 + \dots + a_{2m} * F_m + e_p$$

⋮

$$X_p = a_{p1} * F_1 + a_{p2} * F_2 + \dots + a_{pm} * F_m + e_p \quad (1)$$

Em que:

(X_p) representa p -ésimo escore da variável padronizada ($p = 1, 2, \dots, m$);

(F_m) são os fatores extraídos;

(a_{pm}) as cargas fatoriais e

(e_i) o erro.

A quantidade de fatores extraídos foi determinada pelo critério da raiz latente – critério de Kaiser (Fávero et al., 2009).

A AFE foi realizada sobre a matriz de correlação, esse critério correspondeu à exclusão de fatores com autovalores inferiores a um. O autovalor de cada fator extraído foi dado pela soma dos quadrados das cargas fatoriais de todas as variáveis. Foram descartadas variáveis com cargas fatoriais inferiores a 0,50 (Hair and Tatham, 2009).

Para melhor interpretação dos fatores extraídos foi realizado o procedimento de rotação ortogonal Varimax, que minimiza o número de variáveis que têm altas cargas em um fator e maximiza a variação entre os pesos de cada fator (Fávero et al., 2009; Hair et al., 2009).

A adequação da AFE foi observada considerando o teste de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) esperando obter valor superior a 0,60 e a significância menor ou igual a 0,05 para o teste de esfericidade e de Bartlett (Fávero, 2009; Bánkuti et al., 2017; Casali et al., 2020).

As respostas do questionário foram dadas em diferentes escalas de classificação (Field, 2009) e as variáveis e seus coeficientes de medidas estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Variáveis relativa ao questionário, níveis de medida e análise estatística.

Variável	Nível de medida	Método de análise
V1-Qual o tipo de aplicador de <i>pré-dipping</i> é usado	Qualitativa ordinal 1 (Spray), 2 (Pano c/ desinfetante), 3 (Copo)	Análise fatorial comum
V2 - Realiza <i>pré-dipping</i>	Nominal categórica 1(Não), 2 (Sim)	Análise fatorial comum
V3 - Qual desin. do <i>pré-dipping</i>	Qualitativa ordinal 1 (Iodo), 2 (Cloro), 3 (Ácido Lático)	Análise fatorial comum
V4 - Usa detergente alcalino	Nominal categórica 1(não), 2 (Sim)	Análise fatorial comum
V5 - Usa água quente	Nominal categórica 1(Não), 2 (Sim)	Análise fatorial comum
V6 - Usa detergente ácido	Nominal categórica 1(Não), 2 (Sim)	Análise fatorial comum
V7 - Qual o tipo de aplicador de <i>pós-dipping</i> é usado	Qualitativa ordinal 1 (Spray), 2 (Pano c/ desin.), 3 (Copo)	Análise fatorial comum
V8 - Realiza <i>pós-dipping</i>	Nominal categórica 1(Não), 2 (Sim)	Análise fatorial comum
V9 - Faz uso de pastagem	Nominal categórica 1(Não), 2 (Sim)	Análise fatorial comum
V10 - Qual o gênero do capim das pastagens permanentes	Qualitativa ordinal 1 (<i>Brachiaria</i>), 2 (<i>Panicum</i>), 3 (<i>Cynodon</i>)	Análise fatorial comum
V11- Realiza adubação das pastagens	Qualitativa ordinal 1 (Química), 2 (Orgânica), 3 (Q+O)	Análise fatorial comum
V12 - Usa ração [] ¹ (FS, M, MM, Vit) ²	Nominal categórica 1(Não), 2 (Sim)	Análise fatorial comum
V13 - A ração concentrada é comercial ou fabricação própria	Nominal categórica 1(Não), 2 (Sim)	Análise fatorial comum
V14 - De que maneira a ração concentrada é fornecida aos animais	Categórica ordinal 1(Separada), 2 (Dieta total)	Análise fatorial comum

¹ Concentrada; ² Farelo de soja, milho, mistura mineral, vitaminas; Desin. = desinfetante.

Como procedimentos estatísticos foram utilizadas a Análise não paramétrica (ANOVA) com o teste de Kruskal-Wallis e a análise de Qui² ao nível de significância de 5%. Os testes foram aplicados nas variáveis da AFE que contribuíram para a formação de cada componente com o agrupamento de cada cluster.

RESULTADOS

Na Tabela 2 é apresentado a análise de cluster que agrupou as 168 propriedades em três grupos referentes à concentração de iodo. Os valores agrupados foram: 1- baixa = 121,02 (n=37); 2- média = 372,11 (n=52) e 3- alta concentração = 581,58 µg/L (n=79), respectivamente, (Tabela 2).

Tabela 2: Análise de Cluster – Agrupamento usando Método Ward com distância Euclidiana.

<i>Cluster</i>	<i>n</i> ¹	%	Iodo µg/L	DP	EPM	Mínimo	Máximo
1	37	22	121,02	71,57	11,77	5,64	241,12
2	52	31	372,11	43,27	6,00	289,57	438,53
3	79	47	581,58	89,37	10,05	450,04	798,47

¹ número de propriedades; % = porcentagem; DP= desvio padrão; EPM = erro padrão da média

A partir da variação de iodo entre os *cluster* de todas as propriedades foi realizado um novo agrupamento entre três mesorregiões do estado do Paraná: região norte central, centro oriental e oeste (Figura 1), onde concentra a grande parte dos produtores de leite com característica de produção bastante heterogênea.

Pode ser observado em cada mesorregião estudada, que a concentração de iodo variou e apresentou diferença ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis (Tabela 3). Houve diferença ($P > 0,01$) entre as regiões oeste, centro oriental e norte central onde a maior concentração de iodo no leite foi observada nas propriedades da mesorregião oeste (615,45 µg/L) e a menor na região norte central (352,99 µg/L). Entre a região centro

oriental 406,33 $\mu\text{g/L}$ e norte central 352,99 $\mu\text{g/L}$ não houve diferença significativa ($P = 0,826$) (Tabela 3).

Tabela 3: Concentração de iodo nas amostras de leite avaliado, oriundo das diferentes regiões do estado.

Região	<i>n</i>	Iodo ($\mu\text{g/L}$)	DP	Mínimo	Máximo	EPM	<i>P</i> -valor
Oeste	34	615,45 a	90,29	367,14	798,47	15,48	0,000
Centro Oriental	29	406,33 b	140,40	5,64	656,17	26,07	0,000
Norte Central	105	352,99 b	191,04	8,90	769,30	18,64	0,826

EPM= erro padrão da média; *n*= número das propriedades; DP= Desvio padrão. Nível de significância de $P \leq 0,05$.

Uma das características observadas nas regiões estudadas pelo questionário foi a texturas dos solos, sendo que, a textura que mais predominou foi a mista e argilosa. Na região norte central, 42% das propriedades apresentaram solo de textura mista, na região oeste predomina o tipo de solo argiloso 100% e na região centro oriental, o maior percentual foi da textura mista 51,72% (Gráfico 1).

Como houve variação percentual na distribuição das propriedades em função da textura do solo por região, observou-se que a concentração de iodo do total de propriedades estudadas variou conforme a textura, sendo que houve diferença significativa ($P < 0,05$), e que a maior concentração de iodo 506,67 $\mu\text{g/L}$ foi observada em propriedades que tinha o predomínio do solo argiloso (Tabela 4).

Tabela 4: Textura do solo e concentração de iodo no leite.

Textura do solo	Textura do solo x Iodo no leite ($\mu\text{g/L}$)			<i>P</i> -valor
	Média	<i>n</i>	DP	
Arenosa	286,76 b	39	196,28	0,86
Mista	393,80 b	60	172,42	0,00
Argilosa	506,67 a	69	168,13	0,00
Total	415,31	168	195,58	

DP = Desvio Padrão; *n* = número de propriedades.

A partir do teste não paramétrico de comparação entre os *cluster* nas variáveis métricas, observa-se que houve diferença significativa ($P < 0,05$) para os componentes químicos do leite. Houve diferença ($P = 0,02$) para os níveis de gordura que apresentou o maior teor 3,55% no *cluster* 2 o qual apresentou concentração de iodo de 372 $\mu\text{g/L}$, diferindo do *cluster* 1 com 121 μg iodo/L, ou seja, a medida que os níveis de iodo aumentaram os de gordura tenderam aumentar também (Tabela 5).

Tabela 5: Comparações entre *cluster* nas variáveis métricas.

<i>Cluster</i>	1	2	3	DP	P-valor
Iodo ($\mu\text{g/L}$)	121	372	581		
Composição Química					
Gordura (%)	3,33 b	3,55 a	3,42 ab	0,52	0,02
Proteína (%)	3,40	3,35	3,30	0,30	0,59
Lactose (%)	4,40 a	4,17 b	3,99 c	0,37	0,00
¹ ESD (%)	8,81 a	8,27 b	7,87 c	0,90	0,00
² CCS (x1000 cel/mL - Log ₁₀)	2,63 a	2,63 a	2,26 b	0,36	0,00
Antioxidantes					
³ TBARS (mmol/kg gord.)	19,92	25,18	28,24	19,19	0,13
⁴ DC (mmol/kg gordura)	45,80	41,97	47,44	19,15	0,36
⁵ CAT (μM Trolox/mL)	239,76 b	269,73 a	305,83 a	79,98	0,00
⁶ PFT (mg GAE/mL)	0,12	0,13	0,13	0,084	0,63
Conj. de ácidos graxos (mg/g LT)					
⁷ AGCC	5,74 a	5,49 b	4,25 ab	0,80	0,03
⁸ AGCM	240,36 a	234,33 a	194,99 b	24,64	0,02
⁹ AGCL	172,32	169,38	151,29	11,39	0,21
¹⁰ AGS	318,75	310,66	273,01	24,41	0,08
¹¹ AGI	122,82	120,89	107,43	8,39	0,09
¹² AGMI	112,45	110,62	98,11	7,80	0,08
¹³ AGPI	10,37	10,27	9,31	0,58	0,42
¹⁴ CLA - c9t11	2,53	2,54	2,56	0,02	0,29
¹⁵ CLA - t10c12	0,11 b	0,12 ab	0,14 a	0,02	0,02
¹⁶ CLA total	2,64	2,66	2,71	0,03	0,33
¹⁷ W3	0,70	0,69	0,66	0,02	0,36
¹⁸ W6	6,74	6,63	5,70	0,57	0,17
¹⁹ W6/W3	9,67	9,55	7,33	4,15	0,33

¹Extrato seco desengordurado; ²Contagem de células somáticas; ³TBARS= substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; ⁴DC= hidroperóxidos dienos conjugado; ⁵CAT= capacidade antioxidante total; ⁶Polifenois; ⁷Ácidos graxos de cadeia curta; ⁸ ácido graxo de cadeia média; ⁹ ácido graxo de cadeia longa; ¹⁰ ácido graxo saturado; ¹¹ Ac. Graxo insaturado; ¹² a. graxo monoinsaturado, ¹³ a. graxo poli-insaturado, ¹² CLA Totais, ¹⁵ cla - cis9 trans 10, ¹⁶ cla - trans 10 cis 9; ¹⁷ ômega 3; ¹⁸ ômega 6; ¹⁹ razão ômega 6 e 9. Nível de significância de $P \leq 0,05$.

