

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

INFLUÊNCIA DA OFERTA DA DIETA, ORDEM E ESTÁDIO DE LACTAÇÃO  
SOBRE AS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DO  
LEITE BOVINO E A OCORRÊNCIA DE LEITE INSTÁVEL NÃO ÁCIDO

Vilmar Fruscalso  
Engenheiro Químico (PUCRS)  
Engenheiro Agrônomo (UFRGS)

Dissertação apresentada como um dos  
requisitos à obtenção do Grau de  
Mestre em Zootecnia

PORTO ALEGRE/RS, BRASIL  
JANEIRO, 2007.

Dedico aos meus queridos filhos  
Darwin Andrei e Jonathan Alexander  
e a minha adorável esposa Marines Fátima

## AGRADECIMENTOS

À mãe, conselheira e amiga, Amélia Menegaz Fruscalso;

Aos proprietários da Granja, Aldo e Genessi Fruscalso e família pela oportunidade e apoio na implantação e execução do Experimento;

À Professora Orientadora Dra. Vivian Fischer, pelos ensinamentos, profissionalismo, dedicação e solidariedade;

À Professora Co-orientadora, Dra. Maira Balbinotti Zanela, pelo apoio;

A todos os Professores com os quais tive a oportunidade de conviver, pelo conhecimento que comigo compartilharam;

À Servidora da ASCAR Elizabeth Fabre, pelo apoio e profissionalismo;

À EMATER/ASCAR-RS, pela oportunidade, apoio humano, técnico e financeiro;

À Cooperativa dos Pequenos Agropecuaristas de Campinas do Sul, através de seu Presidente Nelson J. Franklin da Silva, pelo apoio logístico e financeiro;

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial à Faculdade de Agronomia, pela receptividade e ensinamentos proporcionados.

Muito obrigado!!!

# INFLUÊNCIA DA OFERTA DA DIETA, ORDEM E ESTÁDIO DE LACTAÇÃO SOBRE AS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DO LEITE BOVINO E A OCORRÊNCIA DE LEITE INSTÁVEL NÃO ÁCIDO<sup>1</sup>

Autor: Vilmar Fruscalso

Orientadora: Vivian Fischer

Co-Orientadora: Maira Balbinotti Zanela

## RESUMO

O experimento, realizado em Campinas do Sul/RS, entre 30 de dezembro de 2005 e 24 de fevereiro de 2006, visou avaliar os efeitos de dois níveis de oferta de dieta e da ordem e do estágio de lactação sobre as propriedades físico-químicas e microbiológicas e a estabilidade do leite na prova do álcool. Doze vacas holandesas, seis primíparas e seis multíparas, foram aleatoriamente designadas a dois tratamentos. Aos animais com oferta de dieta para 100% das necessidades (NRC, 2001) (T100) foram disponibilizados 8 kg MS/100 kg PV/dia de pastagem de capim bermuda var. Tifton (*Cynodon dactylon*), 5 kg/dia de concentrado energético e 2,5 kg/dia de feno de Tifton. Para o grupo com oferta de dieta para 60% das necessidades (T60), a disponibilidade foi reduzida em 50%. Vacas com produção superior a 18 kg de leite por dia, receberam 2,0 e 1,0 kg/dia de concentrado protéico para T100 e T60, respectivamente. Os animais foram avaliados quanto ao peso e condição corporal no início, meio e final do ensaio. A produção de leite, estabilidade ao álcool, acidez titulável, densidade, índice crioscópico e tempo de redução com azul de metileno (TRAM) foram avaliados semanalmente. Os teores de gordura, proteína, lactose, contagem de células somáticas (CCS) foram avaliados quinzenalmente, enquanto minerais e contagem bacteriana total (CBT) o foram, mensalmente. A restrição alimentar diminuiu a produção de leite e a estabilidade ao álcool 76% v/v. Entretanto, o nível da dieta não alterou a estabilidade térmica do leite (teste da fervura). A densidade, CBT, TRAM, CCS, assim como as concentrações dos macrocomponentes e minerais (exceto magnésio) não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. As propriedades do leite não foram afetadas pela ordem de lactação. O estágio de lactação apresentou efeito sobre o teor de sólidos, proteína bruta, caseína, potássio, cálcio, além de alterar a CCS e a densidade do leite. Embora a estabilidade térmica não tenha sido afetada, a redução dos níveis nutricionais aumentou a incidência de resultados positivos na prova do álcool. Este panorama pode induzir os laticínios a descartar ou desvalorizar indevidamente matérias-primas aptas à industrialização, penalizando iniquamente os produtores.

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (132 p.).

Janeiro de 2007.

# INFLUENCE OF THE DIET ALLOWANCE, PARITY AND LACTATION STADIUM ON THE PHYSICAL-CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL PROPERTIES OF THE BOVINE MILK AND THE OCCURRENCE OF UNSTABLE NOT ACID MILK<sup>1</sup>

Author: Vilmar Fruscalso  
Adviser: Vivian Fischer  
Co-Adviser: Maira Balbinotti Zanela

## SUMMARY

The experiment, held in Campinas do Sul-RS, between December 30, 2005 and February 24, 2006, evaluated the effects of two levels of diet allowance on the physical-chemical and microbiological characteristics of the milk and its stability at the alcohol test. Twelve Holstein cows, six multiparous and six primiparous were randomly assigned to two treatments. Animals with high diet level to attain 100% of nutritional requirements (NRC, 2001) (T100) were offered of 8 kg MS/100 kg BW/day of Tifton pasture (*Cynodon dactylon*), 5 kg/day of energy concentrate and 2,5 kg/day of Tifton hay. For the group with low diet level (T60), the allowance was reduced in 50%. Cows producing more than 18 kg/day received 2.0 and 1.0 kg/day of protein concentrate for T100 and T60, respectively. At the beginning, middle and end of the trial, body weight, body condition score were determined. Milk yield, stability to the alcohol test, titrable acidity, density, cryoscopy and reductase were weekly determined. Percentages of fat, protein, lactose and somatic cell count (SCC) were determined biweekly. Minerals and total bacterial count (TBC) were monthly analyzed. Feed restriction decreased milk yield, milk corrected to 4% of fat and the stability to the alcohol test. However, diet level did not alter the thermal stability of the milk, except for cows in a very advanced stage of lactation. The cryoscopy, somatic cell count (SCC), reductase, total bacterial count, density, as well as the fat, protein, lactose and most minerals (except for magnesium) contents did not present statistical difference between treatments. Lactation order (parity) did not affect any of milk attributes. Number of days in milking affected total solids, crude protein, casein, potassium and calcium contents besides SCC of the milk. Reduction of the feed allowance increased the incidence of positive results in the alcohol test, but did not alter thermal stability, what might induce dairy industry to discard or to devaluate adequate milk, penalizing milk producers.

<sup>1</sup>Master Science Dissertation in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (132 p.), January of 2007.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Qualidade do leite.....	5
2.2 Características físico-químicas do leite.....	6
2.2.1 Composição.....	6
2.2.2 Propriedades físicas.....	6
2.3 Fatores que afetam a composição do leite.....	7
2.3.1 Oferta e composição da dieta.....	7
2.3.2 Estação do ano: efeito do clima sobre a produção e qualidade das forrageiras e o bem-estar e o desempenho dos animais.....	12
2.3.3 Ordem e estágio de lactação.....	13
2.3.4 Efeitos genético-ambientais sobre a composição do leite.....	14
2.3.4.1 Efeitos inter-raciais sobre a composição do leite.....	15
2.3.4.2 Efeitos intra-raciais sobre a composição do leite.....	16
2.3.5 Influência das infecções da glândula mamária sobre a composição do leite.....	16
2.4 Micelas de caseína.....	17
2.4.1 Estrutura das micelas.....	18
2.4.2 Estabilidade das micelas.....	20
2.4.3 Mudanças nas micelas.....	23
2.5 Prova do álcool.....	25
2.6 Mecanismos de ação do álcool.....	28
2.6.1 Influência da temperatura sobre a prova do álcool.....	32
2.7 Leite instável.....	32
2.8 Estabilidade térmica do leite.....	35
2.9 Fatores que afetam a estabilidade térmica do leite.....	36
2.9.1 Acidez e pH.....	36
2.9.1.1 Efeito da temperatura sobre o pH do leite.....	38
2.9.2 Cálcio iônico.....	39
2.9.3 Outros minerais.....	41
2.9.4 Fosfatos.....	42

2.9.5 Citratos.....	43
2.9.6 Soroproteínas.....	44
2.9.7 Transglutaminase.....	46
2.9.8 Uréia.....	47
2.9.9 Lactose.....	48
2.9.10 Extrato seco total.....	48
2.10 Potencial zeta.....	49
2.11 Mecanismos da coagulação térmica do leite.....	50
2.12 Mudanças na composição do leite instável .....	52
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	54
3.1 Local e período experimental.....	54
3.2 Animais.....	54
3.3 Tratamentos.....	55
3.4 Composição da dieta.....	56
3.4.1 Forrageira.....	57
3.4.2 Feno, concentrados e minerais.....	58
3.5 Manejo da ordenha.....	58
3.6 Ajuste da carga animal.....	59
3.7 Amostragem do leite.....	59
3.8 Avaliações.....	60
3.9 Análises físico-químicas e microbiológicas.....	60
3.9.1 Na propriedade.....	60
3.9.2 Na Coopasul.....	62
3.9.3 Na Universidade de Passo Fundo (UPF).....	62
3.10 Análise estatística.....	63
3.10.1 Nível de oferta da dieta.....	64
3.10.2 Ordem de lactação.....	64
3.10.3 Estádio de lactação.....	65
3.10.4 Leite instável não ácido (LINA).....	65
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
4.1 Nível de oferta da dieta.....	66
4.1.1 Efeito do nível de oferta da dieta sobre o peso corporal e o escore de condição corporal.....	66
4.1.2 Efeito do nível de oferta da dieta sobre a produção de leite.....	67

4.1.3	Efeito do nível de oferta de dieta sobre a composição do leite...	68
4.1.3.1	Efeito do nível de oferta da dieta sobre a concentração dos macrocomponentes.....	68
4.1.3.2	Efeito do nível de oferta da dieta sobre a concentração dos minerais no leite.....	73
4.1.4	Efeito do nível de oferta da dieta sobre as características físicas do leite.....	74
4.1.5	Efeito do nível de oferta de dieta sobre as características microbiológicas do leite.....	78
4.2	Ordem de lactação.....	79
4.2.1	Efeito da ordem de lactação sobre a produção de leite.....	80
4.2.2	Efeito da ordem de lactação sobre a composição do leite.....	81
4.2.2.1	Efeito da ordem de lactação sobre os macrocomponentes.....	81
4.2.2.2	Efeito da ordem de lactação sobre os minerais.....	82
4.2.3	Efeito da ordem de lactação sobre as características físicas do leite.....	83
4.2.4	Efeito da ordem de lactação sobre as características microbiológicas do leite.....	84
4.3	Estádio de lactação.....	85
4.3.1	Efeito do estágio de lactação sobre a produção de leite.....	85
4.3.2	Efeito do estágio de lactação sobre a composição do leite.....	86
4.3.2.1	Efeito do estágio de lactação sobre os macrocomponentes.....	86
4.3.2.2	Efeito do estágio de lactação sobre os minerais.....	89
4.3.3	Efeito do estágio de lactação sobre as características físicas do leite.....	90
4.3.4	Efeito do estágio de lactação sobre as características microbiológicas do leite.....	92
4.4	Leite instável não ácido (LINA).....	94
4.4.1	Efeito do LINA sobre a produção de leite.....	94
4.4.2	Efeito do LINA sobre a composição do leite.....	95
4.4.2.1	Efeito do LINA sobre os macrocomponentes.....	95
4.4.2.2	Efeito do LINA sobre os Minerais.....	98
4.4.3	Efeito do LINA sobre as características físicas do leite.....	99
4.4.4	Efeito do LINA sobre as características microbiológicas do leite.....	101



4.5 Análise de correlação.....	102
4.5.1 Correlação entre o ponto de corte ao álcool e a composição do leite.....	102
4.5.2 Correlação entre contagem de células somáticas e produção, características físico-químicas e microbiológicas do leite.....	102
5. CONCLUSÕES.....	104
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	105
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
8. APÊNDICES.....	119

## RELAÇÃO DE TABELAS

1. Cronograma das avaliações e das análises físico-químicas e microbiológicas do leite, utilizadas na análise estatística.....	63
2. Médias e análise estatística para os efeitos dos tratamentos, período e interação, com ordem e estágio de lactação como covariáveis, para peso corporal (PC) e escore de condição corporal (ECC).....	66
3. Médias e análise estatística para os efeitos dos tratamentos, períodos e interação, com ordem e estágio de lactação como covariáveis, referentes à produção de leite (PL) e produção de leite corrigida (PLC)...	67
4. Médias e análise estatística para os efeitos dos tratamentos, para o primeiro e segundo períodos, com ordem e estágio de lactação como covariáveis, referentes à produção de leite corrigida (PLC).....	68
5. Médias e análise estatística para os efeitos dos tratamentos, período e interação, com ordem e estágio de lactação como covariáveis, referentes aos teores e produção diária dos macroconstituintes do leite: extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD), lactose (Lac), gordura bruta (GB), proteína bruta (PB) e caseína (CN) e relação CN/PB.....	69
6. Médias e análise estatística para os efeitos dos tratamentos, durante o primeiro e segundo períodos, com ordem e estágio de lactação como covariáveis, referentes ao teor de lactose no leite.....	70
7. Dados da literatura relacionados ao efeito da subnutrição sobre os principais constituintes do leite.....	71
8. Médias e análise estatística para tratamentos, períodos e interação, com ordem e estágio de lactação como covariáveis, referentes aos minerais do leite: K, Ca, P, Na, Mg e relação Ca/P.....	73
9. Médias e análise estatística para tratamentos, período e interação, com ordem e estágio de lactação como covariáveis, referentes às características físicas do leite: prova do álcool 76, álcool % de corte, teste da fervura (Ferv), acidez, crioscopia (Crio) e densidade (Dens).....	74
10. Médias e análise estatística para tratamentos, referentes ao primeiro e segundo períodos, com ordem e estágio de lactação como covariáveis, referentes ao índice crioscópico do leite.....	75

