

Utilizando a CCS e a CBT como ferramenta em tempos de pagamento por qualidade do leite

Marcos Veiga dos Santos

Professor Doutor

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

Campus de Pirassununga, SP.

Introdução

Atualmente, a demanda de produtos lácteos com maior vida de prateleira, manutenção de características sensoriais, nutritivas e de segurança são requisitos cada vez mais importantes para o consumidor e para a indústria e, conseqüentemente para o produtor, visto que a qualidade do leite tem como ponto de partida o local de produção. O principal conceito de qualidade é que não há como melhorá-la depois que o leite deixa a fazenda.

Um tema que tem sido debatido cada vez mais no Brasil é o pagamento diferenciado do leite baseado em critérios de qualidade da matéria-prima fornecida aos laticínios. Sem dúvida este é um assunto altamente relevante, pois consiste em evolução do sistema de comercialização do leite e de um aprimoramento das relações entre indústria e produtores, além logicamente de premiar com uma bonificação extra aqueles produtores que dedicaram esforço, empenho e recursos financeiros para produzir uma matéria-prima superior.

Considerando o pagamento diferenciado pela qualidade como tendência observada em várias regiões, é importante esclarecer as diferenças entre pagamento por qualidade e regulamentação da qualidade (leia-se mudança da legislação de qualidade do leite). Existe ainda certa confusão entre estes dois conceitos e desta forma é importante esclarecer a diferença entre ambos. Ainda que sejam temas correlacionados, as mudanças nas normas de produção de leite no Brasil não implicam que haverá pagamento por qualidade, como é entendimento de alguns. O objetivo de novas normas é estabelecer padrões mínimos de qualidade de forma legal, o que significa que estes novos parâmetros passam a ser obrigação de quem produz leite. Já o pagamento por qualidade, conforme discutido anteriormente, não depende de novas normas, uma vez que estes programas consistem no pagamento de um prêmio para o produtor que fornece a matéria-prima com características diferenciadas, o que gera retorno para a indústria e consumidor. Isto se configura essencialmente como um acordo entre fornecedor e comprador, devendo, todavia, ser consideradas as várias peculiaridades de cada indústria e de cada região. Desta forma, mudança de legislação e pagamento por qualidade não devem ser considerados sinônimos, e em muitos casos não têm relação direta entre si.

Como monitorar a qualidade do leite da fazenda?

O monitoramento do leite do tanque é uma necessidade atual, em face da crescente demanda por leite de alta qualidade por parte das indústrias e consumidores. Neste cenário, produtores e técnicos buscam a utilização de ferramentas para controlar as condições de produção do leite. O leite do tanque é o local onde microrganismos de diversas origens e as células somáticas são armazenados após a ordenha. Esses microrganismos podem se originar da própria glândula mamária de vacas com mastite, da contaminação da pele dos tetos antes da ordenha (lama, esterco, contaminação ambiental), das mãos de ordenhadores durante a ordenha, pela limpeza deficiente dos equipamentos de ordenha e pela água utilizada nas diversas etapas do manejo de ordenha. Desta forma, o leite do tanque é o resultado do nível de higiene das práticas de manejo de ordenha e de controle de mastite no que se refere ao total de microrganismos e células somáticas presentes, e quanto aos tipos de microrganismos encontrados. É lógico, então, utilizar o leite do tanque para avaliar os microrganismos encontrados e detectar espécies de interesse para o controle de mastite.

O uso do monitoramento do leite de tanque não é recente, iniciando-se a partir da década de 70. Desde então, as várias metodologias vêm sofrendo aperfeiçoamentos e torna-se hoje uma importante ferramenta para diagnóstico da qualidade do leite. No Brasil, algumas destas metodologias ainda não são tão utilizadas como em outros países, o que demonstra seu grande potencial. Em termos práticos, a análise do leite do tanque pode ser utilizada para resolver problemas de rebanhos com alta CBT (contagem bacteriana total) e alta CCS (contagem de células somáticas).