Ao contrário da gordura, a lactose diminuiu, conforme aumentou os níveis de iodo no leite (121, 372, 581 $\mu\text{g/L}$), nota-se também que ocorreu o efeito de diluição da gordura, pois aumentou o teor de lactose diminuiu o de gordura (Tabela 5).

O mesmo acontece com o extrato seco desengordurado (ESD) ($P < 0,01$), à medida que o iodo aumenta no leite = 121; 372 e 581 $\mu\text{g/L}$, diminui o ESD = 8,81; 8,27 e 7,87% respectivamente (Tabela 5).

Quanto à contagem de células somáticas (CCS) houve diferença significativa em cada *cluster* ($P = 0,00$), à medida que a concentração de iodo aumenta o efeito inverso ocorre com a CCS = 2,63; 2,63; 2,26 cel/mL.

Juntamente com a composição química foram avaliados os antioxidantes presentes no leite das propriedades que compuseram cada *cluster*. Não houve diferença significativa para o *status* oxidativo do leite DC ($P = 0,13$) e TBARS ($P = 0,36$) conforme aumentou a concentração de iodo Já a capacidade antioxidante (CAT) diferiu ($P = 0,00$), pois à medida que aumentou a concentração de iodo, aumentou a capacidade antioxidante do leite 239,76, 269,73 e 305,83 ($\mu\text{M Trolox/mL}$). Quanto aos polifenóis totais não houve diferença significativa ($P = 0,63$) em relação à concentração de iodo dos *cluster* (Tabela 5).

As variáveis do questionário ligadas aos manejos de ordenha, nutricional, sanitário e de criação foram avaliadas a partir da análise multivariada fatorial exploratória em relação aos níveis de iodo no leite cru, antes do processamento.

Para o perfil de ácidos graxos houve diferença ($P = 0,03$) sendo que a maior concentração de ácidos graxos de cadeia curta foi no cluster de menor concentração de iodo 5,74; 5,49; 4,25 (mg/g LT). O resultado dos ácidos graxos de cadeia média, foi superior 234,33 no cluster de média concentração de iodo, diferindo ($P < 0,01$) do cluster de baixa concentração de iodo 194,99 (mg/g LT). O CLA t10c12, foi proporcional a

concentração de iodo dos cluster ($P = 0,02$) a medida que o iodo aumentou o CLA também aumentou (Tabela 5).

A Tabela 6 mostra que houve adequação da amostragem (0,74) para o teste de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) com efeito significativo para o teste de Bartlett's ($P = 0,00$), que indica que a análise fatorial é aceitável para o conjunto de dados.

Tabela 6: Verificação da adequação da análise.

Teste de KMO e Bartlett's		
Kaiser-Meyer-Olkin - Medida de Adequação da Amostragem.		0,74
Bartlett's – Teste de esferecidade	Aproximação de Qui-quadrado	1509,00
	df	91
	Significância	0,00

Nível de significância $p < 0,05$. Valores de KMO e Bartlett's acima de 0,5 indica que a análise fatorial é aceitável.

Assim, inicialmente 11 fatores foram formados e as variáveis que apresentaram carga fatorial abaixo de 0,50 foram excluídas, e resultou em 5 fatores que apresentaram variância total explicada de 74%, satisfazendo desse modo o critério mínimo 60% do teste (Tabela 7).

Tabela 7: Autovalor e variância explicada de cada fator.

Fatores	Variância Total		
	Soma de Rotação de Cargas Quadradas		
	Autovalor	% de Variância	% Cumulativo
1	2,83	20,25	20,25
2	2,08	14,86	35,12
3	2,05	14,66	49,79
4	1,91	13,68	63,47
5	1,52	10,90	74,37

Método de Extração: Análise de Componentes Principais

A análise das cargas fatoriais realizada através de extração de componentes principais resultou na caracterização dos fatores que contribuíram com a variação de iodo no leite. Houve seis interações entre as variáveis, em que a comunalidade dos dados extraídos explica a interação entre as variáveis (Tabela 8).

A análise foi baseada no método de extração de componentes principais com o auxílio da ferramenta do método de rotação varimax com normalização de Kaiser para melhor compreensão dos componentes extraídos (Tabela 8).

Tabela 8: Resultados das Cargas fatoriais.

Componentes da Matriz Rotacionado					
Variáveis^a	Fatores				
	F1. Manejo de <i>pré-</i> <i>dipping</i>	F2. Limpeza de ordenha	F3. Manejo de <i>pós-</i> <i>dipping</i>	F4. Dieta Pastagem	F5. Dieta Concentrado
1. Aplicador	0,923	0,141	0,218	-0,113	-0,055
2. <i>Pré-dipping</i>	0,918	0,119	0,251	-0,153	-0,026
3. Desinf. do <i>pré-dipping</i>	0,894	0,139	0,183	-0,135	0,011
1. Detergente alcalino	0,087	0,809	0,162	-0,026	0,034
2. Água quente	0,151	0,768	-0,230	-0,076	0,092
3. Detergente ácido	0,121	0,758	0,192	0,076	0,135
1. Tipo de aplicador	0,343	0,08	0,893	-0,116	-0,01
2. <i>Pós-dipping</i>	0,356	0,065	0,889	-0,118	0,005
1. Usa pastagem	-0,156	-0,272	-0,104	0,803	-0,042
2. Gênero de pastagens	-0,06	-0,012	-0,166	0,782	0,030
3. Adubação das pastagens	-0,151	0,255	0,061	0,680	-0,073
1. Ração concentrada: FS, M, MM, Vit	-0,035	0,210	0,079	0,071	0,808
2. Ração comercial ou própria	-0,018	-0,041	-0,234	0,009	0,680
3. Fornecimento de ração	0,001	0,123	0,321	-0,31	0,610

Método de Extração: Análise de componentes principais. Método de rotação: Varimax com normalização de Kaiser.

^aRotação convergida em 6 iterações.

Todos os fatores extraídos receberam nomes para melhor interpretação das variáveis. O fator F1 foi denominado de manejo de *pré-dipping*, seguido pelo F2: limpeza de ordenha; F3: manejo de *pós-dipping*; F4: dieta (pastagem) e F5: dieta (concentrado) (Tabela 8).

As variáveis que contribuíram para a formação do F1 foram: manejo de *pré-dipping* foram: 1. o tipo de aplicador usado no manejo do *pré-dipping*; 2. Se, realizavam a prática de *pré-dipping*; e 3. Qual o tipo de desinfetante era utilizado no *pré-dipping*. O F2 - Limpeza de ordenha foi composto por: 1. Se, usava detergente alcalino, 2. Água quente ou 3. Detergente ácido. Já as variáveis que do F3 - manejo de *pós-dipping*, foram o 1. Tipo de aplicador e 2. Se, realizava a prática de *pós-dipping*. Quanto ao F4 – Dieta (pastagem), as variáveis foram: 1. Usa pastagem; 2. Qual o gênero da pastagem; 3. Realizava adubação das pastagens. E, por fim o F5 - Dieta (concentrado) foi composto pelas variáveis 1. Ração concentrada composta por (FS, M, MM, VIT.); 2. Ração de fabricação comercial ou própria e 3. Tipo de fornecimento de ração.

A partir da análise fatorial e de *cluster* das concentrações de iodo, comparou-se quais das variáveis indicadoras contribuíram para a variação de iodo no leite dos tanques das propriedades leiteiras (Tabela 9). Não foi observada diferença para o manejo de *pré-dipping* na concentração de iodo no leite (Tabela 9). No entanto, observou-se que para o fator limpeza de ordenha houve diferença ($P \leq 0,05$) em dois grupos de iodo, o de baixa 121 $\mu\text{g/L}$ e de média 372 $\mu\text{g/L}$ concentração, e, notou-se que a limpeza da ordenhadeira interferiu na concentração de iodo do leite.

Quanto ao manejo de *pós-dipping* não foi observado influência entre as concentrações de iodo ($P = 0,50$). Para o fator 4 (dieta sob pastejo) foi observado diferença ($P \leq 0,01$) para o nível de iodo de média concentração (372 $\mu\text{g/L}$), quando comparado com os níveis de baixa e alta concentração.

Não houve diferença entre dos níveis de iodo com o fator 5 (dieta à base de concentrado).

Tabela 9: Valores médios dos indicadores de cada fator na concentração de iodo

Indicadores	Iodo $\mu\text{g/L}$			P -valor
	121	372	581	
1 - Manejo de <i>pré-dipping</i>	0,05 a	-0,02 a	-0,06 a	0,76
DP	1,02	0,92	1,02	
2 – Limpeza de ordenha	-0,27 b	0,34 a	0,16 ab	0,00
DP	1,01	0,86	0,94	
3 - Manejo de <i>pós-dipping</i>	0,04 a	-0,19 a	0,06 a	0,50
DP	1,01	0,99	0,98	
4 – Dieta (Pastagem)	-0,17 b	0,66 a	-0,21 b	0,00
DP	0,97	0,61	1,07	
5 – Dieta (Concentrado)	-0,04 a	0,00 a	0,05 a	0,16
DP	1,314	0,524	0,656	

DP = Desvio padrão. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P \leq 0,05$), pelo teste de Kruskal-Wallis.

Para conhecimento e detalhamento da influência de cada variável de cada fator na concentração de iodo dos *cluster*, a análise de Qui² e frequência foram realizadas (Tabela 10).

Como já observado na análise de médias, não houve diferença para a realização de *pré-dipping* nas concentrações de iodo. No entanto, nota-se que 51% das propriedades do *cluster* 3 – (581 $\mu\text{g/L}$ de iodo) realizam a prática contra 48,10% que não realiza (Tabela 10). A maioria das propriedades que não realizam a prática de higienização das tetas das vacas são dos *cluster* com menor concentração de iodo (59,46% no *cluster* 1 - 121 $\mu\text{g/L}$ e 53,85% no *cluster* 2 – 372 $\mu\text{g/L}$), respectivamente.

No mesmo fator, constata-se que o tipo de aplicador mais comumente utilizado pelos produtores rurais que praticavam o *pré-dipping* era o copo (dip), sendo que 40,51%, 38,46% e 35,14% das propriedades dos respectivos *clusters* utilizavam este método.

Logo, o desinfetante que compõe a prática do *pré-dipping* em maior frequência é o iodo, seguido do ácido láctico.

Tabela 10: Análise de frequência das variáveis do questionário em relação aos níveis de iodo em cada *cluster*.