11. Médias e análise estatística para tratamentos, com ordem e estágio de lactação como covariáveis, referentes às características microbiológicas do leite: contagem bacteriana total (CBT), tempo de redução com azul de metileno (TRAM) e contagem de células somáticas (CCS).....	78
12. Médias e análise estatística para os efeitos dos tratamentos, durante o primeiro e segundo períodos, com ordem e estágio de lactação como covariáveis, referentes ao tempo de redução com azul de metileno (TRAM).....	79
13. Médias e análise estatística para ordem de lactação, com estágio de lactação como covariável, para produção de leite (PL) e produção de leite corrigida (PLC).....	80
14. Médias e análise estatística para ordem de lactação, referentes aos macroconstituintes do leite, com estágio de lactação como covariável: extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD), lactose, gordura bruta (GB), proteína bruta (PB), caseína (CN) e relação entre caseína e gordura bruta (CN/GB).....	81
15. Médias e análise estatística referentes aos efeitos da ordem de lactação, com estágio de lactação como covariável, para os minerais do leite: K, Ca, P, Na, Mg e relação Ca/P.....	82
16. Médias e análise estatística para ordem de lactação, com estágio de lactação como covariável, referentes às características físicas do leite: prova do álcool 76, álcool % de corte, teste da fervura, acidez titulável, ponto crioscópico e densidade.....	84
17. Médias e análise estatística para ordem de lactação, com estágio de lactação como covariável, para as características microbiológicas do leite: contagem bacteriana total (CBT), tempo de redução com azul de metileno (TRAM) e contagem de células somáticas (CCS).....	85
18. Médias e análise estatística para estágio de lactação, com ordem de lactação como covariável, referentes à produção de leite (PL) e produção de leite corrigida (PLC).....	85
19. Médias e análise estatística para estágio de lactação, com ordem de lactação como covariável, referentes ao teor e produção total dos macroconstituintes do leite: extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD), lactose, gordura bruta (GB), proteína bruta (PB), caseína (CN) e relação entre caseína e proteína bruta (CN/PB)....	87
20. Médias e análise estatística para estágio de lactação, com ordem de lactação como covariável, referentes aos minerais do leite: K, Ca, P,	

Na, Mg e relação Ca/P.....	90
21. Médias e análise estatística para estágio de lactação, com ordem de lactação como covariável, referentes às características físicas do leite: prova do álcool 76, álcool % de corte, teste da fervura, acidez, ponto crioscópico e densidade.....	91
22 Médias e análise estatística para estágio de lactação, com ordem de lactação como covariável, referentes às características microbiológicas do leite: contagem bacteriana total (CBT), tempo de redução com azul de metileno (TRAM) e contagem de células somáticas (CCS).....	93
23. Médias e análise estatística para estabilidade ao álcool, com estágio e ordem de lactação como covariáveis, referentes à produção de leite (PL) e produção de leite corrigida (PLC).....	94
24. Médias e análise estatística, para estabilidade ao álcool, com estágio e ordem de lactação como covariáveis, referentes ao teor e produção dos macroconstituintes do leite: extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD), lactose, gordura bruta (GB) proteína bruta (PB), caseína (CN) e relação CN/PB.....	96
25. Médias e análise estatística para estabilidade ao álcool, com estágio e ordem de lactação como covariáveis, referentes aos minerais do leite: K, Ca, P, Na, Mg e relação Ca/P.....	98
26. Médias e análise estatística para estabilidade ao álcool, com estágio e ordem de lactação como covariáveis, referentes às características físicas do leite: teste da fervura, acidez titulável, ponto crioscópico e densidade.....	100
27. Médias e análise estatística para estabilidade ao álcool, com estágio e ordem de lactação como covariáveis, referentes às características microbiológicas do leite: contagem bacteriana total (CBT), tempo de redução com azul de metileno (TRAM) e contagem de células somáticas (CCS).....	101

## RELAÇÃO DE FIGURAS

1. Composição média do leite bovino.....	6
2. Modelo esquemático da micela de caseína, mostrando as sub-micelas (unidades estruturais), cadeias peptídicas projetadas no meio aquoso (camada dinâmica) e fosfato de cálcio coloidal (unidades aglutinantes).....	19
3. Modelo esquemático da micela de caseína, mostrando a presença da camada dinâmica e os efeitos do aquecimento e da acidificação sobre a associação e precipitação do fosfato de cálcio, kappa-caseína ( $\kappa$ -CN), beta-lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) e alfa-lactoalbumina ( $\alpha$ -La).....	20
4. Mudanças no perfil da curva de estabilidade do leite ao álcool em função do pH: (a) concentração 1,5 vezes ou 2,6 vezes em relação ao original (b) com adição de $\text{Ca}^{++}$ ou EDTA.....	27

## RELAÇÃO DE ABREVIATURAS

AGV	Ácidos graxos voláteis
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (albumina do soro bovino)
CBT	Contagem bacteriana total
CCS	Contagem de células somáticas
CD	Constante dielétrica
CMS	Consumo de matéria seca
CN	Caseína
CNF	Carboidratos não fibrosos
CRF	Carboidratos rapidamente fermentáveis
CS	Grupo de animais que receberam, 100% (C) e 60% (S) das necessidades nutricionais, segundo recomendações do NRC (2001), no primeiro e segundo período experimental, respectivamente
ECC	Escore de condição corporal
ECS	Escore de células somáticas
EDTA	<i>Ethylene Diamine TetrAcetic acid</i> (ácido etilenodiamina tetra-acético).
ETL	Estabilidade térmica do leite
ESD	Extrato seco desengordurado
EST	Extrato seco total
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN	Fibra em detergente neutro
IN51	Instrução normativa número 51
LINA	Leite instável não ácido

MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MUN	<i>Milk ureic nitrogen</i> (Nitrogênio ureico no leite)
NNP	Nitrogênio não protéico
PDI	Proteína digestível intestinal
PLC	Produção de leite corrigida a 4% de gordura
pp	Pontos percentuais
$\rho$ - $\kappa$ -CN	Para-kappa-caseína
R	Radical (alquila, arila)
SC	Grupo de animais que receberam, 60% (S) e 100% (C) das necessidades nutricionais, segundo recomendações do NRC (2001), no primeiro e segundo período experimental, respectivamente
SH	Sulfidril
SILA	Síndrome do leite anormal
SP	Soroproteínas
TCT	Tempo de coagulação térmica
T100	Oferta de dieta para 100% das necessidades
T60	Oferta de dieta para 60% das necessidades
UHT	<i>Ultra high temperature</i> (Ultra-alta temperatura)
$\kappa$ -CN	Kappa-caseína
$\alpha$ -La	Alfa-lactoalbumina
$\beta$ -Lg	Beta-lactoglobulina
$\gamma$ -CN	gama-caseína

## 1. INTRODUÇÃO

O leite bovino *in natura* atingiu seu auge entre as *commodities* brasileiras na década de 1970, quando ocupou o segundo lugar no faturamento agropecuário nacional. Em 2005, foi o quinto colocado, com US\$ 6,20 bilhões, ficando abaixo apenas da carne bovina, soja, carne de frango e cana-de-açúcar (FAO, 2006). Atualmente, o Brasil ocupa a sétima posição no *ranking* mundial dos produtores de leite, com 23,3 milhões de toneladas anuais (FAO, 2006). O baixo custo de produção faz com que o país seja altamente competitivo a nível mundial (Carvalho & Oliveira, 2006). Enquanto no Centro-Oeste brasileiro, um litro de leite é produzido com menos de US\$ 0,18; na Austrália e grandes fazendas dos Estados Unidos, são necessários entre 0,20 e 0,30; na Holanda, França, Itália e Canadá, o custo supera os 0,37 dólares (IFCN, 2005; apud Carvalho & Oliveira, 2006).

A produtividade média do rebanho brasileiro, em 2005, manteve-se em 3,12 kg/vaca/dia. Esta cifra está muito aquém, não apenas dos sistemas *free-stall* altamente tecnificados de Israel, Estados Unidos, Canadá e Europa, mas de modelos semelhantes de produção como o da Argentina, Nova Zelândia e Austrália (FAO, 2006).

Apesar das dificuldades, a bovinocultura leiteira é extremamente importante para o setor primário brasileiro, gerando emprego e renda, seja em



grandes e modernos sistemas empresariais, ou em pequenas unidades familiares de produção. Além disso, o leite é alimento de vital importância para o ser humano. Os consumidores estão cada vez mais informados e exigentes. A segurança alimentar passa necessariamente pela solidez e competitividade da cadeia láctea. Neste cenário, cresce continuamente a necessidade de gerar produtos que atendam os exigentes padrões internacionais de qualidade.

Leite de qualidade é natural, saudável, nutritivo e não contém substâncias maléficas à saúde dos consumidores. Quando se torna matéria-prima industrial, além destas características, o leite precisa ser estável ao tratamento térmico. Neste aspecto, os industriais buscam matéria-prima com acidez normal, baixo nível de contagem de células somáticas (CCS) e de contagem bacteriana total (CBT); adequado nível de proteínas, gorduras e minerais; alto teor de sólidos e ausência de substâncias deletérias, tanto ao processo industrial, quanto à saúde dos consumidores. Assim, o sucesso da indústria passa pela compatibilização das exigências do mercado com a viabilidade técnica e econômica do processamento industrial.

Para avaliar a qualidade e a aptidão industrial do leite, uma série de análises físico-químicas e microbiológicas é realizada pelas indústrias. Entre as análises realizadas rotineiramente, uma das mais tradicionais é a prova do álcool. Originalmente adotada para avaliar a carga microbiana, a partir da acidez (lactose,  $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \xrightarrow{\text{bactérias}} 4 \text{ ácido láctico, } C_3H_6O_3$ ), a prova do álcool passou a ser utilizada como atestado da qualidade do leite. Com a popularização do leite UHT, tornou-se também sinônimo de estabilidade térmica. Em países tecnificados, entretanto, os avanços tecnológicos, aliados à

alta profissionalização dos agropecuaristas, reduziram drasticamente a proliferação microbiana e, conseqüentemente, o aumento da acidez do leite, fazendo com que a prova do álcool fosse abandonada. No Brasil, o teste do álcool ainda é sistematicamente utilizado como indicador da qualidade e da estabilidade térmica do leite. Todavia, pesquisas vêm demonstrando que a correlação entre positividade na prova do álcool e tempo de coagulação térmica é apenas parcial. Para os industriais, entretanto, todo leite instável ao álcool é inadequado ao processamento térmico. Esta duvidosa interpretação da estabilidade ao álcool pode ter graves conseqüências, não apenas para indústria que deixa de dispor da matéria-prima razão de sua existência, mas para toda a cadeia do leite. Esta situação tem gerado conflitos entre agropecuaristas e industriais. Os produtores argumentam que nada mudou no sistema produtivo e que o leite que comercializam possui qualidade. Segundo eles, a indústria tornou-se mais exigente e rigorosa em seus critérios de classificação. Os industriais, por sua vez, dizem que o leite não tem suficiente qualidade, que a substituição do leite pasteurizado pelo UHT exige uma melhor estabilidade térmica da matéria-prima e que o consumidor está mais exigente. Ainda, segundo os empresários, os produtores têm que se adaptar ao novo cenário globalizado, onde qualidade é uma questão de sobrevivência.

A ocorrência de leite instável não ácido (LINA) é fenômeno complexo, de causas múltiplas, que altera as características físico-químicas do leite, tornando-o instável ao álcool, mesmo estando dentro dos padrões normais de acidez (Fischer, 2005). As causas, interações entre elas e como agem sobre os componentes do leite para desestabilizá-lo não estão ainda

completamente elucidadas.

As pesquisas sobre LINA no Brasil são ainda incipientes. Destacam-se os trabalhos realizados pela Universidade Federal de Pelotas (UFPeI), Embrapa Clima Temperado e mais recentemente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Estas instituições têm realizado pesquisa para avaliar a incidência e identificar as causas da ocorrência de LINA, além de propor soluções que levem à eliminação ou minimização do problema.

Identificar carências nutricionais e como elas afetam o desempenho do animal, bem como a produção, composição e estabilidade do leite é vital para melhorar a produtividade e a competitividade da atividade leiteira. Segundo Mühlbach (2000), o pastejo é altamente limitante, visto que: a) a quantidade e a qualidade da forrageira disponível é bastante variável; b) os animais gastam boa parte da energia consumida para colher o alimento e c) é muito difícil ajustar a suplementação à dinâmica produtiva das forrageiras. Para melhorar o quadro de subnutrição em que se encontra boa parte do rebanho leiteiro brasileiro, é fundamental uma adequada disponibilidade de forrageira para o ano todo, baseado nas necessidades e dinâmica do rebanho.

Diante desta realidade, montou-se um ensaio com o objetivo de estudar os efeitos da subnutrição, ordem e estágio de lactação sobre as propriedades físico-químicas e microbiológicas do leite e a ocorrência de leite instável não ácido.

Testou-se a hipótese que a ocorrência de leite instável não ácido está relacionada ao desequilíbrio nutricional e o aporte adequado de nutrientes pode reverter, pelo menos parcialmente, este quadro.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O leite bovino tem sido fonte de alimento para o homem desde a pré-história. O papel do leite na natureza é nutrir e fornecer proteção imunológica para os mamíferos jovens (Goff, 1995).

### 2.1 Qualidade do leite

A qualidade do leite é definida por parâmetros físico-químicos e microbiológicos. Depende da contagem de células somáticas (CCS), da nutrição, do potencial genético, do manejo, do estágio de lactação e do bem-estar da vaca lactante, além da população inicial e da taxa de proliferação dos microorganismos (Universal Brasil, 2006). É consenso da indústria e das autoridades sanitárias internacionais que o leite *in natura* de boa qualidade deve conter menos que 400 mil células somáticas e 100 mil bactérias totais por mililitro, estar livre de resíduos de medicamentos, preservantes, substâncias que modifiquem suas características físico-químicas ou organolépticas naturais, inclusive água (Cotrino & Gaviria, 2003). As normas internacionais estabelecem limite para a contagem bacteriana total (CBT) de 100 mil UFC/ml. A Instrução Normativa N° 51 (MAPA, 2002) fixou, para região Sul do Brasil, nível máximo de CBT de  $10 \times 10^5$ ;  $7,5 \times 10^5$  e  $3 \times 10^5$  UFC/ml e de CCS de  $10 \times 10^5$ ;  $7,5 \times 10^5$  e  $4 \times 10^5$ , a partir de 2005, 2008 e 2011, respectivamente.