A análise de leite do tanque é uma ferramenta útil para avaliar a qualidade do leite e monitorar a saúde da glândula mamária em nível de rebanho. Quando realizadas rotineiramente, estas análises – em conjunto com informações sobre práticas de manejo adotadas – podem auxiliar na resolução de problemas de mastite e qualidade do leite. O uso de culturas microbiológicas de amostras individuais do leite de vacas continua sendo uma excelente forma de diagnóstico da saúde da glândula mamária e são de fundamental importância para identificar os agentes causadores de mastite em nível individual e subsidiar a implantação de medidas de controle. Entretanto, o monitoramento pela análise do tanque tem benefícios vantagens: menor custo, maior facilidade de coleta de amostras e resultados mais rápidos. As principais vantagens e limitações desta técnica são apresentadas resumidamente no quadro abaixo.

Quadro 1 – Vantagens e limitações da análise de leite de tanque

Vantagens	Limitações
------------------	-------------------

Fornecer informações para solução de problemas de mastite e qualidade do leite.	Não fornece informações em nível individual (vaca)
Menor custo que a análise por quarto do rebanho inteiro.	Fornecer informações limitadas se não for feita de forma rotineira.
Ferramenta importante para veterinários no monitoramento de mastite.	Necessidade de outras informações sobre manejo do rebanho e higiene para interpretar os resultados.
Fornecer histórico documentado da qualidade do leite e da evolução do controle da mastite no rebanho.	As amostras não podem ser congeladas e devem ser analisadas em até 36 horas após a coleta.

Fonte: adaptado de Jayarao e Wolfgang, 2003

Quando usar as análises de tanque?

Primeiramente, é necessário definir as situações que podem ser avaliadas pela análise do tanque. Entre as principais situações, podemos citar: perda de bônus por qualidade do leite, elevada carga microbiana do leite, monitoramento de rotina de ordenha (avaliação da higiene dos ordenhadores), elevada CCS do tanque (> 250.000 cel/ml), aumento dos casos de mastite clínica em relação aos meses anteriores e compra de vacas de outros rebanhos. Uma vez decidida pela necessidade das análises, o passo seguinte é determinar os procedimentos de coleta das amostras. Para a adequada interpretação de resultados, a amostra deve ser representativa de uma ordenha apenas (para evitar o efeito da armazenagem do leite) e ser coletada entre 1 e 2 horas após a ordenha. Não é recomendável coletar o leite de 2 ou mais ordenhas, pois várias análises são influenciadas pela temperatura e tempo de armazenamento do leite, e desta forma, não vão refletir as reais condições do rebanho. Antes da coleta, deve-se ligar a agitação do tanque por 5-10 minutos, coletar a amostra de aproximadamente 50 mL em frasco estéril a partir da abertura superior e identificá-la. Não se recomenda a coleta pela válvula de saída do tanque, devido a alta contaminação, o que implica em resultados errôneos. A amostra deve ser enviada para o laboratório (não congelada) para análise em até 36 horas.

Principais testes realizados no leite do tanque

Existem diferentes métodos de análise do leite do tanque e que quando utilizados em conjunto, permitem uma avaliação mais efetiva e específica do problema. A realização, pelo menos quinzenal, dos diferentes testes e análises permite identificar as possíveis falhas do programa de melhoria da qualidade do leite adotados na fazenda. A seguir, são apresentados os diferentes métodos de análise que podem ser empregados para a avaliação da qualidade microbiológica do leite.

a) CCS: a contagem de células somáticas do leite do tanque realizada em equipamentos automatizados é um excelente indicador da saúde da glândula mamária e da qualidade do leite, principalmente em rebanhos com elevada incidência de mastite contagiosa. Para a maioria dos pesquisadores, a CCS acima de 250.000 cel/ml indica elevado percentual de vacas com mastite subclínica no rebanho.

b) Contagem bacteriana total (CBT) ou contagem global: como o próprio nome sugere é a contagem do número de colônias bacterianas presentes numa dada amostra de leite - previamente incubada a 32°C durante 48 horas. A CBT fornece uma avaliação quantitativa do número total de bactérias aeróbicas no leite, ainda que somente sejam contadas as unidades formadoras de colônias (não as bactérias individuais) e não inclui as bactérias psicrotróficas. A CBT, também conhecida como contagem padrão em placas é empregada na maioria dos países desenvolvidos, sendo considerada como um indicador bastante fiel da qualidade higiênica do leite. São desvantagens desta metodologia, no entanto, o seu custo elevado, a demora da obtenção dos resultados (são necessárias 48 horas para a sua realização) e o fato de que a contagem não é uma medida precisa do número de microrganismos presentes no leite e sim uma estimativa daqueles que são viáveis.