Fatores analisados		Cluster - Iodo ($\mu\text{g/L}$)						Análise <i>P</i> -valor
Perguntas	Respostas	1 - 121 n=37		2 - 372 n=52		3 - 581 n=79		
		Fi	%	Fi	%	Fi	%	
1 – Manejo de <i>pré-dipping</i>								
<i>Pré-dipping</i>	Realiza	15	40,54	24	46,15	41	51,9	0,51
	Não realiza	22	59,46	28	53,85	38	48,1	
Tipo de aplicador	Não usa	21	49,37	28	53,85	39	56,76	0,95
	Spray	0	3,80	1	1,92	3	0	
	Pano desinfetante	3	6,33	3	5,77	5	8,11	
	Copo (dip)	13	40,51	20	38,46	32	35,14	
Desinfetante do <i>Pré-dipping</i>	Iodo	22	59,46	29	55,77	39	49,37	0,88
	Cloro	6	16,22	8	15,38	15	18,99	
	Ácido Lático	9	24,32	15	28,85	25	31,65	
2 – Limpeza de ordenha								
Detergente alcalino	Usa	29	78,38	35	67,31	42	53,16	0,02
	Não usa	8	21,62	17	32,69	37	46,84	
Água quente	Usa	26	70,27	39	75	45	56,96	0,08
	Não usa	11	29,73	13	25	34	43,04	
Detergente ácido	Usa	28	75,68	33	63,46	38	48,1	0,01
	Não usa	9	24,32	19	36,54	41	51,9	
3 - Manejo de <i>pós-dipping</i>								
<i>Pós-dipping</i>	Realiza	19	51,35	35	67,31	52	65,82	0,25
	Não realiza	18	48,65	17	32,69	27	34,18	
Tipo de aplicador	Não usa	18	48,65	16	30,77	27	34,18	0,37

	<i>Spray</i>	0	0	1	1,92	1	1,27	
	Pano desinf	0	0	1	1,92	0	0	
	Copo (dip)	19	51,35	34	65,38	51	64,56	
4 – Dieta (Pastagem)								
Pasto	Usa	36	97,3	37	71,15	66	83,54	0,00
	Não usa	1	2,70	15	28,85	13	16,46	
Gênero das pastagens	Usa <i>Brachiaria</i>	4	8,11	4	7,69	4	5,06	0,77
	Não usa <i>Brachiaria</i>	34	91,89	48	92,31	75	94,94	
	Usa <i>Panicum</i>	12	32,43	9	17,31	3	3,8	0,00
	Não usa <i>Panicum</i>	25	67,57	43	82,69	76	96,2	
	Usa <i>Cynodon</i>	31	83,78	40	76,92	59	74,68	0,60
	Não usa <i>Cynodon</i>	6	16,22	12	23,08	20	25,32	
Adubação das pastagens	Não realiza	2	5,41	15	28,85	19	24,05	0,00
	Química	5	13,51	15	28,85	21	26,58	
	Orgânica	16	43,24	8	15,38	17	21,52	
	Q+O	14	37,84	14	26,92	22	27,85	
5 – Dieta (Concentrado)								
Ração	Usa	37	100	52	100	75	94,64	0,14
	Não usa	0	0	0	0	4	5,06	
Ração concentrada	Própria	7	18,92	14	26,92	17	21,52	0,63
	Comercial	30	81,08	38	73,08	62	78,48	
Fornecimento	Separada	27	72,97	24	46,15	31	39,24	0
	Dieta total	10	27,03	28	53,85	44	55,7	

F_i = Frequência acumulada; (%) = Porcentagem; P = P-valor;

Todas as variáveis do F2 – limpeza da ordenha apresentaram efeito significativo ($P \leq 0,05$) na concentração de iodo do leite. Deste modo, com este resultado se deduz que a maioria das propriedades que faz uso de detergente alcalino, água quente e detergente ácido na higienização da ordenhadeira contribuem para a variação de iodo, pois foi menor quando a limpeza da ordenhadeira e utensílios foi completa.

A prática de *pós-dipping* não teve efeito significativo ($P > 0,05$) e da mesma forma que no *pré-dipping*, a maior porcentagem faz uso da prática de higienização das tetas utilizando o copo de imersão (dip).

Quanto a alimentação do rebanho houve efeito significativo ($P < 0,01$) para o uso de pastagem na dieta das vacas, sendo que foi relevante o uso de capim do gênero *panicum* 32,43%, 17,31%, 3,80% nas propriedades de cada nível de iodo, respectivamente, conforme aumentou o nível de iodo no leite, menos propriedades faziam uso de pastagem com capim do gênero *panicum* (Tabela 10).

Houve efeito para a adubação das pastagens, em que as propriedades com o menor de nível de iodo 121 $\mu\text{g/L}$ no leite, faziam uso de adubo orgânico (Tabela 10). Não houve diferença para o uso de ração concentrada nas propriedades ($P = 0,14$) e para a origem da ração fornecida as vacas ($P = 0,63$).

Já para a forma de fornecimento da ração, separada do volumoso ou em forma de dieta total houve diferença ($P = 0,00$), sendo que no nível de baixa concentração de iodo 75% da ração foi fornecida em comedouro separado do volumoso e nos níveis de média e alta concentração de iodo, a ração concentrada foi fornecida como dieta total em 53,85% e 55,70% das propriedades dos respectivos grupos.

DISCUSSÃO

A principal observação do presente trabalho foi que a concentração de iodo variou no leite produzido nas propriedades leiteiras do Estado do Paraná avaliadas, estes

resultados foram semelhantes aos encontrados por Castro et al. (2010) que observaram médias de iodo no leite de 304 $\mu\text{g}/\text{kg}$ com variação de 61,7% (54 à 1,902 $\mu\text{g}/\text{kg}$) em 501 propriedades do Canadá.

Na Suíça resultados diferentes foram encontrados, os autores obtiveram 87 $\mu\text{g}/\text{L}$ de iodo no leite, com variação de min–max 5–371 $\mu\text{g}/\text{L}$ no leite, decorrente do tipo de produção: orgânica vs convencional, estação do ano e uso de iodo na solução *pré-dipping* (van Der Reijden et al., 2018). Resultados com médias abaixo das observadas foram verificadas em cidades da Polônia, onde a concentração de iodo variou de 63 a 192,0 $\mu\text{g}/\text{L}$ (Brzóskal and Zbigniew Szybiński, 2009). Na região da Cracóvia a menor concentração de iodo encontrada no leite foi de 31,8 $\mu\text{g}/\text{L}$ e a mais alta em Zielona Góra que foi de 335,4 $\mu\text{g}/\text{L}$.

Dahl et al. (2003) verificaram que a concentração de iodo em leite com baixo teor de gordura em diferentes regiões da Noruega (norte, sul, leste, oeste e centro), não tiveram diferença significativa em relação à localização geográfica da amostra, entretanto, o leite produzido no verão e no inverno apresentaram diferença ($P < 0,01$) sendo o leite do inverno o de maior concentração de iodo média de 232 $\mu\text{g}/\text{L}$, essa relação ocorreu pelas diferentes práticas agrícolas nas cinco regiões, explicada pelo acesso as pastagens por mais tempo na região sul e leste combinado com acesso a forragem enriquecida com iodo. No presente trabalho, as regiões do Paraná - Brasil, o iodo variou de 352,99 $\mu\text{g}/\text{L}$ na região norte central a 615,05 $\mu\text{g}/\text{L}$ na região oeste.

Pennington (1990) em um estudo sobre a concentração de iodo no leite nos Estados Unidos verificou que existe uma variação na concentração de iodo, que é influenciada pela sazonalidade e regionalidade da produção, e o que reflete essa variação é a quantidade de alimentação interna concentrada isto é, alimentação suplementada com iodo durante os meses mais frios *versus* alimentação de pastagem ao ar livre durante os

meses mais quentes, e neste caso a proporção de alimentação interna *versus* externa depende do clima da área geográfica específica.

Rasmussen and Ovesen (2000) também observaram variações geográficas e sazonais nas concentrações de iodo no leite da Dinamarca.

Assim, o que se vê no presente trabalho é que a diversidade da área geográfica contribuiu para a variação de iodo no leite, na região oeste onde a concentração de iodo no leite foi maior, há presença de solos que variam entre: neossolo litólico, latossolo vermelho etroférico, nitossolo vermelho etroférico e nitossolo latossólico, todos com predomínio de culturas temporárias como mandioca e feijão (Mezzomo, 2008). Tipo de solos que apresentam textura argilosa e muito argilosa (Domingos et al., 2009).

Observa-se que nos resultados (Tabela 4) há predomínio de solos argilosos na região oeste, diante disto, nota-se que a concentração de iodo no leite destas propriedades foi maior do que no leite das propriedades que a textura do solo era mista e arenosa. Os solos tendem a apresentar níveis irregulares de iodo, sendo que os solos aluviais e argilosos possuem maior concentração de iodo do que solos derivados de granito (Lima and Navarro, 2018).

Além do solo argiloso, na região oeste é muito comum o uso de produtos de fecularias na alimentação de vacas lactantes. A mandioca possui um composto conhecido como glicosídeo cianogênico (Cereda and Mattos, 1996). E esses compostos são antagonistas ao iodo e afetam a exigência de iodo pelo organismo, pois disputam os sítios de ligação de iodo na tireoglobulina, precursora da síntese de hormônios e interferem na captação de iodo pela tireoide, alimentos com estas substâncias reduzem a eficiência de captação e retenção de iodeto pela glândula tireoide (Van der Reijden et al., 2017; Goff, 2018).

Considerando esses aspectos, é compreensível que o iodo varia conforme a alimentação fornecida e outros fatores como clima, manejo, criação (Castro et al. 2012; Kaufmann and Rambeck 1998), e o mesmo acontece com a composição química do leite (Cabral et al. 2015; Giovannini et al. 2015). Visto que a composição química do leite variou à medida que o iodo aumentou (Tabela 5).

Em média 16% do iodo está presente na porção do leite livre de gordura (Miller 1975), ou seja, o leite com menor teor de gordura tende a ter maiores concentrações de iodo, assim como nos resultados de (Dahl et al., 2003), que avaliando leite com baixo teor de gordura em diferentes estações do ano (inverno e verão) observaram que o leite com pouca gordura na temporada de inverno apresentou 232 $\mu\text{g} / \text{L}$ de iodo, variando de 103 a 272 $\mu\text{g} / \text{L}$, maior que no verão que foi de 88 $\mu\text{g} / \text{L}$ de iodo.

Essa tendência foi semelhante ao trabalho realizado na Espanha, onde a comparação foi entre o teor de iodo e o de gordura no leite pausterizado (desnatado, semi-desnatado e integral), os resultados obtidos mostraram que a concentração de iodo no leite desnatado foi maior (273 52 $\mu\text{g} / \text{L}$), do que no leite semidesnatado (254 57 $\mu\text{g} / \text{L}$) ou no leite integral (251 61 $\mu\text{g} / \text{L}$) ($P < 0,0001$), contudo sem diferenças entre esses dois últimos (Soriguer et al., 2011). Já Castro et al. (2012) não observaram diferença com a composição do leite (gordura, proteína, lactose) e a concentração de iodo do leite.

A CCS (Tabela 5) teve variação importante, pois a contagem diminuiu conforme a concentração de iodo aumentou ($P < 0,05$) podendo estar relacionado ao fato do iodo desempenhar papel imunológico, uma vez que quando colocado num meio contendo iodeto os leucócitos (células do sistema imune) sintetizam tiroxina (hormônio extratiroidiano), assim, o iodo/iodeto podem melhorar o sistema imunológico e melhorar a eliminação de infecções (Venturi and Venturi, 2014; Bilal et al., 2017). Além desse

aspecto, o iodo tem ação desinfetante e é usado há anos e mostra ser eficiente no *pré* e *pós-dipping* (Matt et al., 2011).