## 2.2 Características físico-químicas do leite

### 2.2.1 Composição

O leite é uma dispersão de proteínas, aliada a uma emulsão de gorduras, harmonicamente dispersas em solução de lactose, soroproteínas e sais minerais (Hurley, 2006) (Figura 1).

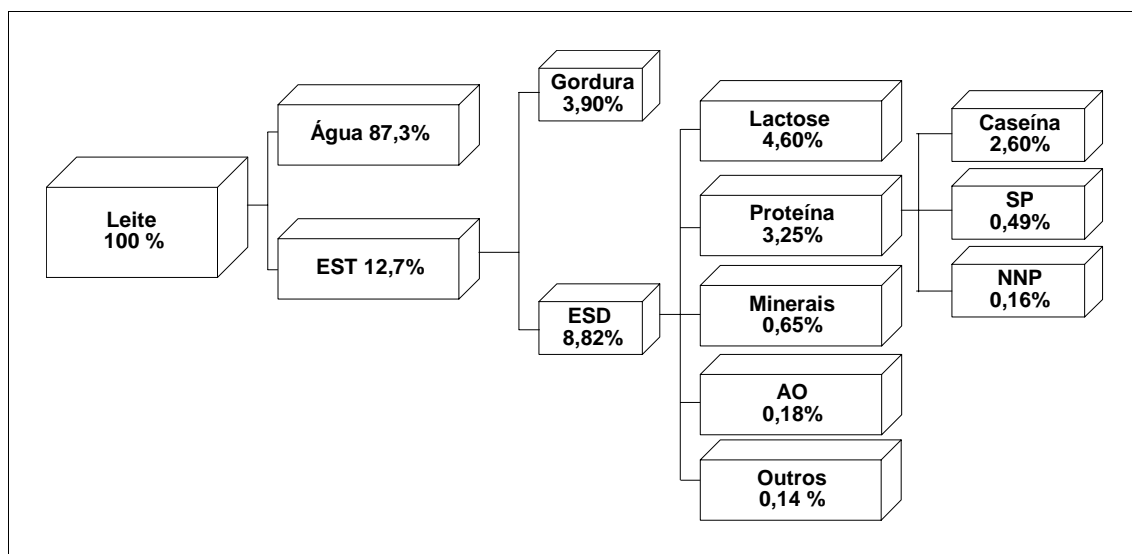


Figura 1: Composição média do leite bovino

NNP: nitrogênio não protéico, SP: soroproteínas, AO: ácidos orgânicos, ESD: extrato seco desengordurado, EST: extrato seco total

Fonte: Walstra & Jenness, 1984

### 2.2.2 Propriedades físicas

O leite bovino possui as seguintes propriedades médias: densidade 1023 -1040 g/l (15°C); ponto crioscópico -0,531 °H (12,5% EST, 4,75% lactose e 0,1% Cl<sup>-</sup>); ponto de ebulição 100 - 101 °C (1 atm); pH 6,6 - 6,8 (20 °C); acidez 0,13 - 0,17 g/l (ácido láctico); viscosidade 1,631 MPa/s (20 °C); calor específico 3,93 kJ/K.kg (15°C); tensão superficial 55,3 mN/m e condutividade elétrica 4,61- 4,92 MS/cm (Silva, 1997).

### 2.3 Fatores que afetam a composição do leite

A síntese e secreção dos componentes do leite são processos extremamente complexos e dependem de uma série de fatores: bem-estar animal, clima, manejo, ordem e estágio de lactação, sanidade, genética e, principalmente, da nutrição (Fonseca, 1993; Peres, 2001; Barros, 2002b; Mühlbach, 2003).

#### 2.3.1 Oferta e composição da dieta

Nos ruminantes devem ser considerados dois sistemas metabólicos: do próprio animal e dos microorganismos. Otimizar a produtividade requer o fornecimento de quantidades adequadas e equilibradas de nutrientes para estes dois sistemas. A dificuldade reside em conciliar as diferenças existentes entre as necessidades dos microorganismos e dos tecidos corporais.

Segundo Van Soest (1994), a estrutura e composição dos conteúdos ruminais são fortemente influenciadas pela dieta. O excesso de alimentos concentrados torna o ambiente mais viscoso, dificultando a mistura dos líquidos e a absorção dos ácidos graxos voláteis pela parede ruminal. Dietas com adequada quantidade de volumosos criam ambiente estratificado, com partículas densas ( $d > 1,2$ ) no fundo, líquido no intermédio e gases na cúpula. Segundo este autor, forma-se também uma camada flutuante bem definida, sobre a qual muitos microorganismos permanecem aderidos. Subnutrição, mudanças abruptas na dieta, substâncias tóxicas, medicamentos e estresse são alguns fatores que podem romper o equilíbrio ruminal.

As proporções dos ácidos graxos voláteis são fortemente alteradas

pela dieta e pela população de bactérias metanogênicas presentes no rúmen (Van Soest, 1994). As condições do ambiente ruminal são marcadamente alteradas pelas características do alimento, podendo afetar a produção e composição do leite (Mühlbach, 2003). Segundo este autor, os ácidos graxos voláteis produzidos no rúmen são a grande fonte energética para os ruminantes. A cota de participação de cada ácido graxo volátil no *pool* ruminal depende do substrato disponível aos microorganismos. Dietas ricas em concentrados estimulam as bactérias amilolíticas, enquanto aquelas à base de forragem favorecem as celulolíticas. A fermentação da fibra produz principalmente ácido acético e butírico, enquanto a degradação dos amidos e açúcares gera essencialmente ácido propiônico.

As bactérias fermentadoras de celulose preferem pH  $6,7 \pm 0,5$ . Valores abaixo deste intervalo afetam a fermentação, podendo levar à acidose ruminal (Van Soest, 1994). Quando a dieta é equilibrada, com no máximo 50% de concentrado, o pH se mantém dentro da faixa normal, havendo equilíbrio entre as espécies que habitam o rúmen. Ainda segundo Van Soest (1994), em ambientes ácidos, embora com menor eficiência (2 vs 4 ATP/mol de açúcar), os lactobacilos, como estratégia para eliminar a concorrência, deixam de produzir ácidos graxos voláteis para gerar ácido láctico, causando distúrbios ruminais que podem afetar o volume e a composição do leite produzido. Segundo Mühlbach (2003), para produzir leite de qualidade, os animais devem estar com boa saúde ruminal.

Para maximizar produção e composição do leite, dietas adequadas para o estágio inicial da lactação, devem conter 17-18% de proteína bruta,

sendo 60 - 65% degradável no rúmen e 30 - 35% solúvel. O teor mínimo de fibra em detergente ácido (FDA) deve ser de 18 - 20% ou de fibra em detergente neutro (FDN) de 27 - 30%, com 75% da FDN fornecida pelas forrageiras (Chase & Overton, 2006). O NRC (2001) recomenda teor dietético de FDN entre 25 e 28% da MS, dos quais 75% devem ser supridos pelos volumosos. De acordo com Chase & Overton (2006), adequada proporção de fibra garante uma atividade de mastigação e ruminação diárias de 9 a 11 horas. São necessárias, no mínimo, 8 horas diárias de ruminação para produzir quantidade suficiente de saliva e manter o pH ruminal acima de 6,0, o qual favorece a fermentação da fibra vegetal pela flora celulolítica (Mühlbach, 2003). Chase & Overton (2006) completam suas recomendações, indicando teor de carboidratos não fibrosos (CNF) de 35 - 40%, o que asseguraria adequado estímulo à síntese de proteína pelos microorganismos ruminais.

Dietas pobres em fibra e ricas em amido podem causar uma redução no teor de gordura do leite, pois interferem na produção de ácidos graxos voláteis no rúmen, afetando o metabolismo da gordura na glândula mamária (Waldner et al., 2006). Conforme estes autores, para manter normal a concentração de gordura do leite, a dieta deve conter em torno de 50% (40 - 60) de volumosos. Além da composição, o tipo e a forma física dos componentes dietéticos também interferem no pH, na proporção de ácidos graxos voláteis produzidos e na digestão da fibra no rúmen.

Manipulações da dieta podem alterar a concentração dos constituintes do leite. De acordo com Heinrichs et al. (2006), engendramentos dietéticos podem causar alterações de até 1,0 ponto percentual (pp) no teor de



gordura e 0,4 pp na concentração de proteína do leite. Por outro lado, gordura dietética protegida pode aumentar em até 1,5 pp a gordura do leite, enquanto que gordura não protegida tende a reduzi-la em até 1,0 pp. Para Roche & Dalley (1996), a proteína decresce entre 0,05 e 0,15 pp, independentemente do tipo de gordura fornecida.

A relação entre energia e proteína dietéticas tem grande importância para a correta nutrição dos ruminantes. Conforme Chase & Overton (2006), dietas deficientes em energia ou proteína podem reduzir em 0,1 a 0,3 pp a proteína bruta do leite. Entretanto, o fornecimento de proteína acima das necessidades do animal, tem pouco efeito sobre a concentração de proteína do leite produzido (Harris & Bachman, 2003; Chase & Overton, 2006).

A gordura é o macroconstituente do leite mais suscetível às variações da dieta, sendo, normalmente, reduzida pela subnutrição (Mühlbach, 2003). Alimentos ricos em carboidratos não fibrosos (CNF > 45%) ou pobres em fibra em detergente neutro (FDN < 26%) podem reduzir em 1,0 pp ou mais a concentração de gordura e aumentar em 0,1 a 0,3 pp o teor de proteína do leite (Schroeder, 1996). Existe uma correlação linear entre a concentração de gordura do leite e a fibra em detergente ácido (FDA) dietética: cada kg de fibra corresponde a 90-220 g de gordura, desde que a densidade nutricional da dieta e o consumo de matéria seca não sejam comprometidos. Concentrações de 22% de FDA na matéria seca dietética são suficientes para prevenir a depressão da gordura do leite (Roche & Dalley, 1996).

Os aspectos quantitativos e qualitativos dos ingredientes que compõe a dieta ofertada às vacas leiteiras afetam marcadamente a

composição e a qualidade nutricional do leite produzido. A subnutrição geralmente reduz o teor de lactose e aumenta a concentração de gordura do leite (Lacy-Hulbert et al., 1999; Mustafa, 2006). Dietas cuja relação entre energia e proteína é baixa afetam negativamente a concentração, tanto da gordura quanto da proteína do leite (Mustafa, 2006). Segundo o NRC (2001), uma relação entre nutrientes digestíveis totais (NDT) e proteína degradável no rúmen (PDR) de 6,52 é desejável.

Uma série de experimentos tem sido realizada para avaliar os efeitos da dieta sobre a constituição do leite. Acosta et al. (2002) ofertaram três níveis de pasto (8, 14 e 20 kg MS/dia) e três níveis de concentrado (0, 3 e 6 kg MS/dia). A suplementação com 6 kg de concentrado aumentou em 0,09 pp a proteína e reduziu em 0,18 pp a gordura do leite. Lacy-Hulbert et al. (1999) avaliaram a composição do leite de vacas em pastejo, no terço final da lactação, com oferta de 8 ou 16 kg MS/vaca/dia. Com exceção da lactose e do potássio que diminuíram, todos os demais constituintes analisados (proteína, gordura, proteína verdadeira, soroproteínas, caseínas, imunoglobulinas, albumina do soro bovino, sódio e cálcio) aumentaram no leite das vacas com menor oferta de pasto. Segundo os autores, o aumento ocorreu pela concentração, em virtude da redução em 36% no volume de leite produzido.

Em experimento realizado por Mackle et al. (1999), vacas sob pastejo *ad libitum*, suplementadas com concentrado, produziram leite com menor teor de gordura e uréia, que vacas em pastejo restringido (50% *ad libitum*), sem suplementação. A lactose e as imunoglobulinas também apresentaram menor concentração no leite dos animais em pastejo *ad libitum*

suplementado, mas apenas no verão. Já as concentrações de proteína total, proteína verdadeira, caseína, soroproteínas, alfa-lactoalbumina, beta-lactoglobulina e nitrogênio não caseínico aumentaram nas vacas suplementadas. Os pesquisadores também constataram que o pastejo restritivo e sem suplementação com concentrado reduziu as concentrações de todos os ácidos graxos saturados (exceto aqueles com 4, 17 ou 18 carbonos), mas aumentou a porcentagem dos ácidos graxos monoinsaturados. Auldist et al. (2000) compararam vacas Holandesas em pastejo *ad libitum* (oferta > 45 kg MS/vaca/dia) com vacas em pastejo restritivo (oferta < 18 kg MS/vaca/dia). Animais pastejando *ad libitum* tiveram maior porcentagem de proteína e caseína no leite. O resultado foi atribuído ao maior consumo de matéria seca e energia, propiciando economia de aminoácidos que seriam utilizados na gliconeogênese, para a síntese da proteína do leite. Zanela et al. (2006) constataram redução na concentração de proteína, lactose e extrato seco total e aumento no teor de uréia no leite de vacas Jersey subnutridas.

### 2.3.2 Estação do ano: efeitos do clima sobre a produção e qualidade das forrageiras e o bem-estar e desempenho dos animais

As flutuações climáticas que acontecem com o decorrer das estações do ano afetam tanto a produtividade e qualidade das forrageiras, quanto o bem-estar dos animais, refletindo-se marcadamente na produção e composição do leite. Holt & Muir (1979) analisaram leites do Sul da Escócia e constataram variação sazonal para o citrato (7,4 - 10 mM), cálcio total (25,8 - 30,2 mM) e cálcio solúvel (6,6 - 8,8 mM). Waldner et al. (2006) verificaram que

as concentrações de gordura e proteína são maiores no outono e inverno e menores durante a primavera e verão, em virtude da melhor qualidade das forrageiras disponíveis nos meses de outono-inverno. Bernabucci et al. (2002) constataram menor concentração de proteína e caseína e maior de soroproteína no leite produzido no verão. Segundo os autores, estas variações relacionam-se tanto ao tipo de alimento disponível quanto ao estresse dos animais, por causa das mudanças nas condições climáticas com o decorrer do ano. Na Argentina, Negri et al. (2004) observaram variação sazonal para a uréia e lactose.