A determinação da CBT também pode ser realizada usando-se equipamentos automatizados, os quais realizam a contagem individual de bactérias (CIB). Neste método, as bactérias são coradas e posteriormente estimadas quanto à emissão de fluorescência. Para o transporte da amostra, podem ser usados conservantes que reduzem a atividade metabólica das bactérias, prolongando a vida útil da amostra a ser analisada. A grande vantagem desta metodologia é a sua maior precisão, baixo custo por análise e elevado rendimento analítico (rapidez), uma vez que os procedimentos podem ser automatizados. Atualmente, em função de padrões legais máximos para a CBT do leite serem estabelecidos em UFC (unidades formadoras de colônias), existe a necessidade de transformação dos resultados de CIB para UFC, utilizando uma equação.

b) Contagem com Incubação preliminar (CIP): estima o número de bactérias psicrotróficas do leite (capazes de multiplicação em temperaturas de resfriamento). Consta da incubação prévia da amostra bruta a 13°C por 18 horas (simulação do resfriamento deficiente do leite) e posterior processamento de acordo com a metodologia para CBT. Como referência, sugere-se que a CIP não deve ultrapassar em quatro vezes a CBT. Altas contagens com CIP indicam falta de higiene na ordenha, especialmente no que se refere à limpeza e desinfecção dos tetos, e deficiências no resfriamento do leite.

c) Contagem total do leite pasteurizado (CTLP): estima o total de microrganismos que sobrevivem à pasteurização. Nesse teste, o leite é aquecido a 63°C por 30 minutos e, posteriormente, processado de acordo com a mesma técnica da CBT. A pasteurização destrói todos os agentes patogênicos do leite e, portanto, uma elevada CTLP é indicativa especialmente de problemas na higienização dos utensílios e equipamentos de ordenha assim como do tanque de resfriamento. Em termos práticos, a CTLP está relacionada com o acúmulo de resíduos de leite ou formação de biofilmes devido a:

- baixa temperatura da água de limpeza dos equipamentos e tanque;
- agitação insuficiente ou falta do injetor de ar no equipamento de ordenha;
- baixa concentração ou baixa qualidade dos detergentes e desinfetantes utilizados;
- partes de borracha do equipamento em más condições ou sob excessiva temperatura.

d) Contagem de coliformes (CC): estima a intensidade de contaminação do leite por coliformes de origem do esterco e de outras fontes do ambiente. Envolve a cultura do leite em meio específico, incubando-se a amostra por 24 horas a 32°C. Esse teste permite a avaliação das bactérias de origem fecal e dos coliformes oriundos do interior da glândula mamária. Altos valores na CC podem ser indicativos de falta de higiene na ordenha, especialmente no que diz respeito à limpeza e desinfecção dos tetos ou mesmo a alta incidência de mastite ambiental no rebanho. Ocasionalmente problemas de higienização do equipamento de ordenha podem causar altas CC.

e) Cultura do tanque para avaliação da mastite (CT): este é um procedimento específico para avaliação geral relativa à presença de microrganismos causadores de mastite a partir de amostra do tanque. Esse procedimento tem duas finalidades: primeiro, identificar no rebanho a presença de bactérias específicas causadoras de mastite, indicando quais são os principais problemas do rebanho. À parte desse diagnóstico geral, pode-se avaliar a necessidade de testes específicos de análise de vacas individuais e, até mesmo, de práticas de manejo, higiene e terapia que possam ser efetivas para redução do índice de mastite do rebanho. Em segundo plano, esse teste pode identificar potenciais fontes de problemas de altas CBT no rebanho, por exemplo, em decorrência de altas contagens de *Streptococcus agalactiae*.