Este resultado tem relação direta com a capacidade antioxidante do leite ($P < 0,05$) com a concentrações de iodo (Tabela 5). Pois quanto maior o acúmulo de iodo na glândula mamária, mais efetiva é a capacidade antioxidante deste mineral (Van der Reijden et al., 2017) uma vez, que o iodo é um dos elementos mais ricos em elétrons na dieta de organismos marinhos e terrestres, logo, na forma de iodeto (I-) este elemento atua como um doador de elétrons através das enzimas peroxidase que é o antioxidante inorgânico mais primitivo em todas as células concentradoras de iodeto de algas marinhas primitivas à vertebrados mais recentes (Venturi and Venturi, 2014) (Tabela 5).

Ou seja, o iodo na presença do peróxido de hidrogênio e peroxidase diminui o dano por radicais livres de oxigênio (Ahad and Ganie, 2010; Venturi and Venturi, 2014) e dessa forma aumenta a capacidade antioxidante do leite.

Os ácidos graxos de cadeia média e curta diferiram em relação a concentração de iodo no leite ($P < 0,05$). Veselý et al. (2018) incluíram colza na alimentação de vacas e observaram que houve diminuição na concentração de iodo no leite por causa do conteúdo de glucosinolato, os autores verificaram também, que o perfil dos ácidos graxos modificou, pois aumentou o teor de AGMI e diminuiu o teor de ácido palmítico (C16: 0) e AGPI em comparação com a alimentação com soja extrusada com gordura total ($P > 0,05$) enquanto o conteúdo total de AGS e AGI não foi influenciado ($P > 0,05$).

Como visto nos resultados anteriormente mencionados, a concentração de iodo no leite sofre influência de diversos fatores, como manejos de produção, de criação e de ordenha (Tabela 9). Deste modo, propriedades que fazem uso de limpeza de ordenhadeira completa, com uso de detergente neutro, ácido e água quente (Tabela 10), tem menor concentração de iodo no leite, essa variável indica que manejo de limpeza realizado de

forma completa e correta, diminui a probabilidade de contaminação ou até mesmo adêrência de elementos externos ao leite.

Resultado diferente foi observado por Castro et al. (2010) que notaram níveis de iodo mais alto em propriedades que utilizavam sistema de limpeza automático do tanque de expansão. Os autores sugeriram que possivelmente, a causa pode ser resíduos dos desinfetantes presente na tubulação da máquina ordenhadeira que contaminam o leite

Outro aspecto que deve ser considerado é o fato da água ser fonte natural de iodo, assim a água pode contribuir com o iodo no leite (Risher et al., 2001). A água é umas das principais fontes de iodo no leite para os ruminantes Miller (2012) e apresenta formas variadas desse mineral como iodo orgânico, iodeto e iodato (Rogerson, 2018).

Como no presente trabalho e no de Castro et al. (2010) o sistema de alimentação teve associação com o aumento de iodo no leite, sendo o fornecimento da ração como dieta total superior ao de fornecimento de concentrado separado, os autores acreditam que este resultado seja pela presença de mineral na dieta total.

A pastagem na alimentação das vacas tem um peso importante na variação de iodo no leite, pois segundo Miller et al. (1988) e Franciszek Brzóska et al. (2009) o iodo contido no leite de vaca tem como sua principal origem a dieta do animal. Estima-se que entre 80 e 90% do iodo ingerido pelas vacas é absorvido e a maioria do iodo que não é captado pela glândula tireoide é excretada via urina e/ou leite.

O iodo nas forrageiras tem seu valor extremamente variável, pois depende da quantidade de iodo presente no solo. Comparando a prática de consumo de concentrado nestas mesmas propriedades é possível observar que a porcentagem que usa concentrado na forma de dieta total é maior ($P = 0,00$), ou seja, quanto maior o nível de iodo, menor o consumo de pasto e maior é o de concentrado.

Esse comportamento explica o aumento do iodo no leite, pois alguns alimentos contêm compostos goitrogênicos cianogênicos que prejudicam a captação de iodo pela tireoide e liberam hidrogênio cianeto no seu metabolismo que reage com os grupos sulfato formando tiocianato, estes têm, aproximadamente, o mesmo tamanho do iodeto e compete com iodeto por sítios de ligação na tireoglobulina, desse modo, reduz a eficiência de captação e retenção de iodeto pela glândula tireoide (Goff, 2018).

Os compostos glicosídeos cianogênicos podem ser encontrados em diversos vegetais, incluindo soja crua, milho, batata-doce, trevo branco, milheto, mandioca e também o tiocianato na colza (Haldimann et al., 2005; Flachowsky et al., 2014).

Segundo Laurberg et al. (2002) a alimentação das vacas com colza, conhecida no Brasil como canola, pode transferir tiocianato para o leite e conseqüentemente diminuir o teor de iodo, provavelmente, por inibição competitiva do NIS na glândula mamária, desse modo, alterações na alimentação das vacas leiteiras podem alterar o conteúdo de iodo do leite do consumidor e isso pode influenciar o risco de doenças da tireoide na população, por excesso ou carência desse mineral.

Resultados semelhantes ao do presente trabalho, também foram observados por Pennington (1990), que corrobora as variações no teor de iodo do leite são geralmente atribuída à proporção de alimentação das pastagens versus a ração enriquecida com iodo. A alimentação e o iodo se correlacionaram (Tabela 9 e 10) logo, o mesmo resultado foi corroborado por Rogerson, (2018), que observou associação da dieta e o conteúdo de iodo do leite.

Segundo Firkins and Eastridge (1994) com o aumento do iodo presente na alimentação à base de óleos ou gorduras, a ingestão de matéria seca e AGCM diminui, resultado análogo pode ser observado na Tabela 9, que o aumento na concentração de iodo diminuiu a ingestão de pastagem e também a concentração de AGCM (Tabela 5).

Resultados contrários ao trabalho foram observados por Weiss et al. (2015), que alimentaram vacas com farelo de canola, para que a substâncias goitrogênicas inibisse a transferência de iodo para o leite, no entanto, o resultado obtido foi aumento de iodo sérico e diminuição de iodo no leite, sendo que o leite de vacas alimentadas com 0,5 mg / kg de I tinha 358, 289 e 169 µg de I / L para os tratamentos com farelo de canola 0; 3,9% e 13,9%. Para vacas alimentadas com 2,0 mg / kg de I, as concentrações de leite I foram 733, 524 e 408 µg / L, respectivamente.

CONCLUSÃO

A concentração de iodo no leite dos tanques das propriedades leiteiras estudadas foi diferente e permitiu agrupar em três *cluster*: baixa, média e alta concentração.

Nas mesorregiões estudadas um novo agrupamento foi realizado e a maior concentração de iodo obtida foi encontrada na região oeste, seguido pela região centro oriental e centro norte. A região oeste possui predominância de solos argilosos, os quais possuem concentrações mais alta de iodo.

A diferença de criação e manejo de ordenha nas propriedades contribuíram para a variação da concentração de iodo no leite.

Algumas variáveis indicaram relação com a concentração de iodo no leite, dentre elas a limpeza de ordenha, pois propriedades que fizeram uso de detergentes, ácido ou alcalino e água quente apresentaram, menores concentrações de iodo no leite, o que remete que parte do iodo pode ser oriundo por contaminação na ordenha, especialmente no caso da maioria das propriedades que realizaram *pré-dipping* ter maior concentração de iodo.

A dieta também teve influência, já que os animais criados em sistema de pastejo com adubação orgânica apresentaram a menor concentração de iodo no leite quando

comparados aos animais que se alimentam de dieta completa com concentrado, volumoso e mineral.

Além desses aspectos, o leite com concentração maior de iodo, apresentou elementos com características nutracêuticas importantes, pois quanto maior a concentração de iodo no leite maior foi a capacidade antioxidante e maior concentração de CLA, e uma menor razão ômega 6 e 3.

REFERÊNCIAS

- Ahad, F., and S.A. Ganie. 2010. Iodine, Iodine metabolism and Iodine deficiency disorders revisited.. *Indian J. Endocrinol. Metab.* 14:13–7.
- Anvisa. 2008. Resolução Da Diretoria Colegiada – Rdc N° 44, De 19 De Setembro De 2011.
- Anvisa. 2013. Resultado do Monitoramento do Teor de Iodo no sal Ano : 2013 1–6.
- Bánkuti, F.I., M.M. Caldas, S.M.S. Bánkuti, and G. Granco. 2017. Spatial dynamics: A new milk corridor in Paraná state, Brazil. *Semin. Agrar.* 38:2107–2117. doi:10.5433/1679-0359.2017v38n4p2107.
- Benkhedda, K., A. Robichaud, S. Turcotte, F.J. Bérardin, and K.A. Cockell. 2009. Determination of total iodine in food samples using inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 92:1720–1727.
- Bilal, M.Y., S. Dambaeva, J. Kwak-Kim, A. Gilman-Sachs, and K.D. Beaman. 2017. A role for iodide and thyroglobulin in modulating the function of human immune cells. *Front. Immunol.* 8:1–13. doi:10.3389/fimmu.2017.01573.
- Blaško, J., R. Kubinec, R. Górová, I. Fábry, W. Lorenz, and L. Soják. 2010. Fatty acid composition of summer and winter cows' milk and butter. *J. Food Nutr. Res.* 49:169–177.
- Brzóska, F., Z. Szybiński, and B. Śliwiński. 2009. Iodine concentration in Polish milk — variations due to season and region. *Endokrynol. Pol. J. Endocrinol.* 60:449–454.
- Cabral, J.F., M.A.P. da Silva, T.S. Carvalho, R.B. Brasil, J.C. Garcia, R.B.S. Neves, E.S. Nicolau, and M.E. Lage. 2015. Procedure for collecting milk sample and the number of milkings in relation to chemical composition and somatic cells of the fresh milk. *African J. Agric. Res.* 10:4623–4631. doi:10.5897/ajar2015.9183.
- Campos, R.D.O., and H.E. Ramos. 2014. Nutrição de Iodo na Infância: análise do teor de Iodo informado em fórmulas infantis para lactentes. *Rev. Ciências Médicas e Biológicas* 12:454. doi:10.9771/cmbio.v12i4.9201.
- Casali, M., B.S. De Mendonça, M.M. De Brito, G. Rojas, P. Gustavo, L. Lima, T. Teixeira, J.C. Damasceno, and F.I. Bánkuti. 2020. Information asymmetry among dairy producers in Paraná , Brazil Assimetria de informação entre produtores de leite no Estado do Paraná 293–304. doi:10.5433/1679-0359.2020v41n1p293.
- Castro, S. B., Lacasse, P., Fouquet, A., Beraldin, F., Robichaud, A., & Berthiaume, R. 2010. Iodine Concentration in Milk Sampled from Canadian Farms. *J. Food Prot.* 73:1658–1663. doi:10.4315/0362-028X-73.9.1658.