Gonzalez (2002) analisou a qualidade do leite em diferentes sistemas de produção, durante 11 meses, na bacia leiteira de Pelotas e constatou que a composição do leite varia sazonalmente, em virtude das flutuações na quantidade e qualidade dos alimentos ofertados aos animais.

### 2.3.3 Ordem e Estádio de lactação

Geralmente, acréscimos na produção são acompanhados por decréscimos na concentração de gordura e proteína do leite. Assim, os teores de gordura e proteína são maiores no início e final da lactação e menores no pico de produção (Osternsen et al., 1997; Teixeira et al., 2003; Hurley, 2006; Waldner et al., 2006). Conforme Barros (2006), os teores de sais e de cálcio iônico seguem a mesma tendência da gordura e da proteína.

De acordo com Waldner et al. (2006), a gordura permanece relativamente constante, enquanto a proteína aumenta até a terceira lactação, passando a decrescer entre 0,02 e 0,05 pontos percentuais a cada ciclo

produtivo. Embora a caseína diminua, as soroproteínas aumentam com a ordem de lactação, elevando a proteína total até a terceira lactação, quando passa a declinar gradualmente. (Ng-Kwai-Hang et al., 1984).

As proporções entre as proteínas coloidais e as soroproteínas modificam-se ao longo da lactação. Osternsen (1997) verificou proporção entre caseínas e soroproteínas máxima no estágio intermediário da lactação, enquanto o nitrogênio não protéico decresceu permanentemente até o final do período produtivo. Segundo este autor, as proporções de alfa<sub>s</sub> e kappa-caseína decrescem, enquanto a beta-lactoglobulina aumenta à medida que a lactação avança. Lopes et al. (2006) obteve porcentagens de caseína de 2,35; 2,46 e 2,78 para o terços inicial, intermediário e final da lactação, respectivamente.

O perfil de ácidos graxos também varia com a fase de lactação. Kay et al. (2005) observaram aumento de 3,1 para 5,4 e de 10,7 para 14,1 mg/g de ácido graxo entre a 1<sup>a</sup> e 16<sup>a</sup> semana de lactação para ácido linoléico conjugado e ácido vacênico, respectivamente. A síntese *de novo* aumentou, enquanto os ácidos graxos pré-formados diminuiram com o avanço da lactação.

#### 2.3.4 Efeitos genético-ambientais sobre a composição do leite

De acordo com Schroeder (1996), 55% da variação na composição do leite relacionam-se à genética, enquanto 45% é causada por fatores ambientais. Climas inóspitos, como estiagem, temperatura e umidade do ar alta, provocam déficit energético, em virtude do estresse térmico, podendo reduzir o ESD do leite em até 0,5 pp (Harris & Bachman, 2003). Em períodos muito quentes, as vacas reduzem o consumo de matéria seca, o que, segundo

Linn (1977), causa uma redução no teor de gordura e na produção de leite. Conforme este autor, ocorre estresse térmico quando se torna difícil para a vaca manter normal a temperatura interna do corpo (38,50 – 39,33 °C).

O clima quente do verão favorece o crescimento microbiano, especialmente fungos e bactérias, e deprime o sistema imune dos animais, aumentando o risco de ocorrências de doenças infecciosas . De acordo com Santos (2001), o estresse térmico, aliado à maior proliferação de microorganismos nos períodos quentes e úmidos, aumenta o risco de novas infecções da glândula mamária que podem modificar as proporções entre os constituintes do leite. Temperaturas fora da zona termo-neutra (5 a 20 °C), afetam o consumo de matéria seca, reduzem a produção e alteram a composição do leite (NRC, 2001).

#### 2.3.4.1 Efeitos inter-raciais sobre a composição do leite

As características genéticas ligadas à raça estão entre os fatores que mais afetam a produção, composição e características físicas do leite. As duas principais raças de leite existentes no RS, Holandesa e Jersey, produzem leite substancialmente diferente. Young (2001) relata que o leite de vacas Jersey tem em torno de 2-3 mg/dl de uréia a mais que o leite de vacas Holandesas. Hurley (2006) caracteriza o leite das vacas Jersey, como mais protéico (3,9 vs 3,1%), gorduroso (5,5 vs 3,5%) e concentrado (15,0 vs 12,2%) que o leite das vacas Holandesas. O leite das raças Pardo Suíço, Ayrshire e Guernsey contém valores intermediários de gordura e proteína. Diferentemente da proteína e da gordura, o teor de lactose e minerais oscila muito pouco entre

as raças de aptidão leiteira ( $\leq 0,3$  e  $< 0,1$  pp, respectivamente). Além da quantidade de gordura, o tamanho dos glóbulos também pode variar entre leites de diferentes raças. Entre as raças especializadas, as vacas Holandesas produzem o leite cujas gotículas de gordura possuem o menor diâmetro, enquanto as vacas Guernsey secretam leite com o menor diâmetro de partícula de gordura (Mustafa, 2006).

Uma vez que a estabilidade das micelas relaciona-se, entre outros fatores, com o teor de proteína, uréia e minerais, leites de distintas raças podem ter diferentes tempos de coagulação térmica.

#### 2.3.4.2 Efeitos intra-raciais sobre a composição do leite

Auld et al. (2000) relatam que vacas portadoras da variante genética AA da beta-lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) têm maior porcentagem de soroproteínas (SP) e  $\beta$ -Lg, mas menores teores de alfa-caseína ( $\alpha$ -CN) e kappa-caseína ( $\kappa$ -CN) (no verão) e BSA (albumina do soro bovino) que vacas com a variante BB, independente do nível de oferta de forragem. Segundo Bovenhuis et al. (1992), as variantes genéticas da  $\kappa$ -CN estão associadas à porcentagem de proteína, enquanto que as variantes genéticas da  $\beta$ -Lg estão mais associadas ao teor de gordura do leite.

#### 2.3.5 Influência das infecções na glândula mamária sobre a composição do leite

As conseqüências patológicas da mastite são danos aos tecidos e alterações na função secretora, com alta liberação de leucócitos no leite

(Jones, 1998). Em leite mastítico, os níveis de gordura e lactose diminuem, enquanto a proteína total modifica-se muito pouco, visto que o decréscimo na caseína é compensado pelo aumento nas soroproteínas (Waldner et al., 2006). Wielgosz-Groth & Groth (2003) observaram aumento na porcentagem de proteína e no valor do pH e redução na lactose e caseína no leite de vacas com mastite. Em quadro mastítico, a caseína é degradada pelas proteinases bacterianas e endógenas, enquanto a síntese é reduzida pelos danos físicos às células secretoras, causados por toxinas microbianas (Auldist & Hubble, 1998). O decréscimo no teor de caseína pode ser causado pela hidrólise da beta e alfa-caseína, em consequência do aumento da atividade da plasmina (Fox, 1981b). Tonelli et al. (2006) relatam redução de 0,55 pp na lactose e aumento de 0,50 pp na proteína, quando a contagem de células somáticas passou de 100 mil para mais de 3 milhões/ml. A mastite provoca aumento da rota paracelular de secreção de constituintes do sangue para o leite, gerando desequilíbrio salino, aumento do pH e diminuição da estabilidade das proteínas (Silva & Almeida, 2006). Embora o potássio diminua em leite com alta contagem de células somáticas, o teor de sais eleva-se em consequência do aumento no teor de sódio e cloro (Shamay, 2003). O teor de lactose diminui durante a mastite em virtude do extravasamento para a corrente sanguínea e do desdobramento pelos microorganismos infectantes (Auldist & Hubble, 1998).

#### 2.4 Micelas de caseína

Micelas são agregados de substâncias com ação surfactante que formam emulsões com solventes polares. As caseínas, que constituem



aproximadamente 3/4 da proteína do leite (Goff, 1995), organizam-se na forma de micelas, formando partículas normalmente estáveis. As micelas são constituídas essencialmente por 4 tipos de caseínas: alfa-s1 ( $\alpha_{s1}$ -CN), alfa-s2 ( $\alpha_{s2}$ -CN), beta ( $\beta$ -CN) e kappa ( $\kappa$ -CN). As micelas podem ser desestabilizadas mediante redução do pH, aquecimento, ação da enzima renina, pelo cálcio iônico e por desidratação. A estabilidade do leite ao álcool reside justamente em sua capacidade de resistir à desidratação. Por isso, é fundamental o conhecimento da estrutura e composição das micelas para o entendimento do mecanismo de coagulação do leite na prova do álcool.

#### 2.4.1 Estrutura das micelas

As caseínas possuem relativamente pouca estrutura secundária ou terciária, por isso não sofrem desnaturação térmica. No leite, organizam-se na forma de micelas, formando uma emulsão de partículas de caseína, com a região hidrofóbica voltada para o interior e a região hidrofílica na superfície em contato com a fase aquosa. A estrutura das micelas é mantida pelo fosfato de cálcio coloidal e pelas interações hidrofóbicas (Walstra, 1999) (Figura 2).

As micelas são partículas esferóides, com diâmetro entre 20 e 300 nm, constituídas por 20 a 150 mil moléculas de caseína, estruturadas em unidades menores, denominadas de submicelas. As submicelas possuem diâmetro de 10-20 nm, contêm 10-100 moléculas de caseína e massa de  $0,25 - 2,0 \times 10^6$  D (Walstra & Jenness, 1984). As subunidades são mantidas juntas pelo fosfato de cálcio coloidal, com contribuições do hidrogênio e interações hidrofóbicas (Fox & Morrissey, 1977). O fosfato de cálcio coloidal

atua como aglutinante entre os milhares de subunidades que compõem as micelas de caseína. As micelas são constituídas, essencialmente, por  $\alpha_{s1}$ ,  $(\beta+\gamma)$ ,  $\kappa$  e  $\alpha_{s2}$  caseína, na proporção molar de 8:8:3:2, respectivamente (Walstra & Jenness, 1984).

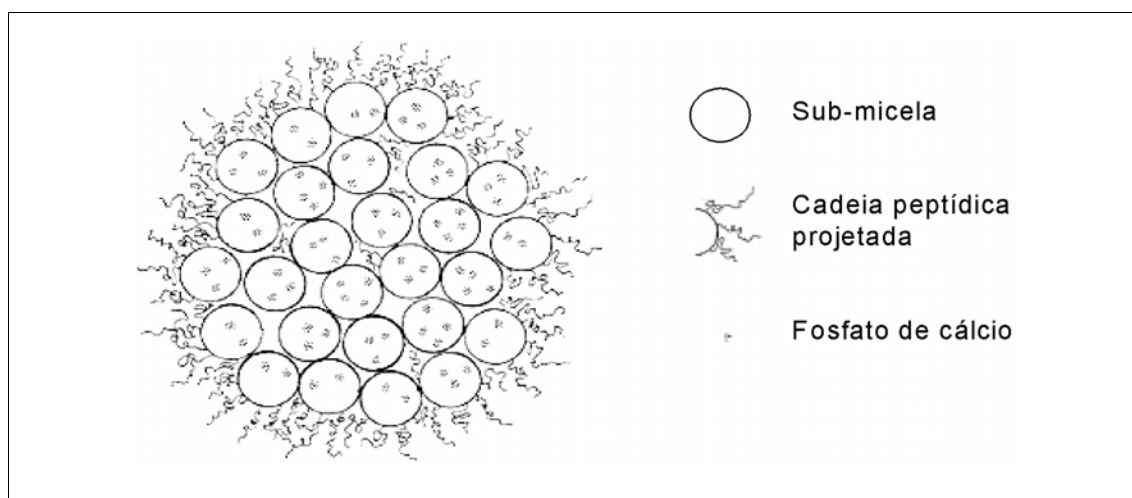


Figura 2. Modelo esquemático da micela de caseína, mostrando as sub-micelas (unidades estruturais), cadeias peptídicas projetadas no meio aquoso (camada dinâmica) e fosfato de cálcio coloidal (unidades aglutinantes)

Fonte: Walstra, 1999

As micelas são estruturas porosas, com volume específico em torno de 4 ml/g, ocupando 6-12% do volume do leite (Goff, 1995). Possuem 7-8% de matéria inorgânica, essencialmente cálcio e fosfatos (Walstra, 1990).

Segundo a teoria da "camada dinâmica", as extremidades hidrofílicas das moléculas de kappa-caseína micelares, projetam-se no ambiente aquoso, formando uma zona hidrodinâmica de baixa densidade, em permanente contato com a fase aquosa. Estes segmentos flexíveis polares repelem fisicamente outras micelas. Assim, a "camada dinâmica" de kappa-caseína forma uma barreira, a qual impede que a aproximação entre as

micelas seja suficiente para ocorrer agregação, contribuindo para a estabilidade do sistema coloidal caseínico (Figura 3).