É importante destacar que a cultura do tanque é um método fácil, econômico e proporciona informações úteis para o técnico e produtor. Recomenda-se, para rebanhos com CCS acima de 250.000 células/ml, a realização periódica, pelo menos quinzenal, da CT. Em termos de metodologia, pode-se utilizar o meio de ágar sangue, semeando-se de

0,01 a 0,05 ml de leite e incubando-se a 37°C por 24 horas. Logo a seguir, procede-se a contagem global das colônias e a identificação de cada espécie com a realização de testes bioquímicos específicos, tais como coloração de Gram, catalase, coagulase, CAMP-esculina, oxidase, entre outros.

Interpretação dos resultados de análise do tanque – qualidade do leite

Existe grande controvérsia sobre os padrões que podem ser utilizados para as várias análises microbiológicas do tanque, uma vez que muitos autores baseiam-se em experiência pessoal ou na extrapolação de resultados de pesquisas. Não existem valores de referência para condições brasileiras. Ainda que tenha estas limitações, existem vários indicativos que podem ser úteis para a interpretação dos resultados. Desta forma, os valores apresentados são apenas indicadores.

- a) Resultados da CBT < 10.000 UFC/ml indicam boas condições de higiene e de saúde da glândula mamária das vacas. Nas nossas condições de produção, a redução da CBT para valores menores é muito difícil, mas alguns rebanhos apresentam valores < 5.000 UFC/ml. A CBT é aumentada nas seguintes situações:
 - Ordenha de vacas com tetos sujos
 - Mastite causada por coliformes, estreptococos ambientais e estafilococos coagulase negativa
 - Falhas na limpeza de equipamentos de ordenha
 - Deficiência do resfriamento rápido do leite.
- b) Resultados de CTLP acima de 1000 UFC/ml são considerados altos. Geralmente, alta CTLP são observadas devido a problemas de limpeza de equipamentos, partes de borracha dos equipamentos velhos e desgastados (teteiras, mangueiras, registros) e formação de pedra do leite (depósito de minerais do leite e formação de filmes).
- c) Os resultados de CIP são geralmente maiores que os de CBT. Quando os valores de CIP estão de 3 a 4 vezes maior que os resultados de CBT, isto é indicativo de problemas relacionados com limpeza de equipamentos e falta de higiene dos tetos antes da ordenha, assim como falhas no resfriamento do leite (demora no resfriamento ou não atinge temperatura adequada de 4-5° C) e/ou prolongado tempo de armazenamento do leite. Por outro lado, quando a CIP é igual ou apenas levemente superior a uma alta CBT indica que esta CBT é provavelmente devida à ocorrência de mastite no rebanho.
- d) A contagem de coliformes é o resultado das medidas de higiene adotadas na fazenda. Considera-se que CC acima de 100 UFC/ml está associada com deficiência na higiene de ordenha, contaminação da água ou mastite causada por coliformes.

Quadro 2 – Recomendações para interpretação de resultados de análise de tanque

Métodos de análise de qualidade	Normal	Médio	Alto	Indicativo de
CBT (UFC/ml)	<10.000	20-40.000	>100.000	Alta carga microbiana inicial ou resfriamento deficiente
CTLP (UFC/ml)	<1000	1500	>1500	Limpeza de equipamento de ordenha deficiente
CIP (UFC/ml)	<10.000	40.000	>400.000	Higiene da ordenha deficiente

Fonte: Adaptado de Bray e Shearer, 1996.

Interpretação dos resultados de análise do tanque – controle de mastite

a) CCS do tanque: o fator que tem maior efeito sobre a CCS é o nível de infecção da glândula mamária das vacas do rebanho. Desta maneira, existe uma forte relação entre a CCS do tanque e a porcentagem de quartos infectados no rebanho, como mostra a Tabela 1. Fica claro que o aumento da CCS no tanque é um reflexo direto do aumento do número de quartos infectados, o resulta em aumento nas perdas de produção de leite.