- Cereda, M.P., and M.C.Y. Mattos. 1996. Linamarin - The toxic compound of cassava. *J. Venom. Anim. Toxins* 2:6–12. doi:10.1590/s0104-79301996000100002.
- Dahl, L., J.A. Opsahl, H.M. Meltzer, and K. Julshamn. 2003. Iodine concentration in Norwegian milk and dairy products. *Br. J. Nutr.* 90:679–685. doi:10.1079/bjn2003921.
- Domingos, M.M.M., N.V.L. Gasparetto, P. Nakashima, and R.R. & J.T. Filho. 2009. Estrutura de um nitossolo vermelho latossólico eutroférico sob sistema plantio direto, preparo convencional e floresta. *R. Bras. Ci. Solo* 1:1517–1524.
- Effects of iodine intake and teat-dipping practices on milk iodine concentrations in dairy cows. 2012. *J. Dairy Sci.* 95:213–220. doi:10.3168/jds.2011-4679.
- Fávero, Luiz Paulo Lopes; BELFIORE, Patrícia Prado; SILVA, Fabiana Lopes da; CHAN, B.L. 2009. Análise de dados: modelagem multivariada para tomada de decisões. USP-FEA,.
- Flachowsky, G., K. Franke, U. Meyer, M. Leiterer, and F. Schöne. 2014. Influencing factors on iodine content of cow milk. *Eur. J. Nutr.* 53:351–365. doi:10.1007/s00394-013-0597-4.
- Giovannini, C.I., P.A. dos Santos, T.S. de Carvalho, J.F. Cabral, T.E. Silva, and E.S. Nicolau. 2015. Milk quality in high production systems during dry and rainy seasons according to normative instruction N 62. *African J. Biotechnol.* 14:2957–2965. doi:10.5897/ajb2015.14716.
- Goff, J.P. 2018. Invited review: Mineral absorption mechanisms, mineral interactions that affect acid–base and antioxidant status, and diet considerations to improve mineral status. *J. Dairy Sci.* 101:2763–2813. doi:10.3168/jds.2017-13112.
- Hair, J. F., Black, W. C., Babin, B. J., Anderson, R. E., & Tatham, R.L.. 2009. Análise Multivariada de Dados. Bookman Editora.
- Haldimann, M., A. Alt, A. Blanc, and K. Blondeau. 2005. Iodine content of food groups. *J. Food Compos. Anal.* 18:461–471. doi:10.1016/j.jfca.2004.06.003.
- Institute of Medicine (U.S.). Panel on Micronutrients. 2001. DRI: Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc: A Report of the Panel on Micronutrients and the Standing Committee on the Scientific. 6:1-800.
- Iso - International Organization for Standardization. 1978. ISO. Method. Geneve.
- Firkins, J. L. and M.L. Eastridge. 1994. Assessment of the Effects of Iodine Value on Fatty Acid Digestibility, Feed Intake, and Milk Production. *J Dairy Sc* 77:2357–2366.
- Joseph J.D., and R.G. Ackman. 1992. Capillary column gas chromatography method for analysis of encapsulated fish oil and fish oil ethyl esters: collaborative study. *J. AOAC Intitute* 75:488–506.
- Kaufmann, S., and W.A. Rambeck. 1998. Iodine supplementation in chicken, pig and cow feed. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl).* 80:147–152. doi:10.1111/j.1439-0396.1998.tb00517.x.
- Kiokias, S.N., C.P. Dimakou, I. V. Tsaprouni, and V. Oreopoulou. 2006. Effect of compositional factors against the thermal oxidative deterioration of novel food emulsions. *Food Biophys.* 1:115–123. doi:10.1007/s11483-006-9015-2.
- Laurberg, P., S. Andersen, N. Knudsen, L. Ovesen, S.B. Nøhr, and I. Bülow Pedersen. 2002. Thiocyanate in food and iodine in milk: From domestic animal feeding to improved understanding of cretinism. *Thyroid* 12:897–902. doi:10.1089/105072502761016520.

- Leiterer, M., D. Truckenbrodt, and K. Franke. 2001. Determination of iodine species in milk using ion chromatographic separation and ICP-MS detection. *Eur. Food Res. Technol.* 213:150–153. doi:10.1007/s002170100333.
- Lima, L.F., and A.M. Navarro. 2018. Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes - Iodo / ILSI Brasil.
- Macedo, M. de S., R.A. Teixeira, É. Bonomo, C.A.M. da Silva, M.E. da Silva, E. Sakurai, M. Carneiro, and J.A. Lamounier. 2012. Deficiência de iodo e fatores associados em lactentes e pré-escolares de um município do semiárido de Minas Gerais, Brasil, 2008. *Cad. Saude Publica* 28:346–356. doi:10.1590/S0102-311X2012000200013.
- Martin, C.A., C.C. Oliveira, J.V. Visenteiner, M. Matsushita, and N.E. De Souza. 2008. Optimization of the selectivity of a cyanopropyl stationary phase for gas chromatographic analysis of trans fatty acids. *Journal Chromatogr. Anal.* 1194:111–117.
- Matt, D., Ewa Rembialkowska, Anne Luik, Elen Peetsmann, and Sirli Pehme. 2011. Quality of Organic vs. Conventional Food and Effects on Health. I.H. Williams, ed. Estonian.
- Mehdi Hedayati, A. Ordoorkhani, A. Maryam Sadat Daneshpour, and F. Azizi. 2007. Rapid Acid Digestion and Simple Microplate Method for Milk Iodine Determination. *J. Clin. Lab. Anal.* 21:286–292. doi:10.1002/jcla.
- Melo, W. de O., B.M. Monteiro, L.C. da S. Chaves, E.R.D. Santos, D.C. de Souza, B.S. de Amorim, S.P. de Faria Junior, J.D. Ribeiro Filho, C. Faturi, and R.B. Viana. 2018. Ultrasound spectroscopy as an alternative method to measure the physical-chemical constituents of buffalo milk. *Ciência Rural* 48:1–6. doi:10.1590/0103-8478cr20170447.
- Miller, J.K., E.W. Swanson, and R.G. Cragle. 1965. Effect of Feeding Thiocyanate to Dairy Cows on Absorption and Clearance of Intramammary Iodine. *J. Dairy Sci.* 48:1118–1121. doi:10.3168/jds.S0022-0302(65)88407-7.
- Miller, J.K., E.W. Swanson, and G.E. Spalding. 1975. Iodine Absorption, Excretion, Recycling, and Tissue Distribution in the Dairy Cow. *J. Dairy Sci.* 58:1578–1593. doi:10.3168/jds.S0022-0302(75)84753-9.
- Murphy, J.J., J.F. Connolly, and G.P. McNeill. 1995. Effects on milk fat composition and cow performance of feeding concentrates containing full fat rapessed and maize distillers grains on grass-silage based diets.. *Livest. Prod. Sci.* 44:1–11.
- National Research Council (NRC). 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. Washington, DC.
- Pennington, J.A.T. 1990. Iodine Concentrations in US Milk : Variation Due to Time , Season , and Region. *J. Dairy Sci.* 73:3421–3427. doi:10.3168/jds.S0022-0302(90)79039-X.
- Rasmussen, L.B., E.H. Larsen, and L. Ovesen. 2000. Iodine content in drinking water and other beverages in Denmark. *Eur. J. Clin. Nutr.* 54:57–60. doi:10.1038/sj.ejcn.1600893.
- van Der Reijden, O.L., V. Galetti, M. Hulmann, A. Krzystek, M. Haldimann, P. Schlegel, E. Manzocchi, J. Berard, M. Kreuzer, M.B. Zimmermann, and I. Herter-Aeberli. 2018. The main determinants of iodine in cows' milk in Switzerland are farm type, season and teat dipping. *Br. J. Nutr.* 119:559–569. doi:10.1017/S0007114517003798.
- van Der Reijden, O.L., M.B. Zimmermann, and V. Galetti. 2017. Iodine in dairy milk: Sources, concentrations and importance to human health. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 31:385–395. doi:10.1016/j.beem.2017.10.004.

- Risher, J., G. Diamond, S.G. Swarts, Richard Amata, and N. Syracuse Research Corporation, North Syracuse. 2001. Toxicological Profile for Iodine. Clifton Ro. 2001, Atlanta, Georgia.
- Rogerson, C.M. 2018. Groundwater as a Source of High Iodine Levels in Milk in Eastern and Southwestern Ontario Dairy Herds. Tesis 129.
- Rufino, M.S.M., Alves, R.E., Brito, E.S., Morais, S.M., Sampaio, C.G., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F.D. 2007. Metodologia científica: Determinação da atividade 34 antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{•+}. Comun. Técnico Embrapa 128.
- Sandell, E.B., and I.M. Kolthoff. 1937. Micro determination of iodine by a catalytic method. *Mikrochim. Acta* 1:9–25. doi:10.1007/BF01476194.
- Singleton V. L., and J.A. Rossi. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16:144–158.
- Soriguer, F., C. Gutierrez-Repiso, S. Gonzalez-Romero, G. Oliveira, M.J. Garriga, I. Velasco, P. Santiago, G.M. de Escobar, and E. Garcia-Fuentes. 2011. Iodine concentration in cow's milk and its relation with urinary iodine concentrations in the population. *Clin. Nutr.* 30:44–48. doi:10.1016/j.clnu.2010.07.001.
- Tazebay, U.H. 2011. Regulation of the Functional Na⁺/I⁻ Symporter (NIS) Expression in Breast Cancer Cells. *Breast Cancer - Recent Adv. Biol. Imaging Ther.* 12:103–122. doi:10.5772/21721.
- Unicef 2019. The State of the World's Children 2019. Children, Food and Nutrition: Growing well in a changing world. UNICEF, New York.
- Venturi, S. 2001. Is there a role for iodine in breast diseases?. *Breast* 10:379–382. doi:10.1054/brst.2000.0267.
- Venturi, S., and M. Venturi. 2014. Iodine, PUFAs and iodolipids in health and diseases: An evolutionary perspective. *Hum. Evol.* 29:185–205.
- Veselý1, A., L. Křížová1, J. Třináctý1, S. Hadrová2, M. Navrátilová, I. Herzig, and M. Fišera. 2018. Changes in fatty acid profile and iodine content in milk as influenced by the inclusion of extruded rapeseed cake in the diet of dairy cows. *Czech J. Anim. Sci.* 54:201–209. doi:10.17221/1721-CJAS.
- Visentainer, J.V., M.R.B. Franco, and N.E. Souza. 2012. Ácidos Graxos Em Óleos e Gorduras: Identificação e Quantificação. EDUEM. Maringá.
- Vorlová, L., L. Hodulová, I. Borkovcová, H. Přidalová, R. Kostrhounová, M. Klimešová-Vyleťelová, and K. Šustová. 2014. Iodine content in bulk tank milk samples in relation to dairy farm size. *Acta Vet. Brno* 83:S9–S13. doi:10.2754/avb201483S10S9.
- Weiss, W.P., D.J. Wyatt, D.H. Kleinschmit, and M.T. Socha. 2015. Effect of including canola meal and supplemental iodine in diets of dairy cows on short-term changes in iodine concentrations in milk. *J. Dairy Sci.* 98:4841–4849. doi:10.3168/jds.2014-9209.
- Zimpel, R., F.I. Bánkuti, M.A. Zambom, K.C. Kuwahara, S.M.S. Bánkuti, R. Zimpel, F.I. Bánkuti, M.A. Zambom, K.C. Kuwahara, and S.M.S. Bánkuti. 2017. Characteristics of the dairy farmers who perform financial management in Paraná State, Brazil. *Rev. Bras. Zootec.* 46:421–428. doi:10.1590/s1806-92902017000500008.