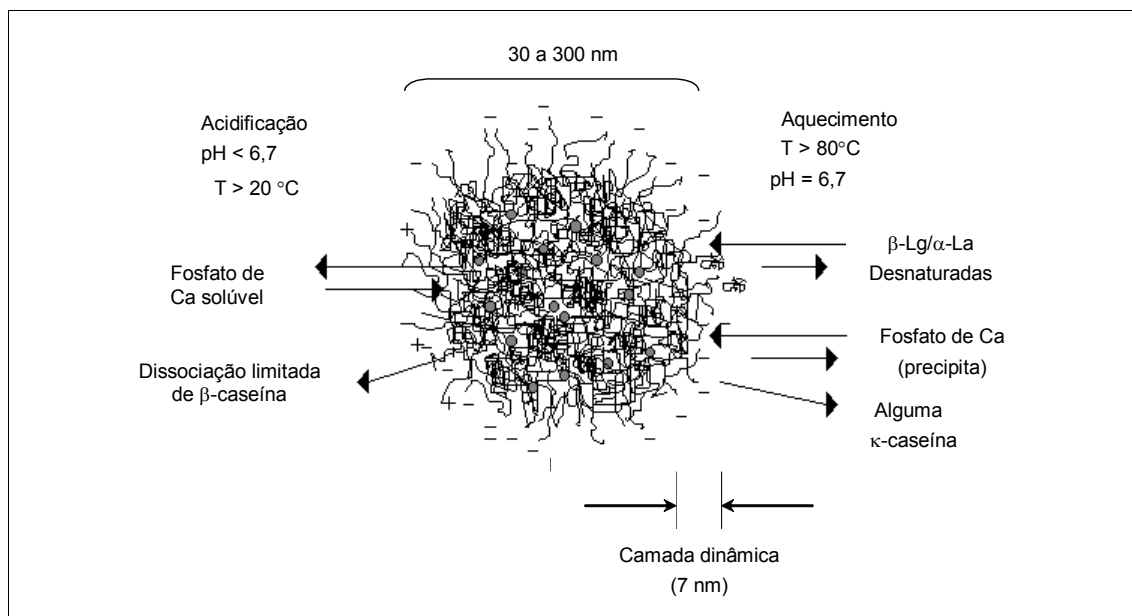


Figura 3. Modelo esquemático da micela de caseína, mostrando a presença da camada dinâmica e os efeitos do aquecimento e da acidificação sobre a associação e precipitação do fosfato de cálcio, kappa-caseína ( $\kappa$ -CN), beta-lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) e alfa-lactoalbumina ( $\alpha$ -La).

Fonte: Goff, 1995.

Os segmentos hidrofílicos podem ser removidos pela enzima quimosina ou por mudanças nas propriedades do solvente. As características do solvente podem ser alteradas pela adição de substâncias com baixa constante dielétrica, como por exemplo, álcool etílico (Horne & Parker, 1981b; Goff, 1995; Horne, 1987; Singh, 2004).

#### 2.4.2 Estabilidade das micelas

Segundo Goff (1995), os seguintes fatores interferem na estabilidade das micelas de caseína: a) Cálcio iônico: em excesso, neutraliza as cargas

negativas das micelas, desestabilizando-as; b) Ligações de hidrogênio: ocorrem entre as caseínas, mas não com muita frequência, pois elas não possuem estrutura secundária; c) Ligações dissulfeto: alfa e beta-caseína não possuem nenhum resíduo de cisteína, portanto, caso formem-se ligações dissulfeto (S-S) internas, elas não interferem na estabilização dos colóides; d) Interações hidrofóbicas: a hidrofobicidade das caseínas é fundamental para mantê-las dispersas e estáveis; e) Interações eletrostáticas: algumas subunidades podem unir-se mediante ligações iônicas; f) Forças de Van der Waals: ainda não demonstrado sua relevância para a estabilidade das micelas; g) Interações estéricas: a "camada dinâmica" evita que as micelas aproximem-se o suficiente para interagir e coalescer. Conforme este autor, concentração de sais, pH, temperatura e desidratação modificam estas interações, podendo aumentar a reatividade superficial das micelas, levando-as à coagulação.

A estabilidade das micelas depende da presença de  $\kappa$ -CN na superfície, onde forma uma interface entre as caseínas apolares do interior da micela e as entidades polares da fase aquosa (Creamer et al., 1998). A coagulação do leite, a altas temperaturas, é uma consequência da perda da estabilidade das micelas, por causa das mudanças físico-químicas em seus componentes (Singh, 2004). Segundo este autor, os grupos carboxila e éster fosfatos, localizados na superfície, tornam a micela altamente negativa, conferindo-lhe estabilidade eletrostática. De acordo com Singh & Fox (1987a), a complexação da beta-lactoglobulina com a kappa-caseína parece estabilizar as micelas em pH entre 6,5 e 6,7; possivelmente via aumento da carga micelar, ou grau de hidratação, ou pela prevenção da dissociação de kappa-caseína. À

medida que aumenta o pH, a concentração de cálcio iônico diminui e as micelas tornam-se mais estáveis. Ao mesmo tempo, ocorre a polimerização e defosforilação das proteínas, tornando as caseínas menos estáveis. Assim, menores concentrações de cálcio podem induzir a precipitação micelar (Darling, 1980). Relatos deste autor mencionam que, após ocorrer a reação entre beta-lactoglobulina e kappa-caseína, tanto as pontes bissulfeto entre as micelas, quanto a remoção da kappa-caseína podem levar a instabilidade.

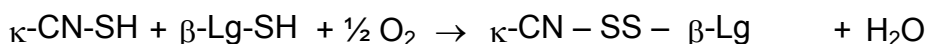
As micelas encontram-se como suspensões coloidais estáveis no pH do leite (6,6-6,8), em virtude da barreira energética gerada pelas cargas negativas e das repulsões físicas, devidas aos segmentos hidrofílicos (Horne & Parker, 1981b; Horne, 1987). A agregação micelar pode ser causada por fatores externos ao sistema, podendo ser reversível ou irreversível. A coagulação reversível pode ser originada por mudanças no pH, teor de sais ou composição do leite (Negri, 2002; Holt, 2004). O álcool, a quimosina e o calor ocasionam coagulação irreversível (Negri, 2002).

Os testes mais utilizados para avaliar a estabilidade térmica do leite são o banho de óleo, a 140 °C, até coagulação visível; prova do álcool; teste do branqueamento; sedimentação da proteína e determinação da viscosidade. Estes métodos, contudo, geralmente têm baixa correlação com a estabilidade térmica do leite, em sistemas comerciais de processamento (Singh, 2004). De acordo com este pesquisador, para a indústria, a implantação de esterilizadores em escala piloto, ou de laboratório, fornece melhores resultados, possibilitando previsões mais confiáveis do comportamento do leite em plantas comerciais.

### 2.4.3 Mudanças nas micelas

O aquecimento provoca desnaturação e reações das soroproteínas (SP) com as micelas de caseína (CN). A kappa-caseína ( $\kappa$ -CN) da superfície micelar complexa-se com a beta-lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) do soro, por meio de ligações dissulfeto específicas (Singh, 2004; Singh & Fox 1987a). Esta união causa a exposição de resíduos de cistina, localizados na para- $\kappa$ -CN, permitindo o acesso de outras proteínas. A maneira que os aglomerados de  $\beta$ -Lg penetram a "camada dinâmica" para encontrar as ligações dissulfeto da  $\kappa$ -CN ainda é desconhecida. Talvez o aquecimento gere mudanças na "camada dinâmica" ou cause rearranjo da superfície da micela, permitindo que a interação aconteça (Singh, 2004). O processo de interação entre a  $\kappa$ -CN e as SP não está completamente esclarecido. As  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  e  $\beta$ -CN também dissociam-se das micelas, porém em grau muito menor (Singh, 2004). Enquanto as soroproteínas coagulam pela desnaturação térmica, as caseínas coagulam pela agregação micelar (Silva & Almeida, 2006). De acordo com estes autores, quando mantidas em torno de 140 °C, durante 1 h, as caseínas perdem grupos fosfatos, sofrem hidrólise parcial, ao mesmo tempo em que as cadeias laterais mais expostas reagem com íons ou moléculas da fase aquosa do leite. Além de aumentar o tamanho das micelas, as soroproteínas (SP) formam complexo CN-SP, cujo potencial zeta é maior que aquele das micelas originais, o que realmente contribui para a estabilidade micelar (Anema & Li, 2003). As micelas cobertas por soroproteínas são mais estáveis ao calor, cálcio iônico, álcool ou renina que aquelas sem cobertura (Singh & Fox, 1986). As micelas dispersas em meios com pH acima de 6,8, que perdem a  $\kappa$ -CN pela

ação do calor, têm menor potencial zeta e maior sensibilidade ao aquecimento, álcool e cálcio iônico que as micelas originais (Singh, 2004). As concentrações de cálcio e fosfato solúveis, envolvendo interações eletrostáticas, têm forte efeito sobre a dissociação da  $\kappa$ -CN micelar (Singh & Fox, 1987b). Segundo estes autores, o aumento da carga negativa das micelas provoca a dissociação da  $\kappa$ -CN. As moléculas de  $\kappa$ -CN das micelas, unem-se mediante ligações dissulfeto, formando polímeros com massa atômica entre 300 e 600 kDa (Singh, 2004). Silva & Almeida (2006) sugerem que a kappa-caseína ( $\kappa$ -CN) reage com beta-lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) e alfa-lactoalbumina ( $\alpha$ -La) segundo as seguintes equações:



Os produtos destas reações precipitam com a caseína, resultando em maior concentração de nitrogênio caseínico em leites que passaram por tratamento térmico.

As causas da dissociação da kappa-caseína ( $\kappa$ -CN) das micelas em pH levemente alcalino não estão totalmente elucidadas. É provável que a quebra térmica das ligações dissulfeto aumente a dissociação da  $\kappa$ -CN das micelas (Singh, 2004). De acordo com este pesquisador, a dissociação provavelmente ocorra em virtude das repulsões eletrostáticas entre kappa-caseína e outros componentes micelares, quando a carga superficial atinge determinado valor crítico. Modificações na distribuição das cargas sobre a  $\kappa$ -CN pode também ocorrer como resultado de outras mudanças induzidas pelo calor, tais como reações de Maillard. A dissociação pode, alternativamente,

envolver a conversão de fosfato de cálcio coloidal a uma forma com menor capacidade de ligar-se à caseína e de manter a estrutura da micela.

## 2.5 Prova do álcool

A utilização de solução alcoólica para avaliar a qualidade do leite *in natura* é uma prática centenária, sendo o primeiro indicador da aptidão do leite ao consumo humano (Cotrino & Gaviria, 2003). A prova do álcool é utilizada na Holanda desde 1930 e no Uruguai, a partir de 1938 (Barros, 2002a). Conforme este pesquisador, no princípio, esta análise foi utilizada para avaliar a acidez original do leite, visto que elevada concentração de íons hidrogênio desestabiliza as caseínas.

O teste do álcool consiste na mistura de partes iguais de leite e solução alcoólica. Quando o álcool é suficientemente concentrado para desestabilizar as micelas de caseína, coágulos de proteínas são formados (Barros, 2006).

Negri et al. (2004), avaliaram a capacidade do teste do álcool em estimar a estabilidade térmica do leite *in natura*, com pH (6,6-6,8) e acidez (14 - 16 °D) dentro das faixas normais. A estabilidade ao álcool foi avaliada com etanol 72 e 78% v/v e a estabilidade térmica foi medida como tempo de coagulação em banho de glicerina a 140 °C, utilizando capilares de vidro. Cerca de um terço das amostras estáveis ao álcool, mostraram instabilidade térmica. Em apenas 52% das amostras houve coincidência de resultados entre as duas análises. Por estes resultados, 52% representa o grau de confiabilidade na avaliação da estabilidade térmica mediante a prova do álcool.



Segundo Barros (2006), a subnutrição é uma das principais causas da instabilidade do leite ao álcool. Ponce & Hernandez (2001) analisaram o leite de vacas com déficit nutricional entre 50 e 60% e obtiveram resultado positivo ao álcool em 50% das amostras, com acidez abaixo de 13 °D. Veloso (1998) relata que silagens pobres, ou o excesso de concentrado protéico podem aumentar a positividade ao álcool. Paez et al. (2006) constataram que dez dias após o parto o leite estabiliza termicamente, mas mantém-se instável ao álcool. O colostro (até o 10º dia), além de ser mais ácido e protéico (Veloso, 1988), contém valores mais elevados de cálcio iônico (Barros, 2002a), sendo extremamente sensível à coagulação pelo álcool. O cálcio iônico é mais elevado nos terços inicial e final da lactação, o que torna o leite destes períodos mais suscetível à desidratação alcoólica (Barros, 2002a). Marques et al. (2006) relatam que a adição de sais aniônicos à dieta reduziu em 8,3 pp a concentração do álcool necessária para coagular o leite.

Segundo Horne & Parker (1981a), as soroproteínas têm pouco efeito sobre a prova do álcool. Estes pesquisadores removeram completamente as SP e não obtiveram qualquer mudança de estabilidade do leite ao álcool. Conforme os autores, estas proteínas não desempenham nenhum papel importante no processo de coagulação pelo álcool.

O perfil da curva que correlaciona o pH com a estabilidade do leite ao álcool é do tipo sigmoidal, controlada pelos níveis de cálcio iônico do sistema (Horne & Muir, 1990), pH e força iônica (Horne & Parker, 1981b). A concentração do leite rebaixa progressivamente o segmento alcalino, mas não causa nenhuma alteração no lado ácido da curva que correlaciona o pH com a

estabilidade do leite ao álcool (Figura 4a). Entretanto, a adição de cálcio iônico ao leite desloca integralmente o perfil da curva para a direita, sem alterar significativamente seus parâmetros característicos: declividade, ponto de inflexão e pontos assintóticos de máxima e de mínima estabilidade (Figura 4b).