Outros fatores podem ter efeito indireto sobre a CCS. Observam-se aumentos na CCS à medida que avança a idade da vaca e o estágio de lactação. Entretanto, tanto a idade quanto o estágio de lactação não alteram a CCS em vacas não infectadas e o aumento da CCS observado no final da lactação está associado à maior probabilidade do animal ter se infectado ao longo da lactação, assim como a medida que ele fica mais velho.

Tabela 1 - Relação entre CCS do tanque, porcentagem de quartos infectados e porcentagem de perdas de produção de leite

CCS do tanque	% de quartos infectados	% de perdas de produção
200.000	6	0
500.000	16	6
1.000.000	32	18
1.500.000	48	29

Fonte: NMC, 1996.

De maneira complementar, os resultados da CCS de vacas individuais podem ser utilizados para avaliar a sanidade da glândula mamária através da identificação do número de animais com mastite subclínica (vacas com CCS acima de 200.000 células/ml de leite). Em rebanhos com monitoramento mensal individual de todos os animais, pode-se utilizar a CCS para verificar da eficácia do programa de controle de mastite adotado, assim como identificar animais infectados cronicamente que apresentam CCS altas por vários meses. Estes animais com mastite crônica podem ser identificados e posteriormente selecionados para descarte ou para secagem antecipada.

Para melhor compreensão dos resultados da CCS de vacas individuais, recomenda-se que estes resultados sejam distribuídos em função dos dias em lactação e número de lactações dos animais, o que pode indicar pontos falhos e que medidas de controle devem ser tomadas. Os dados da CCS obtidos de vacas individuais devem ser organizados de forma a possibilitar a identificação de variações sazonais e definir estratégias de controle para os períodos mais críticos do ano.

A CCS é também bastante útil na identificação de algumas poucas vacas que individualmente contribuem significativamente na CCS total do tanque (Tabela 2 e 3). Estas vacas identificadas com altas contagens de células podem assim ser selecionadas para:

- Cultura microbiológica do leite
- Secagem antecipada: vacas em estágio avançado de lactação e que apresentam altas CCS durante vários meses podem ser candidatas a secagem antecipada, uma vez que a taxa de cura de mastite com tratamento de vacas seca no momento da secagem é bastante superior àquela observada durante a lactação.
- Descarte de vacas com mastite crônica
- Linha de ordenha: outra possibilidade de uso dos resultados da CCS é a ordenha tanto de animais com mastite clínica como animais com mastite subclínica após a ordenha de todos os animais sadios. Esta medida pode auxiliar na diminuição do aparecimento de novas infecções, pois diminui o risco de transmissão da mastite contagiosa durante a ordenha. No entanto, esta medida pode ser de difícil implantação se houver a necessidade constante de mudança de animais entre dos diversos lotes.

Tabela 2 - Impacto da remoção de vacas do rebanho na CCS, considerando que todas as vacas tenham a mesma produção e que a CCS do tanque seja de 973.000 cel/ml.

Vaca	CCS da vaca	Redução na CCS do tanque com o descarte de cada vaca	CCS do tanque
1	4.000.000	337.000	636.000
2	3.000.000	296.000	340.000
3	1.500.000	165.000	175.000
4	400.000	38.000	138.000
5	250.000		
6	200.000		
7	150.000		
8	100.000		
9	75.000		
10	50.000		
Todas as vacas	973.000		

A vaca 1 produz 41% das células do tanque. As vacas 1 e 2 produzem 72% das células. As vacas 1, 2 e 3 produzem 87% das células.

Fonte: adaptado de Crist, *et al.*, (1997)

SANTOS, M. V. **Boas práticas de produção associadas à higiene de ordenha e qualidade do leite** In: O Brasil e a nova era do mercado do leite - Compreender para competir.1 ed.Piracicaba-SP : Agripoint Ltda, 2007, v.1, p. 135-154.

A Tabela 3 ilustra o efeito do descarte de uma vaca com diferentes níveis de produção e CCS sobre a CCS do tanque em um rebanho de 50 vacas produzindo em média 23L por dia.