VI – Identificação e quantificação de resíduos de antibióticos (ceftiofur, cloxacilina, enrofloxacina) no leite da região norte central do estado do Paraná – Brasil

*Antibiotic residues (ceftiofur, cloxacillin, enrofloxacin) identification and quantification
in milk from the north central region of the Paraná State- Brazil*

(Food Control)

Resumo

Objetivou-se com este trabalho identificar e quantificar resíduos de antibióticos: ceftiofur, cloxacilina, enrofloxacina, no leite cru de propriedades leiteiras da região norte do estado do Paraná e a causa. A pesquisa foi realizada em 116 propriedades e foram coletadas amostras de leite, junto com a arguição sobre todo manejo da propriedade em um questionário previamente elaborado. Os antibióticos foram extraídos usando o método QuEChERS modificado, e detectado e quantificados no UPLC-MS/MS. Das propriedades estudadas 10 (8,63%) apresentaram resultados de leites contaminados com resíduo de antibiótico. Houve diferença ($P < 0,05$) entre o tempo de descarte do leite e a presença de antibióticos, e as propriedades com resultado positivo faziam descarte com menos de 5 dias e dentro do período de carência. As variáveis de manejo sanitário e de higiene durante ordenha não houve diferença ($P > 0,05$). Contudo a contaminação do leite por antibióticos é proveniente do armazenamento do leite de animais em fase de tratamento com substâncias antimicrobianas dentro do período de carência, as amostras do leite positivo apresentou concentrações dentro do limite máximo de resíduo, portanto sendo próprio para o consumo, o método de extração QuEChERS modificado e a quantificação por UPLC-MS/MS foi eficiente na detecção de baixas concentrações de resíduos de antibióticos no leite cru de tanques a granel.

Palavras-chave: leite de tanque, LMR, mastite, QuEChERS

Abstract

The study aimed to identify and quantify antibiotic residues: ceftiofur, cloxacillin, enrofloxacin, in raw milk from dairy farms in the northern region of the Paraná state and its cause. The survey was carried out on 116 properties and milk samples were collected, together with the question about all property management of the property in a previously prepared questionnaire. Antibiotics were extracted using the modified QuEChERS method, and detected and quantified in the UPLC MS / MS. From the properties studied, 10 (8.63%) showed a result of milk contaminated with antibiotic residue. There was a difference ($P < 0.05$) between the time of milk disposal and the antibiotics presence, where the properties with a positive result were discarded within 5 days and within the grace period. The variables of sanitary management and hygiene during milking were not different ($P > 0.05$). However, the milk contamination by antibiotics comes from the storage of milk from animals undergoing treatment with antimicrobial substances within the grace period, the positive milk sample showed concentrations within the maximum residue limit, therefore being suitable for

consumption, the modified QuEChERS extraction method and UPLC-MS / MS quantification was efficient in detecting low concentrations of antibiotic residues in raw milk from bulk tanks.

Keywords: milk tank, mastitis, MRL, QuEChERS.

1 Introdução

O leite de qualidade deve apresentar requisitos mínimos dos componentes químicos, ser livre de contaminantes, isento de agentes inibidores de crescimento microbiano e deve ser oriundo de animais sadios (Brasil, 2018) também como, não deve apresentar resíduos de produtos veterinários e contaminantes acima do limite máximo previsto nos órgãos reguladores da saúde. (Anvisa, 2018; Who, 2018).

De acordo com as organizações de saúde, alimentos contaminados com antimicrobianos ou quaisquer medicamentos veterinários, podem causar risco a saúde pública (ANVISA, 2018; European Union, 2015; WHO, 2018). Dessa forma, conter o uso indiscriminado de antimicrobianos na produção animal visto à importância, tem sido um plano de ação global (WHO, 2018).

Na produção de leite, os antimicrobianos são usados em doenças das glândulas mamárias (Scherpenzeel et al., 2016). Contudo, o uso excessivo em práticas com fins profiláticos e terapêuticos têm causado o acúmulo e resíduos destes produtos no leite, dessa forma colocando em risco a saúde pública e causando prejuízos as indústrias de derivados lácteos (Nascimento et al., 2001; Martins et al., 2016).

Na produção de leite, o antibiótico mais utilizados em tratamentos é o ceftiofur, uma cefalosporina de terceira geração que em geral resulta em carência de 0 horas após aplicação para retirada do leite, contudo tem sido alvo de reclamações de resultados positivos em testes de triagem nos laticínios quanto a presença de resíduos no tanque de leite a granel (Durel et al., 2019).

A cloxacilina representante das penicilinas está entre as drogas mais utilizadas como agente profilático na terapia da vaca seca ou na terapia contra a inflamação das

glândulas mamárias (Burmańczuk et al., 2017). Este antibiótico da classe do β -lactâmico é uma penicilina semissintética e é usada principalmente na terapia e prevenção da mastite induzida por *Staphylococcus aureus* (Dračková et al., 2009).

Outra droga veterinária utilizada no tratamento de mastite subclínica e clínica causada por *Staphylococcus aureus*, como também na prevenção da mastite é a enrofloxacina (Martínez-Cortés et al., 2016) que pertence ao grupo das quinolonas e é umas das drogas que está no grupo de medicamento de alto risco quanto a resistência bacteriana (Navrátilová et al., 2011).

Os limites máximos destes antibacterianos no leite (LMR) é de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para o ceftiofur, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para cloxacilina e para enrofloxacina o LMR é de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (European Union, 2015; ANVISA, 2018; FAO/WHO, 2018).

Segundo Landers et al. (2012) o uso de antimicrobianos é uma preocupação crescente em função da resistência bacteriana aos princípios ativos e desenvolvimento de organismos resistentes que resultam em infecções humanas. O controle eficiente do uso de medicamentos veterinários, especialmente os antibióticos, é muito importante para garantir que não haja resíduos, a fim de que prevaleça a segurança e a qualidade do leite e seus derivados.

Neste contexto, objetivou-se com este estudo identificar se há contaminação por resíduos de antibióticos no leite cru de propriedades leiteiras localizadas na região norte do estado do Paraná e sua causa.

2 Material e Métodos

2.1 Local

O estudo foi desenvolvido em propriedades da região Norte Central do estado do Paraná – Brasil e abrangeu 16 cidades, num perímetro de 245 km com uma área de 3460 km² aproximadamente (Figura 1), no período de março de 2015 a setembro de 2016

incluindo 116 propriedades que escolhidas aleatoriamente e sem aviso prévio para visita.

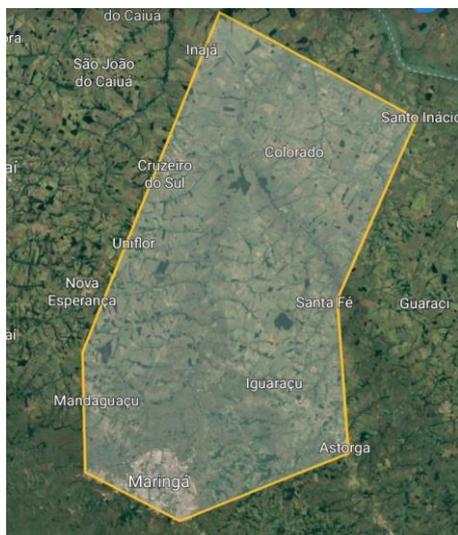


Figura 1: Imagem demarcada da área e perímetro da região de coleta de dados. Fonte: Google Earth (2020).

2.2 Amostras experimentais

Após visita e explicação aos proprietários e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido foi aplicado um questionário previamente elaborado, baseado em Castro et al. (2010) para coleta de dados sobre a produção de leite e o sistema de produção.

Juntamente com o questionário, amostras de leite foram coletadas no tanque de expansão após homogeneização de 10 minutos, em frascos de polietileno de 50 mL sem adição de conservante e acondicionadas em caixas com gelo seco e depois armazenadas em ultra freezer -80°C para posterior análise.

Após a coleta, as amostras de leite foram submetidas a testes rápidos com *kits* comerciais para diagnóstico de contaminação por resíduos de antibióticos. Os testes utilizados foram BetaStar® S Combo e o BetaStar® S da ©Neogen Corporation, que detecta os grupos de antibióticos β -lactâmicos, tetraciclinas e tem capacidade de identificar a presença de desfuroil-ceftiofur (um metabólito do ceftiofur) que é o

ingrediente ativo em tratamentos populares contra mastite. As amostras foram analisadas no bloco aquecedor Tecnibra BA-75®.

2.3 Preparo das amostras

A extração dos antimicrobianos enrofloxacina, ceftiofur e cloxacilina do leite foi realizada a partir do método QuEChERS com modificações segundo (Grabsk et al., 2019).

Foi utilizado 10 mL de leite homogeneizado para extração dos antibióticos, que foi adicionado em tubo de centrífuga de 50 mL com 10 mL de acetonitrila (ACN) com 1% de ácido acético (v:v), pH entre 3 e 4, mais 6 g de NaSO₄ anidro e agitados em vortex por 2 min. Na centrífuga o tubo permaneceu por 10 min na velocidade de 6000 rpm a 4°C, em seguida, após a centrifugação o sobrenadante foi transferido para um balão de 25 mL.

Logo, no tubo de extração foi adicionado 10 mL de ACN com 1% de hidróxido de amônio (v:v) seguido de agitação por 2 min em vortex.

Posteriormente, o conteúdo foi novamente centrifugado por 10 min a 6000 rpm a 4°C e o sobrenadante foi transferido para o balão de 25 mL, adicionado juntamente com o sobrenadante da extração anterior e diluído com ACN até completar o volume do balão.

Na etapa de *clean-up*, em um tubo contendo 100 mg de C18, 50 mg de PSA e 1 g de NaAc anidro foi adicionado 5 mL do extrato e agitados em vortex por 2 min. Em seguida o tubo foi centrifugado durante 10 min a 6000 rpm a 4°C.

Depois, para a concentração, o sobrenadante foi transferido para um balão de 50 mL e rotaevaporado até a secura. Logo o extrato foi reconstituído com 2,0 mL de água/ACN (95:5; v:v) com 0,1% de ácido acético (v:v). Em seguida, para análise o extrato foi filtrado em filtro de seringa de náilon (porosidade de 0,20 µm) e 1000 µL do extrato foi transferido para um *vial* e analisado por UPLC-MS/MS.

2.4 Análise de antimicrobianos

Para a identificação e quantificação dos antibacterianos foi utilizado um cromatógrafo a líquido de ultraperformance ACQUITY UPLC System da Waters (Massachusetts, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo ACQUITY TQD da Waters (Massachusetts, EUA) com ESI utilizado no modo positivo.

A separação cromatográfica foi realizada utilizando a coluna ACQUITY UPLC® BEH C18 (1,7 μm , 50 mm x 2,1 mm) a 30°C. A fase móvel foi composta por: água (A) e ACN (B), ambas fases com 0,1% de ácido fórmico para a eluição dos antibacterianos extraídos pelo método. O perfil do gradiente utilizado: 0-0,50 min, 98% A; 2,00 min, 70% A; 3,00 min, 50% A; 4,00 min, 30% A; 5,00-9,00 min, 2% A; 9,01-10,00 min, 98% A, com fluxo de 250 $\mu\text{L min}^{-1}$ e o volume de injeção foi de 10 μL .