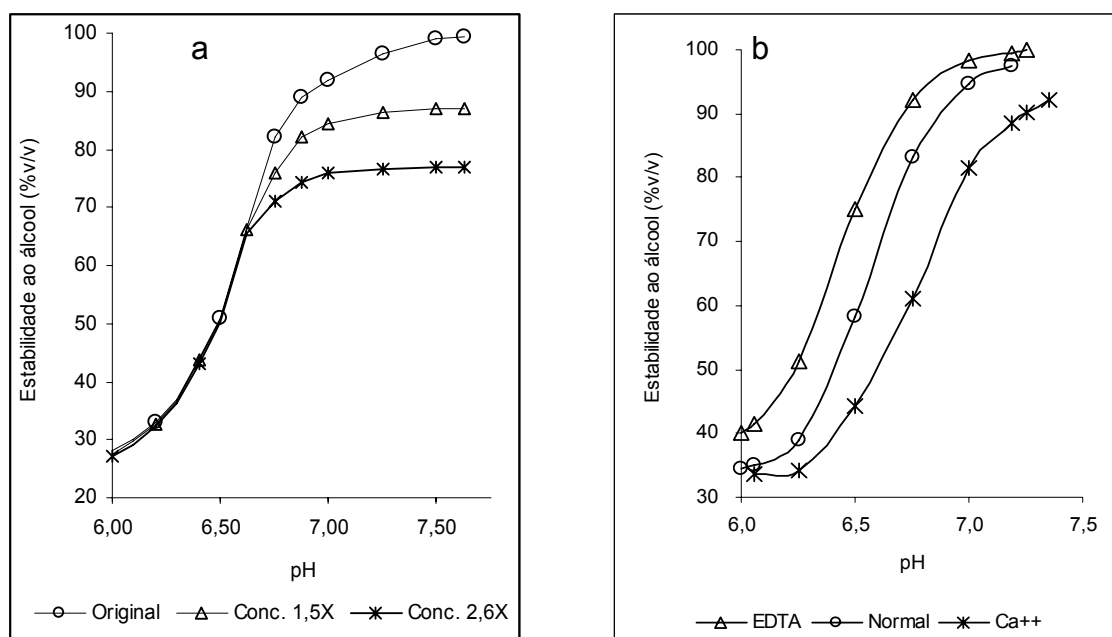


Figura 4. Mudanças no perfil da curva de estabilidade do leite ao álcool em função do pH: (a) concentração 1,5 vezes ou 2,6 vezes em relação ao original (b) com adição de Ca<sup>++</sup> ou EDTA

Fonte: Horne e Parker, 1983

A complexação dos íons cálcio pela adição de EDTA, ao contrário, desloca da curva para a esquerda (Horne e Muir, 1990). O aditamento de NaCl ao leite causa efeito semelhante ao provocado pela concentração (Horne & Parker, 1983). Este efeito do cloreto de sódio sobre a estabilidade do leite ao álcool explicaria porque o leite de vacas em avançado estágio de lactação, que é mais salino, apresenta maior incidência de positivos na prova do álcool.

A adição de cálcio iônico reduz a estabilidade do leite ao álcool em

qualquer faixa de pH. A magnitude da redução depende do pH do leite analisado (Horne & Parker, 1981a). A elevação do pH aumenta tão marcadamente a estabilidade do complexo micelar que a mistura de partes iguais de leite e álcool 100%, freqüentemente, falha em induzir a precipitação das micelas de caseína (Horne e Muir, 1990).

## 2.6 Mecanismos de ação do álcool

A diminuição das cargas negativas das micelas reduz a estabilidade do leite ao álcool, visto que a solubilidade dos sais depende da constante dielétrica (CD) do meio (Horne, 1987). O etanol tem CD menor que a água (24,30 vs 78,54) (Stanley, 2006), o que diminui o grau de ionização dos grupos R das proteínas. Isto faz com que elas se agreguem e precipitem. A água, como solvente, facilita a separação de componentes iônicos, pela extraordinária diminuição das forças eletrostáticas existentes entre eles (Stanley, 2006). A presença do etanol reduz o poder segregante do meio, facilitando a coalizão das partículas. Assim, álcool mais concentrado causa maior precipitação das proteínas, pois reduz mais a CD do ambiente. Entretanto, estudos de Molina et al. (2001) demonstraram que o aumento na concentração do álcool não garante a seleção de leite mais estável ao tratamento térmico. Os pesquisadores constataram uma fraca correlação entre estes parâmetros

Os sais minerais desempenham papel fundamental na estabilidade do leite ao álcool. O desequilíbrio salino pode elevar a positividade na prova do álcool, mesmo que o leite não esteja ácido (Silva & Almeida, 2006). Para Horne

& Parker (1981a), ao contrário dos divalentes, os íons monovalentes não têm efeito significativo sobre a estabilidade do leite ao álcool, causando apenas pequenas flutuações na estabilidade máxima.

A quantidade de cálcio livre no leite varia inversamente ao pH do meio. Quanto maior o pH, tanto maior a quantidade de cálcio iônico sequestrado pelos ânions fosfato. Com menos cálcio iônico em solução, a barreira energética a ser ultrapassada para provocar a coagulação das micelas torna-se maior. Por conseguinte, maior deve ser a concentração da solução alcoólica para causar a precipitação micelar (Horne & Parker, 1981b; Horne & Muir, 1990; Barros et al., 2000). Horne & Parker (1981b) removeram o fosfato e o malato do leite. Sem estes dois componentes, a fase de transição da curva da estabilidade ao álcool em função do pH foi completamente removida, tornado-a linear. Conforme estes autores, sem o fosfato e o malato para remover o cálcio iônico do meio, mesmo em valores de pH elevados, o leite tornou-se instável ao álcool. Este efeito foi semelhante ao obtido pela adição de cálcio. Ambos efeitos (remoção de fosfato ou adição de cálcio) foram atribuídos, por Horne & Parker, à ausência de quelantes.

O pré-aquecimento muda o perfil de estabilidade ao álcool para valores de pH mais ácido, de maneira semelhante àquela causada pela adição de fortes sequestrantes de cálcio (Horne & Parker, 1981c). Segundo estes autores, o pré-aquecimento causa a precipitação do fosfato de cálcio, reduzindo a concentração de íons cálcio do meio.

O tipo e densidade dos nutrientes da dieta, especialmente de minerais, pode afetar as interações entre o leite e a solução alcoólica. Barros

(2001) atribui a instabilidade do leite ao álcool às altas concentrações de cálcio das pastagens, às suas deficiências ou desequilíbrios minerais, além das repentinas mudanças na dieta das vacas.

Fundamentalmente, os testes do álcool e de estabilidade térmica diferem, porque o prolongado tempo de aquecimento do último permite a ocorrência de múltiplas reações químicas concorrentes (Horne & Muir, 1990). Segundo estes autores, algumas destas reações são benéficas (uréia), enquanto outras (SP) são prejudiciais. Quando estas reações são reduzidas, as duas análises comportam-se de maneira semelhante. Parte desta falta de correlação pode ser devida à maneira por meio da qual a estabilidade ao álcool é avaliada: rápida e inadequada, utilizando apenas uma concentração de etanol (Horne & Parker, 1983). A precipitação do leite induzida pelo álcool é processo complexo. É improvável, portanto, que tão simples teste possa refletir as intrincadas interações existentes entre os múltiplos fatores que governam a estabilidade térmica das micelas (Horne & Parker, 1982).

Os mecanismos envolvidos na precipitação do leite pelo álcool foram assim propostos por Horne & Parker (1981b): as micelas de caseína, em pH normal (6,6 - 6,8), estão negativamente carregadas. Essas cargas são fundamentais para sua estabilização em solução. As cargas das micelas são controladas pela quantidade de cálcio ligado e, conseqüentemente, pelo nível de cálcio livre no sistema. Aumentando o cálcio total, aumenta a quantidade de cálcio ligado e reduz as cargas negativas das micelas, diminuindo assim, a barreira energética para a coagulação. Inversamente, reduzindo o nível de cálcio, aumenta as cargas negativas das micelas, aumentando a repulsão entre

elas, dificultando a coagulação. A intensidade da barreira de energia pode também ser controlada pela variação da força dielétrica do meio. Esse é o papel do etanol. A baixos valores de pH, a barreira energética é suficientemente baixa, ocorrendo a coagulação pela presença do álcool com concentração em torno de 20 % v/v. À medida que o pH aumenta, o nível de cálcio iônico do leite diminui, por causa do seu seqüestro pelos íons fosfato. Diminuindo as ligações do cálcio com as micelas de caseína, a barreira energética tende a aumentar e uma maior percentagem de etanol deve ser introduzida no sistema para induzir a precipitação. A elevação da estabilidade em função do pH deve-se ao aumento mais rápido das cargas das caseínas em relação às suas ligações, o que resulta em espécies mais negativamente carregadas, portanto mais estáveis.

Horne & Muir (1990), consideram os testes do álcool e da estabilidade térmica pouco confiável para avaliar a capacidade de processamento de produtos evaporados e condensados, quando a instabilidade não for causada pelo baixo pH. A maioria dos países abandonou a prova do álcool, em função da melhoria nos níveis microbiológicos e das incorporações de tecnologias mais específicas de qualidade (Negri, 2002). No Brasil, esta análise continua sendo utilizada, servindo aos transportadores como referência para coleta ou recusa do leite nas propriedades.

#### 2.6.1 Influência da temperatura sobre a prova do álcool

Não foram encontrados dados literários referentes à influência da temperatura do leite sobre a prova do álcool, com exceção do trabalho de

Costa et al. (2004). Estes pesquisadores, testaram 55 amostras de leite *in natura* a 4 e 21 °C, com álcool entre 66 e 96 % v/v e obtiveram uma estabilidade maior para a temperatura mais elevada.

## 2.7 Leite Instável

Freqüentemente surgem leites positivos na prova do álcool, mas com acidez titulável normal, negativos no teste da fervura e com baixa contagem bacteriana total (CBT). Mesmo coletados de vacas saudáveis, estes leites coagulam na prova do álcool.

Ponce & Hernández (2001) identificaram quadro no qual o leite apresenta uma série de alterações em suas propriedades físico-químicas que o tornam positivo na prova do álcool. Estas alterações foram relacionadas a desbalanços nutricionais e distúrbios ruminais e fisiológicos que interferem nos processos de formação e secreção do leite. O fenômeno foi chamado de Síndrome do Leite Anormal (Sila). De acordo com estes autores, as limitações na quantidade e qualidade da alimentação, especialmente no final de períodos de estiagem, leva à produção de leites anormais (instáveis). Fenômeno que, segundo Ponce e Hernández (2001), se agrava com vacas leiteiras de alto potencial genético, em função das maiores exigências nutricionais.

Para estudar os efeitos da dieta sobre a produção, composição e propriedades físico-químicas do leite de vacas Holandesas, Ponce & Hernández (2005) provocaram, experimentalmente, quadro de Sila. O grupo controle (sem cana-de-açúcar) recebeu 100% de suas necessidades para manutenção e produção. No grupo 50%, para o qual a cana-de-açúcar

representou 50% do consumo de matéria seca (MS), foi provocado déficit de proteína degradável no intestino (PDI) de 20%. O terceiro grupo, para o qual a cana-de-açúcar representou 80% da MS da dieta, teve déficit de 25% na PDI. Os grupos 50% e 80% apresentaram diferenças em relação ao grupo controle na maioria dos parâmetros lácteos analisados, destacando-se a positividade na prova do álcool. Esta positividade ao álcool, segundo os pesquisadores, deveu-se à perda do poder tampão, em função da redução do conteúdo de caseínatos e fosfatos nos leites Sila. Foi concluído que existe uma forte ligação entre os desequilíbrios nutricionais e o surgimento de alterações metabólicas e da Sila. Neste caso, é provável que o excesso de carboidratos rapidamente fermentáveis, fornecidos pela cana-de-açúcar, tenha causado distúrbios ruminais, com queda do pH e redução da flora celulolítica que interferiram na composição e estabilidade do leite ao álcool.

Em estudo de Zanela (2004), a instabilidade ao álcool foi 29 pp maior entre os animais com 40% de restrição alimentar. Fischer et al. (2004a), investigando a ocorrência e as características do LINA na Região Sul do Estado do Rio Grande do Sul, constataram diferenças sazonais, tanto na incidência, quanto na composição do LINA. Foram analisadas 9.892 amostras em 18 meses. Houve ocorrência média de LINA de 58%, com número máximo de casos em abril (78%) e mínimo em setembro (31%). A variação sazonal na ocorrência de LINA foi atribuída por Fischer et al. (2004a) às oscilações na dieta das vacas, havendo concentração de casos nos meses de menor oferta de alimentos.

Com o objetivo de verificar o nível de ocorrência de LINA e avaliar



sua flutuação sazonal, Zanela (2004), com o apoio da Embrapa Clima Temperado, analisou 2.396 amostras de leite da região de Noroeste do Rio Grande do Sul. A incidência média de LINA entre setembro de 2002 e agosto de 2003 foi de 55%, com o valor máximo e mínimo ocorrendo em fevereiro e julho, respectivamente. A variação entre os meses foi atribuída pela pesquisadora às mudanças do regime alimentar dos animais.

Zanela et al. (2006), utilizando dois grupos de seis vacas Jersey confinadas, avaliaram o efeito da restrição da dieta sobre a ocorrência de LINA. Os animais com déficit nutricional apresentaram incidência de LINA 56 pp maior que o grupo controle.

Além de reduzir drasticamente a capacidade produtiva dos animais, o déficit nutricional afeta diretamente a composição, aumentando marcadamente a instabilidade do leite na prova do álcool (Marques, 2004; Zanela, 2004; Zanela et al., 2006; Fischer et al., 2004a e 2004b; Fischer, 2005).

Em períodos de estresse térmico também pode haver redução da estabilidade do leite ao álcool. Em temperaturas fora da zona termo-neutra (5 a 25 °C; Jones & Stallings, 1999, ou 5 a 20°; NRC, 2001), o consumo de matéria seca (CMS) e a atividade metabólica são alterados. Segundo o NRC (2001), os bovinos adaptam-se ao estresse crônico por frio aumentando a insolação térmica, a intensidade do metabolismo basal e o consumo de matéria seca. A atividade ruminal, a motilidade do retículo-rúmen e a taxa de passagem também aumentam. Em frios extremos, todavia, o consumo de matéria seca não cresce no mesmo ritmo que o metabolismo levando o animal a balanço energético negativo e ao uso da energia, prioritariamente, para a geração de

calor. Ainda conforme o NRC (2001), temperaturas acima da zona termo-neutra, diminuem a produção e alteram a composição do leite em consequência da redução no consumo de matéria seca. Reduções de até 55% no consumo da zona termo-neutra, aliado a aumentos de 7 a 25% na manutenção têm sido relatados para vacas em estresse térmico. Além da temperatura, a umidade relativa do ar interfere no conforto do animal. Quando o índice temperatura/umidade excede a 72, vacas de alta produção são fortemente afetadas (Armstrong, 1994). É justamente nas estações de carência alimentar (abr/maio) e de forte calor (jan/fev) que a ocorrência de leite instável aumenta no Rio Grande do Sul (Gonzalez, 2002; Marques, 2004; Zanela, 2004).

## 2.8 Estabilidade térmica do leite

A preservação comercial do leite por esterilização teve início em 1856, quando Gail Boarden patenteou, na Inglaterra e Estados Unidos, o sistema de evaporação a vácuo, sem a adição de conservantes (Singh, 2004).