Tabela 3 - Impacto do descarte de uma vaca em um rebanho de 50 vacas com média de 22,5L/dia

Vaca a ser descartada	Produção diária da vaca a ser descartada			
	18	22.5	27	31.5
CCS	Redução na CCS do tanque			
800.000	3.252	4.082	4.918	5.761
1.600.000	16.260	20.408	24.590	28.807
3.200.000	42.276	53.061	63.934	74.897
6.400.000	94.309	118.367	142.623	167.078

Fonte: Crist, *et al.*, (1997)

b) Identificação de agentes causadores de mastite

Os agentes causadores de mastite podem ser classificados com base nos resultados da cultura microbiológica de amostras do tanque em contagiosos e ambientais. A cultura microbiológica do tanque apresenta alta sensibilidade na detecção de agentes contagiosos. Destacam-se dentro do grupo dos contagiosos:

- *Streptococcus agalactiae*: estão presentes em altas contagens dentro de glândulas infectadas e são facilmente identificados na cultura do tanque. Entre as práticas de manejo associadas com infecções por *S. agalactiae*, podemos citar: manejo de ordenha inadequado (deficiência no pós-dipping), uso de toalhas não descartáveis, ausência de tratamento de vaca seca, alimentação de bezerras com leite contaminado pelo agente. Um das formas possíveis de introdução do *S. agalactiae* no rebanho é pela compra de vacas de outros rebanhos. Como forma de evitar tal este tipo de entrada do agente, as vacas compradas devem ser analisadas antes de serem introduzidas no rebanho.
- *Staphylococcus aureus*: a identificação de *S. aureus* em 3 ou 4 amostras consecutivas é sugestiva de que o rebanho apresenta vacas infectadas com o agente. Este microrganismo é encontrado em baixos números nas glândulas infectadas e desta forma não é tao facilmente detectado nas culturas de tanque.
- *Corynebacterium bovis*: é um agente contagioso, mas que apresenta baixa patogenicidade. É encontrado na microbiota da queratina presente no do canal do teto. Sua presença como agente causador de mastite é considerada como indicativa de deficiência nas medidas de controle, em particular quanto à desinfecção dos tetos após a ordenha.

Tomada de decisões baseada na análise do tanque

A análise conjunta das várias análises de leite do tanque pode ser organizada de forma a fornecer indicativos da origem dos problemas de qualidade e controle de mastite. Recomenda-se inicialmente, determinar se a CBT está acima de 10.000 UFC/ml. Caso a

CBT ultrapasse esta recomendação, o segundo passo é determinar se a CIP é maior ou menor que 3-4 vezes a CBT. A partir de então, avalia-se a CCS (maior ou menor que 250.000 cel/ml). O esquema abaixo resume as várias possibilidades de identificação dos problemas, baseado nos resultados de análise do tanque.