Foram otimizadas a ionização e as condições para cada antibacteriano estudado por infusão a vazão de 5 $\mu\text{L min}^{-1}$ em uma concentração adequada preparada em metanol:água (50:50, v:v) contendo 0,1% de ácido fórmico (v:v). Foram observadas para os analitos ceftiofur, cloxacilina e enrofloxacin, duas transições de fragmentação, uma para quantificação e outra para identificação. Os seguintes parâmetros do espectrômetro foram semelhantes para os três analitos: temperatura da fonte a 150°C, tensão capilar de 2,0 kV, nitrogênio como gás de dessolvatação a taxa de 600 L h^{-1} , nitrogênio como gás nebulizador a vazão de 50 L h^{-1} , temperatura de dessolvatação a 350°C e argônio foi usado como gás de colisão.

2.5 Curva de calibração

Foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) os padrões dos antibacterianos ceftiofur (CEFT); cloxacilina (CLOX); enrofloxacin (ENRO). As soluções estoque foram preparadas com concentração igual a 1,0 mg mL^{-1} e as curvas

de calibração para ambas foram preparadas em água ultrapura variando as concentrações de 1 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todas as soluções foram armazenadas a -20°C (Grabsk et al., 2019).

2.6 Análise Estatística

A análise de dados foi realizada no SPSS *Statistics* 1.8 versão 20. O teste de Qui-quadrado de Pearson foi utilizado como procedimentos estatísticos. Foi aplicado o teste de qui-quadrado de aderência para testar a distribuição de frequências do uso de antibiótico nas propriedades estudadas. E o teste de Qui-quadrado de independência para comparação do tipo de antibiótico usado nas propriedades e o tempo de descarte do leite, de acordo com os respectivos modelos:

Modelo 1: Teste de aderência:

$$\chi^2 = \sum_i^n = 1 \frac{(O_i - E_i)}{E_i} = \sum_i^n = 1 \frac{(o_i / N - p_i)^2}{p_i} = ;$$

Modelo 2: Teste de independência

$$\begin{aligned} \chi^2 &= \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}} \\ &= N \sum_{i,1} p_i p_j \frac{((O_{ij}/N) - p_i p_j)^2}{p_i \cdot p_j} = \end{aligned}$$

Em que,

χ^2 = Estatística de teste cumulativa de Pearson, que assintoticamente se aproxima da distribuição Qui-quadrado;

O_i = Número de observações do tipo i ;

N = Número total de observações;

$E_i = Np_i$ = A frequência esperada (teórica) do tipo i , avaliada sob a hipótese nula de que a fração do tipo i na população p_i ;

n = O número de células na tabela. O limiar para significância estatística foi 5%.

3 Resultados

O teste de Qui-quadrado de aderência mostrou que os dados obtidos são consistentes com a distribuição proposta:

$$[\chi^2 (115) = 0,456; p > 0,05].$$

Os leites das propriedades foram analisados com dois testes, primeiramente, com os *kits* comerciais BetaStar® S Combo e o BetaStar® S e em seguida com o método de extração QuEChERS com modificações no UPLC-MS/MS. Os resultados de detecção de antibiótico usando os *kits* em todas as amostras foram negativos. Já pelo método laboratorial com o QuEChERS modificado, resíduos de antibióticos foram detectados no leite, sendo que de 116 amostras das propriedades estudadas, 10 (8,63%) estavam contaminadas.

Não houve diferença significativa ($P = 0,45$) para as três categorias de resíduos de antibióticos no leite, entretanto, o antibiótico de menor ocorrência no leite foi a Cloxacilina, apenas uma amostra de leite de uma propriedade (0,9%) estava contaminada com resíduo desse antibiótico (Tabela 1). Para o Cefotiofur houve dois casos de detecção positiva com o percentual de 2,6% (Tabela 1). A ocorrência de contaminação do leite mais comumente entre as propriedades foi por enrofloxacin 5,2% das propriedades leiteiras, sendo seis resultados positivos para a presença desse fármaco no leite.

Tabela 1: Frequência de propriedades leiteiras com presença de resíduo de diferentes antibióticos no leite.

Resíduo de três classe de antibióticos no leite					
Resultado		Ceftiofur	Cloxacilina	Enrofloxacina	<i>P</i> -valor
Positivo	Frequência (N = 116)	3	1	6	0,45
	(%)	2,6	0,9	5,2	

N: número de propriedades; (%) porcentagem; $P > 0,05$ não apresenta diferença significativa.

O resultado da quantificação dos antibióticos no leite, resultou em apenas uma amostra com valor acima do limite de quantificação, sendo detectado 5,59 ng/mL de ceftiofur.

As demais amostras analisadas tiveram presença de ceftiofur, cloxacilina e enrofloxacina contudo os valores encontrados estavam abaixo do limite de quantificação do método que é foi 1,5 ng/mL para ceftiofur, 5,3 ng/mL para cloxacilina e 8,7 ng/mL enrofloxacina (Tabela 2).

Tabela 2: Resultado das quantificações dos resíduos de antibiótico no leite.

Amostras	Ceftiofur	Cloxacilina	Enrofloxacina
1	<LQ	nd	nd
2	<LQ	nd	nd
3	nd	<LQ	nd
4	nd	nd	<LQ
5	5,59*	nd	<LQ
6	nd	nd	<LQ
7	nd	nd	<LQ
8	nd	nd	<LQ
9	nd	nd	<LQ

<LQ: abaixo do limite de quantificação; nd: não detectado. *concentração em ng/mL (ppb).

De acordo com os resultados listado abaixo houve diferença significativa ($P = 0,00$) para o tempo de descarte do leite em relação à presença de antibióticos (Tabela 3).

Sendo que o maior percentual de propriedades estudadas que apresentaram resultado

negativo para presença de antibiótico fazia o descarte por 9 dias. Logo, o descarte do leite com presença de antibiótico (5,1%) foi inferior a 3 dias (Tabela 3).

Tabela 3: Comparação entre o tempo de descarte e a presença de resíduo de antibiótico

Descarte do leite (dias)	Presença de antibiótico		<i>P</i> -valor
	Positivo	Negativo	
	N (%)	N (%)	
0	-	1 (0,9)	
1	2 (1,7)	-	
2	2 (1,7)	3 (2,6)	
3	6 (5,1)	20 (17,2)	
4	-	9 (7,8)	
5	-	16 (13,8)	0,00
6	-	6 (5,2)	
7	-	12 (10,3)	
8	-	3 (2,6)	
9	-	35 (30,2)	
10	-	1 (0,9)	

N: número de propriedades; (%) porcentagem; $p > 0,05$ não apresenta diferença significativa.

O leite das propriedades do estudo tinha dois destinos de descarte, 90,4% do efetivo total jogava fora o leite com resíduo e 9,6% forneciam o leite para bezerros machos ou outros animais de criação da propriedade, como suínos e cães ($P > 0,05$).

Não houve relação ($P > 0,05$) entre as variáveis de manejo de ordenha estudadas pelo questionário em comparação com a presença de antibióticos no leite (Tabela 4).

Tabela 4: Comparação entre as variáveis do manejo de ordenha do questionário com os resultados de resíduos de antibiótico no leite.

Fatores analisados		Resultado de antibióticos		
Perguntas	Respostas	Positivo N (%)	Negativo N (%)	p - valor
<i>Manejo de pré-dipping</i>				
<i>Pré- dipping</i>	Realiza	5 (4,3)	39 (33,6)	0,25
	Não realiza	4 (3,4)	68 (58,6)	
<i>Manejo de pós- dipping</i>				
<i>Pós-dipping</i>	Realiza	4 (3,5)	56 (48,7)	0,62
	Não realiza	5 (4,3)	50 (43,5)	
<i>Teste de Mastite</i>				
Não Realiza	Não usa	4 (3,4)	65 (56)	0,91
Caneca	Usa	3 (2,6)	23 (19,8)	
CMT (<i>Califórnia mastite teste</i>)	Usa	2 (1,7)	19 (16,4)	

N: número de propriedades; $p > 0,05$ não apresenta diferença significativa.

Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) para as variáveis de manejo sanitário arguidas aos proprietários em relação ao resíduo de antibiótico no leite e prevalência de enfermidades no rebanho (Tabela 5).

Tabela 5: Frequência das variáveis dos questionários, referentes ao manejo sanitário em relação a presença de antibiótico no leite da região norte do Paraná.

Fatores analisados		Resultado de antibióticos		
Perguntas	Respostas	Positivo N (%)	Negativo N (%)	P- valor
Doenças que acometem o rebanho				
Casco	Sim	0,0 (0,0)	18 (15,5)	0,10
	Não	9,0 (7,8)	89 (76,7)	
Mastite	Sim	3,0 (2,6)	54 (46,6)	0,32
	Não	6,0 (5,2)	53 (45,7)	
Aborto	Sim	0,0 (0,0)	17 (14,7)	0,57
	Não	9,0 (7,8)	90 (77,6)	
Carrapato	Sim	7,0 (6,0)	88 (77,9)	0,73
	Não	2,0 (1,7)	19 (16,4)	
Faz uso de antibióticos	Sim	7,0 (6,0)	97 (83,6)	0,22
	Não	2,0 (1,7)	10 (8,6)	
Penicilina	Sim	3,0 (2,6)	22 (19,0)	0,37
	Não	6,0 (5,2)	85 (73,3)	
Oxitetraciclina	Sim	4,0 (3,4)	58 (50,0)	0,57
	Não	5,0 (4,3)	49 (42,2)	
Tetraciclina	Sim	1,0 (0,9)	9,0 (7,8)	0,78
	Não	8,0 (6,9)	98 (84,5),2	
Enrofloxacina	Sim	1,0 (0,9)	5,0 (4,3)	0,40
	Não	8,0 (6,9)	102 (87,9)	
Cloxacilina	Sim	1,0 (0,9)	2,0 (1,7)	0,93
	Não	8,0 (6,9)	105 (90,5)	
Vários	Sim	1,0 (0,9)	16 (13,8)	0,75
	Não	8,0 (7,9)	91 (78,4)	

N: número de propriedades; valores entre parênteses são referentes a porcentagem (%); $P > 0,05$ não apresenta diferença significativa.

4 Discussão

O uso do ceftiofur é eficaz no tratamento de mastite subclínica tendo altas taxas de cura com o uso prolongado (Oliver et al., 2004). O uso deste fármaco tem sido recorrente no tratamento de mastite nas propriedades leiteiras, principalmente por ser conhecido como antibiótico de descarte zero (Alves et al., 2019).

O resultado da análise de ceftiofur no leite positivo, com valor acima do limite de detecção 5,59 ng/mL (Tabela 3), está abaixo do limite máximo de resíduo determinado pelos órgãos de saúde (ANVISA, 2018; FAO/WHO, 2018).

Resultados diferentes foram obtidos por Durel et al. (2019) que analisaram, com *Kits* comerciais amostras de leite de tanque na indústria para ceftiofur, e não encontraram resultados positivos em alíquotas com diluição 1:10, no entanto, no mesmo trabalho, utilizando outras marcas de teste, alguns resultados foram positivo, neste caso, os autores concluíram que se tratava de um resultado duvidoso falso-positivo e reforçaram que se utilizar o produto de forma recomendada pelo fabricante, os produtos injetáveis de ceftiofur são seguros e o leite deve estar livre de resíduos.