Define-se estabilidade térmica do leite (ETL), como a capacidade em resistir a altas temperaturas, sem coagulação ou geleificação visíveis (Singh, 2004). A resistência térmica do leite é uma característica de qualidade intrínseca (Silva & Almeida, 2006).

As micelas de caseína (CN) são notavelmente estáveis ao tratamento térmico. Entretanto, processos industriais severos (120 °C, 20 min) causam irreversíveis mudanças na estrutura micelar e na partição dos sais (Gaucheron, 2005). Para que o processo de coagulação térmica tenha início, são necessárias mudanças nas interações coloidais que permitam às micelas

aproximar-se e permanecer juntas por tempo suficiente para que reações químicas ocorram (Singh, 2004).

O tratamento térmico causa desnaturação das soroproteínas (SP). A 90 °C, 100% da beta-lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) e 82% da alfa-lactoalbumina ( $\alpha$ -La) estão desnaturadas. O grau de associação às micelas, a esta temperatura, é de 87 e 76%, respectivamente (Singh & Fox, 1996). Silva & Almeida (2006) relacionaram a maior complexação da  $\beta$ -Lg com  $\kappa$ -CN e, conseqüentemente menor estabilidade térmica do leite, ao aumento na concentração de proteína nos estágios inicial e final da lactação.

Com exceção das vacas em avançada fase de produção, não há correlação entre estágio de lactação e estabilidade térmica do leite (Rose, 1962). Holt (2004), constatou que o leite do final tem probabilidade três vezes maior de ser instável termicamente que o leite do início ou meio da lactação. Conforme este pesquisador, isto se deve ao aumento do pH nos estágios finais da lactação, em função do maior teor de sais do leite.

De acordo com Negri (2002), até o presente não foi possível correlacionar a estabilidade térmica do leite com o estágio de lactação.

## 2.9 Fatores que afetam a estabilidade térmica do leite

### 2.9.1 Acidez e pH

A acidez do leite pode ser natural ou desenvolvida. A acidez natural origina-se das caseínas (5 a 6 °D), dos fosfatos (5 °D), do CO<sub>2</sub> (1 °D), da albumina (1 °D) e dos citratos (1 °D) (Veloso, 1998). Assim, logo após a ordenha, o leite normal possui uma acidez entre 13 e 14 °D. Segundo este

pesquisador, a acidez total compreende a acidez natural mais a originada causada pela fermentação da lactose pelos microorganismos. Além disso, durante o tratamento térmico, a acidez desenvolvida aumenta, em função de três causas principais: a) Oxidação térmica da lactose a ácidos orgânicos (50%); b) hidrólise de fosfatos orgânicos das caseínas e fosfoserinas (30%) e c) precipitação do  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , com liberação de  $\text{H}^+$  (20%) (Singh, 2004; Salaüan et al., 2005; Silva & Almeida, 2006).

O pH é importante parâmetro para identificar o colostro (ácido) e o leite mamítico (alcalino) (Horne e Muir, 1990; Veloso, 1998). Além de afetar decisivamente a estabilidade térmica, o pH do leite durante o aquecimento tem forte influência sobre o grau de associação das soroproteínas (SP) com as micelas de caseína (O'Connell & Fox, 2001). Quando o pH está abaixo de 6,8, a maioria das SP complexadas estão associadas à superfície das micelas. No momento em que o pH ultrapassa 6,8, além dos agregados de SP migrarem para o soro, ocorre também a dissociação da kappa-caseína ( $\kappa$ -CN) micelar (Singh, 2004).

Valores de pH acima de 7,0 tornam os fosfatos menos solúveis. Ao precipitar, os fosfatos carregam consigo átomos de cálcio, reduzindo o teor de cálcio iônico do meio e aumentando a estabilidade térmica do leite (Darling, 1980; Horne & Muir, 1990).

A estabilidade térmica do leite (ETL), frente a mudanças no pH, comporta-se de duas maneiras (O'Connell & Fox, 2001; Singh, 2004). Leite tipo A, cujo tempo de coagulação térmica tem ponto de máximo em pH próximo a 6,7, e ponto de mínimo a pH 6,9, a partir do qual volta a aumentar. Leite tipo B,

onde o tempo de coagulação térmica é diretamente proporcional ao pH, sem ponto de máximo ou de mínimo. A maioria do leite é do tipo A. Segundo Darling (1980), a presença do ponto de mínimo na curva do pH *versus* tempo de coagulação térmica resulta da combinação de interações protéicas e da precipitação de fosfato de cálcio, as quais dependem do equilíbrio iônico, da composição e conformação das proteínas e das condições do meio.

Quanto maior o pH, tanto maior a temperatura necessária para a precipitação das caseínas (Negri, 2002). As micelas são estáveis no pH natural do leite, em virtude da presença de estruturas de  $\kappa$ -CN em sua superfície (Vasbinder et al., 2003). Segundo Singh (2004), a alta concentração de íons hidrogênio no ambiente provavelmente reduza as repulsões eletrostáticas, o que gradualmente desestabiliza as micelas de caseína.

Titulação com hidróxido de sódio 1/9 N tem sido o método mais utilizado para medir a acidez do leite (Marques, 2004). A Instrução Normativa N° 51, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2002) estabeleceu valores entre 14 e 18 °D para a acidez titulável do leite.

#### 2.9.1.1 Efeito da temperatura sobre o pH do leite

Elevada temperatura causa uma considerável queda no pH, basicamente, em virtude de três fatores: dissociação da água; precipitação do fosfato de cálcio e formação de ácidos (Silva & Almeida, 2006). O pH de coagulação, a 20 °C, após aquecimento a 140 °C, situa-se entre 5,5 e 6,0 (Singh, 2004).

O dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), presente no leite recém ordenhado,

reduz o pH do leite mediante a reação com a água e formação de ácido carbônico (Veloso, 1998). Este é extremamente instável, dissociando-se em  $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{H}^+$ . Assim, ocorre queda no pH do meio de acordo com a seguinte reação:  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CO}_3^{2-} + 2 \text{H}^+$ . Como a concentração de  $\text{CO}_2$  é inversamente proporcional à temperatura, o aquecimento reduz a presença de  $\text{CO}_2$  do meio, deslocando o equilíbrio da equação para a esquerda, aumentando o pH.

O pré-aquecimento a 120 °C, durante 10 minutos, reduz o pH no qual ocorre a máxima estabilidade térmica em cerca de 0,16 e o pH do leite em aproximadamente 0,09 unidades (Rose, 1962).

### 2.9.2 Cálcio iônico

A concentração total de cálcio no leite bovino é cerca de 30-32 mmol/l (Bloomfield & Mead, 1975; Lin et al., 2003; Philippe et al., 2003). Aproximadamente 70% estão na fase coloidal, na forma de fosfato de cálcio e 30 % estão ligados ou ionizados (2 mmol/l) na solução (Lin et al., 2003).

Em meio coloidal, o cálcio pode formar complexos com fosfoésteres, grupos carboxila das caseínas, ou com os fosfatos e citratos micelares. Lin et al. (2006) relacionaram o cálcio iônico e o fosfato de cálcio com o auxílio da seguinte equação:  $3\text{Ca}^{+2} + 2\text{HPO}_4^{-2} \rightleftharpoons \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\downarrow + 2\text{H}^+$ . Segundo estes autores, qualquer mudança que leve a redução do  $\text{Ca}^{++}$  gera uma migração de cálcio das micelas para a fase aquosa, a fim de restabelecer o equilíbrio.

Horne & Muir (1990) verificaram que a atividade do cálcio iônico exerce pequena interferência sobre a beta-lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) original. No

entanto, a  $\beta$ -Lg desnaturada pelo calor é muito sensível aos íons cálcio, especialmente quando estes estão presentes durante o aquecimento.

O cálcio iônico participa de todos os equilíbrios minerais do leite, porém com velocidades de formação que dependem das afinidades eletroquímicas e das condições de reação (Negri, 2002). Muitos são os fatores que afetam sua distribuição no leite: pH, temperatura, adição ou remoção de cálcio, tempo de estocagem (Lin et al., 2003 e 2006) e a solubilidade do fosfato de cálcio (Lin et al., 2006) têm sido relatados. A modificação de qualquer destes fatores gera intercâmbio de cálcio e outros minerais entre as micelas e a fase aquosa, a fim de restabelecer o equilíbrio original. As migrações estão comprovadas, todavia a reversibilidade e a velocidade com que ocorrem não estão tão claras (Lin et al., 2006).

Em pH 4,6, todo o cálcio do leite está na forma solúvel (Le Graët & Gaucheron, 1999). Lin et al. (2006) relacionaram o cálcio iônico ( $\text{Ca}^{++}$ ) ao pH e ao cálcio adicionado (CA) ao leite mediante as seguintes equações lineares:  $\text{Ca}^{++}$  (mM) = -2,7135 pH + 20,127 e  $\text{Ca}^{++}$  = 0,3086 CA + 1,689.

Chavez et al. (2004), analisando os fatores que interferem na estabilidade do leite, constataram que o único parâmetro que reduz, tanto a estabilidade ao álcool, quanto ao tratamento térmico é o teor de cálcio iônico. A adição de  $\text{Ca}^{++}$  ao leite aumenta as incrustações dos equipamentos de processamento térmico e a participação das caseínas nos depósitos, indicando menor estabilidade das micelas de caseína (Bansal & Chen, 2006).

A hidrofobicidade das proteínas aumenta após a adição de cálcio, indicando mudanças estruturais nas micelas de caseína. A redução da

afinidade pela água diminui em função da maior exposição de segmentos hidrofóbicos, causado pela desorganização das proteínas (Philippe et al., 2003). Da mesma maneira, segundo estes pesquisadores, a liberação de água pode indicar sua expulsão das cavidades localizadas no interior das micelas. A expulsão da água é causada pelas mudanças conformacionais nas cadeias de aminoácidos das caseínas, em virtude da maior exposição ao solvente.

### 2.9.3 Outros minerais

Além do cálcio, outros minerais podem estar envolvidos na determinação da estabilidade térmica do leite.

O magnésio pode ter efeito desestabilizante, contudo não existem evidências suficientes para comprovar (Negri, 2002). Experimentos com o magnésio iônico ( $Mg^{++}$ ) mostraram que seus efeitos sobre a estabilidade do leite ao álcool são semelhantes àqueles dos íons cálcio (Horne & Parker, 1981a; Chavez et al., 2004).

A força iônica diminui a constante dielétrica do meio, enfraquecendo a barreira energética que previne a coagulação (Chavez et al., 2004). Segundo estes autores, a afinidade dos minerais pela fração protéica determina sua distribuição em cada fase do leite.

Chavez et al. (2004) dividiram os minerais em dois grupos: no primeiro, foram incluídos os modificadores do ambiente ao redor das micelas, gerando força iônica ( $Cl^-$ ,  $Na^+$  e  $K^+$ ). No segundo grupo, foram reunidos aqueles integrados às micelas ( $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$  e P). Estes são responsáveis pela estrutura micelar. Os autores propuseram que os minerais participantes da estrutura



micelar são os mais importantes para a estabilidade térmica do leite.

Segundo Singh (2004), o aquecimento não tem nenhuma consequência sobre os íons monovalentes. Os cátions divalentes têm importante efeito sobre a estabilidade das proteínas e na intensidade das incrustações mineralizadas que ocorrem nos equipamentos durante o processamento industrial do leite (Holt, 2004).

Acima de que qualquer íon isoladamente, as inter-relações entre eles, provavelmente, interfiram muito mais na estabilidade térmica do leite.

#### 2.9.4 Fosfatos

O fosfato de cálcio coloidal é fundamental para manter a estrutura e integridade das micelas de caseína. Sua remoção causa desintegração e colapso da estrutura micelar (Visser et al., 1979; Gaucheron, 2005). Segundo Rose (1962), a extensiva dissolução do fosfato de cálcio coloidal, por acidificação do leite, pode levar ao rompimento da estrutura micelar das caseínas. O leite desnatado contém cerca de 30 mmol/l de ânions fosfato: 19 na fase coloidal e 11 em solução (Bloomfield & Mead, 1975).

O aquecimento provoca o deslocamento do cálcio iônico para a fase coloidal, causando a precipitação do fosfato de cálcio ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), em função de sua baixa solubilidade a altas temperaturas (Silva & Almeida, 2006). Em pH 5,2, todo fósforo inorgânico está solubilizado (Le Graët & Gaucheron, 1999). O efeito da adição de fosfato, antes do pré-aquecimento, causa uma redução progressiva do cálcio solúvel, sendo a possível razão do efeito estabilizante gerado por esta substância (Horne & Muir, 1990).

Visser et al. (1979) relatam que a interação entre o íon fosfato e as caseínas  $\alpha_s$  e  $\kappa$  ocorrem somente quando íons cálcio estão presentes. Embora as verdadeiras implicações da defosforilação térmica não sejam completamente conhecidas, parece não haver correlação direta entre taxa de defosforilação e taxa de coagulação térmica (Singh, 2004)

### 2.9.5 Citratos

O ácido cítrico possui três valores de pKa:  $pK_1 = 3,15$ ,  $pK_2 = 4,77$  e  $pK_3 = 5,19$  (Williams, 2006). Os valores relativamente baixos destas constantes fazem com que o ácido cítrico encontre-se, preferencialmente, dissociados no leite. Assim, os citratos possuem alta capacidade de quelatar cálcio e, por consequência, de aumentar estabilidade térmica do leite. Em virtude das características quelantes, os citratos são muito utilizados pela indústria para aumentar a estabilidade térmica do leite, especialmente em processamentos térmicos severos, como no caso do leite UHT (*ultra high temperature*). Singh (2004) relata que a adição de citrato para aumentar a estabilidade térmica do leite é mais eficaz que fosfato, visto que aquele permanece em maior proporção na fase solúvel.

A concentração de citratos no leite é relativamente baixa e depende da dieta disponibilizada aos animais. Segundo Bloomfield & Mead (1975), o leite desnatado contém cerca de 8,4 mmol/l de citrato, dos quais apenas 0,4 mmol/l estão na fase coloidal. As principais fontes de citrato são as forrageiras. Dietas pobres em volumosos provavelmente contenham pouco ácido cítrico, o que pode levar ao desequilíbrio salino e reduzir a estabilidade térmica do leite

(Silva & Almeida, 2006). Os efeitos do tratamento térmico sobre a forma e distribuição do citratos entre as fases coloidal e aquosa do leite ainda não estão completamente esclarecidos (Singh, 2004).