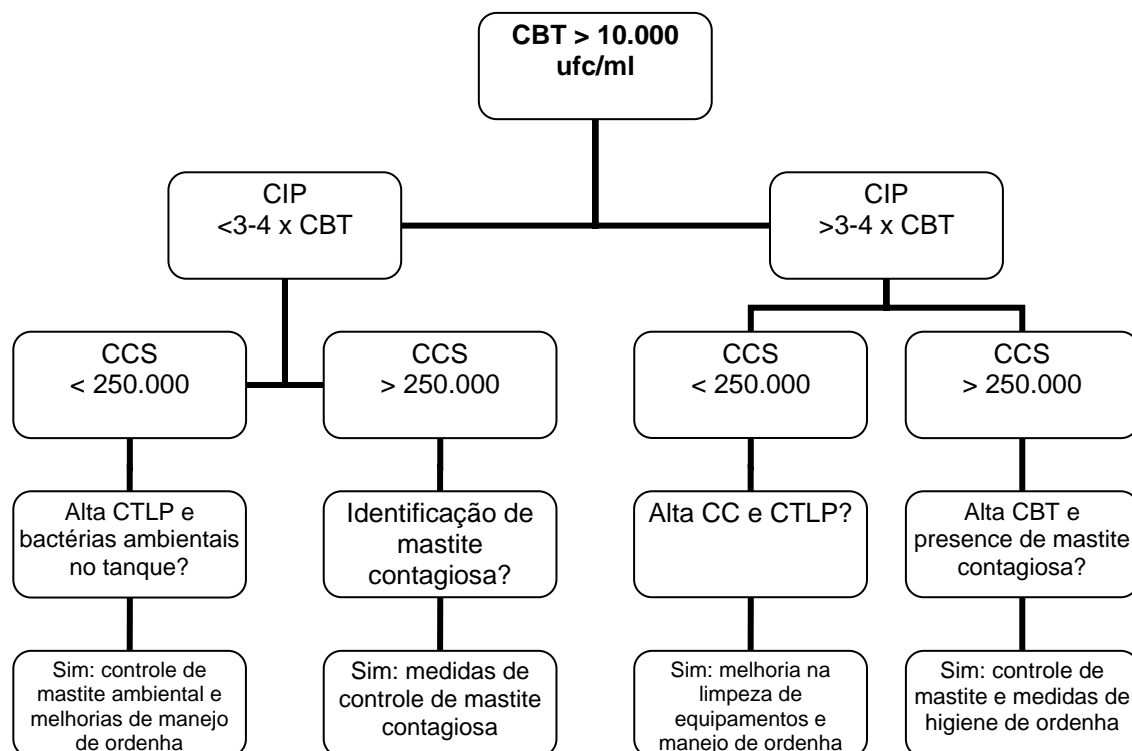


Figura 1 – Esquema para interpretação de resultados de análise do tanque (adaptado de Jayarao e Wolfgang, 2003)

Literatura consultada

Brito, M., Brito, J. R. F., De Souza, H. M. e Vargas, O. L. Evaluation of the sensitivity of bulk tank milk cultures for the isolation of contagious bovine mastitis pathogens. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.18, n.1, Jan-Mar, p.39-44. 1998.

CRIST, W.L., HARMON, R.J., O'LEARY, J., MCALLISTER, A.J. **Mastitis and its control**. University of Kentucky Cooperative Extension Service, 1997.

De Haas, Y., Barkema, H. W., Schukken, Y. H. e Veerkamp, R. F. Associations between somatic cell count patterns and the incidence of clinical mastitis. **Preventive Veterinary Medicine**, v.67, n.1, Jan, p.55-68. 2005.

Edmondson, P. **Practical use of bulk tank analysis for mastitis and milk quality problems**. 44th NMC Annual Meeting Proceedings. Verona, WI: National Mastitis Council, 2005. 94-100 p.

Farnsworth, R. J. Microbiologic Examination Of Bulk Tank Milk. **Veterinary Clinics Of North America-Food Animal Practice**, v.9, n.3, Nov, p.469-474. 1993.

Jayarao, B. M. e Wolfgang, D. R. Bulk-tank milk analysis - A useful tool for improving milk quality and herd udder health. **Veterinary Clinics Of North America-Food Animal Practice**, v.19, n.1, Mar, p.75-+. 2003.

SANTOS, M. V. **Boas práticas de produção associadas à higiene de ordenha e qualidade do leite** In: O Brasil e a nova era do mercado do leite - Compreender para competir.1 ed.Piracicaba-SP : Agripoint Ltda, 2007, v.1, p. 135-154.

Jayarao, B. M., Pillai, S. R., Sawant, A. A., Wolfgang, D. R. e Hegde, N. V. Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. **Journal Of Dairy Science**, v.87, n.10, Oct, p.3561-3573. 2004.

Roberson, J. e Bailey, T. L. Using records to evaluate udder health: Bulk tank analysis. **Veterinary Medicine**, v.94, n.2, Feb, p.190-193. 1999.

Schukken, Y. H., Wilson, D. J., Welcome, F., Garrison-Tikofsky, L. e Gonzalez, R. N. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. **Veterinary Research**, v.34, n.5, Sep-Oct, p.579-596. 2003.