Alves et al. (2019) também encontraram resultados positivos de antibióticos no leite. Os autores avaliaram o período residual no leite de vacas tratadas com Ceftiofur utilizando *Kit* comercial (SNAP ST PLUS Test®) e observaram que em 100% das amostras analisadas, o resultado para antibiótico foram positivos no primeiro e segundo dia de uso do medicamento, 66% no terceiro e 0% no quarto dia de uso, respectivamente.

Cristina et al. (2010) detectaram presença de resíduo de ceftiofur com *kit* comercial no leite em até 12 horas após o uso do antibiótico.

Existe uma preocupação com o uso de β -lactâmicos, por desenvolver resistência em cepas bacterianas, como a *E. coli.*, principalmente o ceftiofur que está relacionado ao antimicrobiano ceftriaxona, que é uma droga usada na saúde humana (Gorden, 2017).

Outro aspecto relevante é o uso contínuo de antibióticos na profilaxia para infecções mamárias e na terapia de vaca seca para evitar novos casos de mastite, a cloxacilina é uma alternativa de uso nesse tipo de prevenção (Bhutto et al., 2011). Na Tabela 3, é possível observar que o leite de uma das propriedades estava com presença de resíduo desse antibiótico, entretanto, a concentração foi abaixo do limite de detecção.

Atualmente, existem diversas ferramentas para diagnóstico de mastite com resultados instantâneos, que otimizam o uso de antibióticos, contudo, o que se observa é que quando perguntado aos produtores sobre o uso dessas técnicas, a maioria (56%) não realiza teste de mastite, 19,8% não usa a caneca de fundo preto e 16,4% não realiza o teste de CMT, como também não utiliza manejos de prevenção o *pré-dipping* e *pós-dipping* (Tabela 5). No entanto, quando são questionados sobre o uso de antibióticos 97% relatam que sim, fazem o uso (Tabela 6).

O mesmo foi observado por Griffioen et al. (2016), quando utilizaram um questionário para entrevistar 195 produtores de leite, com o objetivo de determinar a necessidade de diagnóstico microbiológico para mastite clínica, subclínica e tratamento de vaca seca, para otimizar o uso de antibiótico. A resposta dos produtores foi que o teste é importante, no entanto, se o número de produtores que utilizam essa ferramenta fosse maior, o uso indevido de antibióticos para fins terapêuticos seria menor.

Como no presente trabalho Alves et al. (2019), também detectaram presença de penicilina (grupo da cloxacilina) no leite, só que, em período mais prolongado de uso, após 13,5 dias.

Resíduo de enrofloxacinina não foi detectado no leite quando analisados com os Kits comerciais, no entanto, quando o leite foi analisado por UPLC/MS-MS observou-se que este antibiótico é o mais presente nas amostras de leite de propriedades estudadas, contudo abaixo do LMR (Tabela 2).

Já Moharana et al. (2015) em Chennai, Tamilnadu na Índia, também observaram que das 125 amostras de leite analisadas, 16,8% deram resultado positivo para enrofloxacina, e 8% tinham valores acima do LMR. Os autores apontaram que a falta de descarte do leite de animais em tratamento tem contribuído para a contaminação com resíduo de antibióticos. O mesmo, foi observado nos resultados da Tabela 4, em que o tempo de descarte do leite com resíduo de antibiótico foi muito curto, pouco mais de 5% fizeram descarte maior que 2 dias.

Martínez-Cortés et al. (2016) também detectaram resíduo de enrofloxacina no leite após tratamento intramamário em vacas saudáveis e mastísticas, e a concentração residual foi elevada e variou de 18,5 a 19,8 µg / mL no dia 1 e de 20,2 a 22 µg / mL no 8º dia de uso.

Resíduo de enrofloxacina também foi detectado no leite de tanques a granel por Mohammed et al. (2016), os autores encontraram, média de 2,94 ng/mL do antibiótico no leite.

5 Conclusão

A contaminação do leite por resíduos de antibiótico se dá pelo armazenamento do leite no tanque de expansão, antes do prazo final de carência dos antibióticos.

Os antibióticos que apresentaram maior prevalência no leite das propriedades estudadas foram a enrofloxacina e ceftiofur, no entanto, os valores quantificados ficaram abaixo do limite máximo recomendado pelos órgãos de saúde, sendo, portanto, considerados próprios para consumo. O método utilizado para a extração, identificação e quantificação de resíduos de antibióticos no leite é eficiente para detecção de baixas concentrações, de diferentes classes de antibióticos.

6 Referências bibliográficas

- Alves, J. F., Paula, G. H., Silva, R. C. F., Leão, P. V. T., Leão, K. M., Nicolau, E. S., & da Silva, M. A. P. (2019). Residues of antibiotics in milk: persistence and quality interference. *Canadian Journal of Animal Science*, 1–24. <https://doi.org/10.1139/cjas-2018-0224>
- Anvisa. (2018). Limites Máximos de Resíduo de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal. *Anvisa*, 136.
- Bhutto, A. L., Murray, R. D., & Woldehiwet, Z. (2011). The effect of dry cow therapy and internal teat-sealant on intra-mammary infections during subsequent lactation. *Research in Veterinary Science*, 90(2), 316–320. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.06.006>
- Brasil. (2018). Instrução Normativa N° 76, de 26 de novembro de 2018 O. *Ministério Da Agricultura E Abastecimento - MAPA*, 230(Seção 1), 9.
- Burmańczuk, A., Grabowski, T., Osypiuk, M., Polska, B., & Kowalski, C. (2017). Determination of cloxacillin residues in dairy cows after intramammary administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 40(5), 552–560. <https://doi.org/10.1111/jvp.12391>
- Castro, S. B., Lacasse, P., Fouquet, A., Beraldin, F., Robichaud, A., & Berthiaume, R. (2010). Iodine concentration in milk sampled from canadian farms. *Journal of Food Protection*, 73(9), 1658–1663. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.9.1658>
- Cristina, M., Melo, R. T., Mendonça, E. P., Coelho, L. R., And, & Rossi, D. A. (2010). Use of ceftiofur in dairy cows and their excretion in milk. *PUBVET*, 4, 931–937.
- Dračková, M., Navrátilová, P., Hadra, L., Vorlová, L., & Hudcová, L. (2009). Determination residues of penicillin G and cloxacillin in raw cow milk using fourier transform near infrared spectroscopy. *Acta Veterinaria Brno*, 78(4), 685–690. <https://doi.org/10.2754/avb200978040685>
- Durel, L., Gallina, G., & Pellet, T. (2019). Assessment of ceftiofur residues in cow milk using commercial screening test kits. *Veterinary Record Open*, 6(1), 1–7. <https://doi.org/10.1136/vetreco-2018-000329>
- Embrapa. (2019). Sua excelência, o consumidor: novos produtos e novas estratégias da cadeia do leite para ganhar competitividade e conquistar os clientes finais. *Anuario Leite*, 35 art, 104.
- European Union. (2015). Overview report Residue monitoring for critically important antimicrobials. *Food and Veterinary Office*, 1–16. <https://doi.org/10.2875/858963>
- Fao/Who. (2018). Maximum residue limits (MRLS) and risk management recommendations (rmrs) for residues of veterinary drugs in foods. *Codex Alimentarius : International Food Standards*, 2, 2–26. <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius>
- Gorden, P. J., (2017) "Impact of disease in dairy cows on ceftiofur pharmacokinetics, withdrawal times and emergence of antimicrobial resistance". *Graduate Theses and Dissertations*. 16136. <https://lib.dr.iastate.edu/etd/16136>
- Grabsk, A. H. A., de Souza, J. R. B., De Marchi, F. E., do Prado, R. M., dos Santos, G. T., Porto, C., & Pilau, E. J. (2019). Determination of antibiotics residues in milk using a QuECHERS method using full factorial design and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 30(7), 1498–1505. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190046>
- Griffioen, K., Hop, G. E., Holstege, M. M. C., Velthuis, A. G. J., Lam, T. J. G. M., van der Wal, F. J., Achterberg, R. P., Cornelissen, J. B. W. J., Mevius, D., Heuvelink, A. E., Santman-Berends, I. M. G. A., Dijkman, R., & Scherpenzeel, C. G. M. (2016).

- Dutch dairy farmers' need for microbiological mastitis diagnostics. *Journal of Dairy Science*, 99(7), 5551–5561. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10816>
- Landers, T. F., Cohen, B., Wittum, T. E., & Larson, E. L. (2012). A review of antibiotic use in food animals: Perspective, policy, and potential. *Public Health Reports*, 127(1), 4–22. <https://doi.org/10.1177/003335491212700103>
- Martínez-Cortés, I., Gutierrez, L., Tapia, G., Ocampo, L., & Sumano, H. (2016). Serum and milk concentrations of enrofloxacin in cows intramammarily treated with a new enrofloxacin-polymorph. *Medycyna Weterynaryjna*, 72(11), 686–692. <https://doi.org/10.21521/mw.5587>
- Martins, T., Rosa, A. F., Castelani, L., de Miranda, M. S., Arcaro, J. R. P., & Pozzi, C. R. (2016). Intramammary treatment with gentamicin in lactating cows with clinical and subclinical mastitis. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 36(4), 283–289. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000400006>
- Mohammed, H., Abdou, A., Eid, A., & Zakaria, A. (2016). Rapid tests for detection of enrofloxacin residues in liquid milk. *Benha Veterinary Medical Journal*, 30(1), 97–103. <https://doi.org/10.21608/bvmj.2016.31351>
- Moharana, B., KarthickVenkatesh, P., Preetha, S. P., & Selvasubramanian, S. (2015). Quantification of Enrofloxacin Residues in Milk Sample Using Rp-Hplc. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(10), 1443–1450.
- Nascimento, G. G. F. Do, Maestro, V., & Campos, M. S. P. De. (2001). Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. *Revista de Nutricao*, 14(2), 119–124. <https://doi.org/10.1590/s1415-52732001000200005>
- Navrátilová, P., Borkovcová, I., Vyhnálková, J., & Vorlová, L. (2011). Fluoroquinolone residues in raw cow's milk. *Czech Journal of Food Sciences*, 29(6), 641–646. <https://doi.org/10.17221/22/2011-cjfs>
- Oliver, S. P., Almeida, R. A., Gillespie, B. E., Headrick, S. J., Dowlen, H. H., Johnson, D. L., Lamar, K. C., Chester, S. T., & Moseley, W. M. (2004). Extended ceftiofur therapy for treatment of experimentally-induced *Streptococcus uberis* mastitis in lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 87(10), 3322–3329. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73468-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73468-2)
- Scherpenzeel, C. G. M., Tijs, S. H. W., den Uijl, I. E. M., Santman-Berends, I. M. G. A., Velthuis, A. G. J., & Lam, T. J. G. M. (2016). Farmers' attitude toward the introduction of selective dry cow therapy. *Journal of Dairy Science*, 99(10), 8259–8266. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11349>
- Who. (2018). *Antibiotic resistance*. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>