#### 2.9.6 Soroproteínas

Segundo Rose (1961b), os principais fatores que controlam a estabilidade térmica do leite não estão nas micelas, mas encontram-se na fase aquosa. As propriedades funcionais das soroproteínas (SP) são alteradas pela desnaturação, fazendo com que elas atuem de forma diferente após ter passado por tratamento térmico (Silva & Almeida, 2006). O grau destas alterações depende da intensidade do calor aplicado. Uma vez desnaturadas, reagem entre si e com as micelas de caseína (Anema & Li, 2003; Singh, 2004). Segundo Fox (1981a), ao contrário das caseínas, as soroproteínas são bastante termolábeis, sendo completamente desnaturadas em 60 min, a 77,5 °C; 30 min, a 80 °C e 5 min a 90 °C.

A beta-lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) é a soroproteína (SP) que mais interfere na estabilidade térmica do leite (ETL). Suas características sofrem influência dos constituintes do meio, como: íons, pH e lactose (Silva & Almeida, 2006). Conforme estes autores, a alfa-lactoalbumina ( $\alpha$ -La) tem importância menor para a estabilidade térmica do leite, uma vez que, ao invés de grupos sulfidrilo (SH), possui 4 grupos dissulfeto (SS) por molécula. Isso a torna menos termolábil, pois, antes que possa reagir com a kappa-caseína ( $\kappa$ -CN), é necessário a quebra da ligação bissulfeto pelo oxigênio.

O'Connell & Fox (2001) propuseram que a capacidade da beta-

lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) de exercer efeito específico sobre a curva do pH *versus* tempo de coagulação térmica (pH vs TCT) é consequência de sua hidrofobicidade e capacidade de quelatar cálcio. Estes pesquisadores estudaram o efeito da adição de beta-lactoglobulina sobre a estabilidade térmica do leite. O resultado foi aumento da estabilidade, em pH 6,7 e redução a 6,9, formando curva do tipo A. Ainda de acordo com O'Connell & Fox (2001), a  $\beta$ -Lg parece ter efeito direto sobre a desestabilização das micelas de caseína que vai além de seu efeito sobre a dissociação da kappa-caseína ( $\kappa$ -CN). Os autores sugerem que o efeito específico da  $\beta$ -Lg relaciona-se com as diferenças em seu mecanismo de desnaturação térmica, como uma função do pH. Na faixa de pH abaixo de 6,8, a  $\beta$ -Lg encontra-se predominantemente dimerizada, com o grupo tiol inacessível, tanto para os demais constituintes do soro, quanto para as micelas de caseína. Quando aquecida, ela precipita rapidamente por meio do mecanismo mediado pelo cálcio. Em pH entre 6,3 e 6,7 o efeito estabilizante da  $\beta$ -Lg é em virtude de sua habilidade de quelatar cálcio. O efeito quelante seria máximo em pH 6,7, ponto onde ocorre a máxima estabilidade térmica das micelas. No pH de mínima estabilidade (6,9), o efeito se dá pela sensibilização das micelas de caseína à precipitação térmica do fosfato de cálcio, por causa do acréscimo da hidrofobicidade micelar.

O'Connell & Fox (2001) presumiram que a formação de pontes dissulfeto entre a beta-lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) e a kappa-caseína ( $\kappa$ -CN), bem como o aumento da hidrofobicidade superficial da  $\beta$ -Lg, são consequências da redução térmica dos resíduos de cistina da  $\beta$ -Lg e da  $\kappa$ -CN. A redução pelo aquecimento dos resíduos de cistina, altera a configuração espacial das

moléculas, expondo regiões moleculares hidrofóbicas. A formação de ligações dissulfeto, aliado ao aumento da hidrofobicidade superficial dos colóides, provoca a coagulação das micelas de caseína. Segundo O'Connell & Fox (2001), estas reações, possivelmente, expliquem o ponto de mínimo na curva pH vs tempo de coagulação térmica. As reduções dos resíduos de cistina ocorrem mais rapidamente em pH igual ou superior a 6,9 e temperatura a partir de 130 °C. É provável que a partir de pH 7,0 a redução térmica da  $\beta$ -Lg seja tão rápida que a reação com outros constituintes da fase aquosa, especialmente  $\kappa$ -CN dissociada e outras  $\beta$ -Lg, ocorra imediatamente, antecipando-se à complexação com as micelas de caseína.

#### 2.9.7 Transglutaminase

A transglutaminase modifica as proteínas, formando ligações cruzadas e incorporando grupos amina. Esta enzima catalisa a transferência de grupos acil de peptídeos para uma variedade de compostos amínicos. Também, catalisa a desaminação de resíduos de glutamina, usando moléculas de água como receptoras dos grupos acil (O'Sullivan et al., 2001).

A formação de ligações cruzadas entre as proteínas, pela transglutaminase, modifica a habilidade de hidratação, geleificação, além das propriedades emulsificantes e reológicas do leite. Estas mudanças nas características físico-químicas afetam a capacidade do leite em resistir às altas temperaturas a que é submetido durante o processamento térmico (O'Sullivan et al, 2001). De acordo com estes pesquisadores, a intensidade das ligações com a transglutaminase depende da estrutura de cada proteína-substrato. A

conformação aberta da caseína a torna bom substrato, mas as soroproteínas globulares, em seu estado natural, não são susceptíveis a ligações cruzadas com transglutaminase. Elas necessitam de alterações conformacionais, antes de formar tais ligações.

Vasbinder et al. (2003) relatam que as ligações cruzadas entre as transglutaminases e as caseínas reduzem a liberação destas proteínas para a fase aquosa a quantidades mínimas. De acordo com estes pesquisadores, isso indica que as micelas formam ligações cruzadas intramicelares, prevenindo a liberação da caseína para a fase aquosa, quando há redução no valor do pH ou da temperatura.

Segundo O'Sullivan et al. (2001), a adição de transglutaminase ao leite reconstituído, aumenta a estabilidade térmica na faixa de pH de mínima estabilidade, convertendo-o do tipo A ao tipo B.

#### 2.9.8 Uréia

A concentração de uréia no leite depende tanto do catabolismo ruminal das proteínas dietéticas, quanto das proteínas dos tecidos corporais, além da quantidade de energia e água consumida pelo animal (La Manna et al., 2002). Também afetam o teor de uréia do leite: sistema de pastejo, peso, idade, estágio de lactação e produção de leite (Gustafsson & Palmquist, 1993).

O nitrogênio ureico do leite (MUN) de animais confinados, com dietas balanceadas, situa-se entre 10 e 16 mg/dl (Young, 2001; La Manna et al., 2002). A dieta das vacas define o teor de uréia no leite (Horne & Muir, 1990). Segundo Singh (2004), este é único constituinte natural do leite cuja

correlação com a estabilidade térmica já foi comprovada.

A uréia pode atuar inibindo a formação de ácidos, ou ser convertida a  $\text{NH}_4\text{CN}$ , o qual bloqueia os grupos  $\epsilon$ -amino e atua sobre os grupos tiol das proteínas (Silva & Almeida, 2006). Segundo Fox & Morrissey (1977), o tempo de coagulação térmica (TCT) do leite, a  $140\text{ }^\circ\text{C}$ , pode ser estimado a partir do seu teor de uréia (U), com a seguinte equação:  $\text{TCT} = 0,45 \text{ U (mg/dl)} + 3,04$ .

#### 2.9.9 Lactose

O aumento na concentração de lactose para níveis 50% acima do valor normal causa uma desestabilização do leite tipo A na faixa de pH entre 6,4 e 6,7 e desloca o ponto de mínima estabilidade para valores de pH mais alcalinos (Singh, 2004).

Segundo Negri (2002), a adição de lactose torna o leite mais instável termicamente. Quando o leite encontra-se fora da faixa de pH de mínima estabilidade (6,7 - 6,9), este efeito pode ser em consequência do aumento na velocidade de redução do pH pela transformação da lactose em ácido láctico. Entre o pH 6,7 e 6,9, a redução da estabilidade pode ser devida ao aumento na concentração de cálcio iônico do meio (Negri, 2002).

#### 2.9.10 Extrato seco total

Inúmeros experimentos já demonstraram que a concentração do leite reduz o tempo de coagulação térmica. A estabilidade térmica do leite concentrado é inversamente proporcional ao seu teor de sólidos (Webb & Holm, 1932). Segundo Singh (2004), o aquecimento do leite, em valores

normais de pH (6,5 - 6,6), com elevado teor de sólidos causa considerável dissociação da  $\kappa$ -CN, o que pode reduzir o tempo de coagulação térmica.

#### 2.10 Potencial zeta

De acordo com a empresa Zeta-meter (2007), as interações de partículas em líquidos polares não são dirigidas exclusivamente pelo potencial elétrico na superfície da partícula, mas pelo efetivo potencial da partícula e dos íons associados. Ainda segundo esta empresa, as cargas da superfície das células podem ser avaliadas com base nas medidas do potencial zeta, que é o potencial elétrico teórico entre o ambiente aquoso e uma região difusa de carga predominante oposta à superfície da célula.

A associação de íons com as micelas de caseína pode blindar as cargas negativas, levando à redução do potencial zeta. Entretanto, os macropéptídeos das kappa-caseínas não são sítios exclusivos de ligação do cálcio (Philippe et al., 2003). Para estes pesquisadores, a redução do potencial zeta pode ser causado por mudanças conformacionais na camada superficial das micelas, em consequência da ligação de cálcio a outras partes micelares, superficiais ou internas.

Segundo O'Connell & Fox (2001), a capacidade de quelatar cálcio da  $\beta$ -Lg justifica o aumento no potencial zeta e na hidratação das micelas, quando leite é aquecido em pH 6,7. Estes pesquisadores constataram que a  $\beta$ -Lg interfere na curva pH vs potencial zeta de maneira semelhante à interferência sobre curva pH vs tempo de coagulação térmica. Por isso, o potencial zeta pode trazer informações úteis sobre o leite. Normalmente, o



potencial zeta das micelas de caseína, a 20° C, é de - 13 mV (Singh, 2004).

Anema & Klostermeyer (1997) aqueceram o leite a 140 °C, com pH de 6,5. Inicialmente, o potencial zeta aumentou, passando a diminuir com o tempo de aquecimento. Quando o pH foi ajustado para 7,1, o potencial zeta diminuiu rapidamente, estabilizando em seguida. A explicação dos autores foi que as mudanças iniciais no potencial zeta são consequência da associação das soroproteínas com as micelas de caseína e à precipitação do fosfato de cálcio sobre as micelas. Mudanças posteriores são causadas pela dissociação da kappa-caseína e a defosforilação das caseínas.

### 2.11 Mecanismos da coagulação térmica do leite

Um mecanismo unificado tem sido proposto para explicar o perfil da curva pH *versus* tempo de coagulação térmica do leite (pH vs TCT). Este modelo ajusta-se bem à maioria das observações experimentais.

De acordo com Singh (2004), a curva pH vs TCT do leite tem as seguintes características:

Região I (pH < 6,8). As soroproteínas estão associadas às micelas de caseína (CN) e são estáveis. Dentro desta faixa, a estabilidade das micelas cobertas pelas soroproteínas (SP) é diretamente proporcional ao pH.

Região II (pH > 6,9). Os complexos  $\kappa$ -CN-SP estão em sua grande maioria dispersos na fase aquosa. Dentro desta faixa, a estabilidade das micelas de caseína desprovidas de kappa-caseína ( $\kappa$ -CN) é diretamente proporcional ao pH e a coagulação das micelas é essencialmente causada pela ação do cálcio iônico.

Ponto de máxima estabilidade (pH ~ 6,7). O complexo  $\kappa$ -CN- $\beta$ -Lg, formado na superfície das partículas coloidais, altera as interações físicas e eletrostáticas das micelas, prevenindo a dissociação da  $\kappa$ -CN micelar. Esta é, essencialmente, a razão para a ocorrência do ponto de máxima estabilidade quando o pH do leite está em torno de 6,7.

Ponto de mínima estabilidade (pH ~ 6,9). A  $\kappa$ -CN micelar dissocia-se para a fase aquosa. As micelas de caseína desprovidas de  $\kappa$ -CN são sensíveis ao teor de cálcio iônico. O ponto de mínima estabilidade térmica ocorre, portanto, em virtude da coagulação das micelas de caseína desprovidas de  $\kappa$ -CN. A coagulação é essencialmente salina, induzida pelos íons cálcio.

Baixos valores de pH. Em pH muito baixo, o leite coagula rapidamente, em consequência da redução da repulsão eletrostática entre as micelas, causada pela alta atividade do  $H^+$  e do  $Ca^{++}$ . Além disso, a alta quantidade de soroproteínas associadas à superfície das micelas promove agregação das partículas coloidais, mediante ligações cruzadas entre as unidades micelares.

Altos valores de pH. Embora a dissociação da  $\kappa$ -CN amplie, a estabilidade térmica aumenta por causa do acréscimo da carga das micelas e à baixa atividade dos íons cálcio.

É provável que o aquecimento adicional do leite cause redução do pH, perda de grupos fosfato, formação de ligações covalentes e outras reações. Estas mudanças permitem às micelas contatar-se mais facilmente e, provavelmente, formar ligações cruzadas intra e intermicelas, originando complexo protéico irreversível (Singh, 2004).

Aspectos nutricionais podem modificar sensivelmente a estabilidade térmica do leite. Mendoza et al. (2006), adicionaram 1,4 kg de semente integral de girassol à dieta de vacas leiteiras. A coagulação do leite, após 20 min de aquecimento a 140 °C, aumento 23 pp (32 vs 55%). Dietas pobres em volumosos podem conter pouco ácido cítrico, gerando desequilíbrio salino, com conseqüente redução da estabilidade térmica do leite (Silva & Almeida, 2006).

Múltiplos são os fatores que interferem na estabilidade térmica do leite. Os principais são o pH, cálcio iônico, proteínas, fosfatos, citratos e minerais, bem como as interações entre eles. O papel e a intensidade de cada força ainda não estão completamente esclarecidos.

## 2.12 Mudanças na composição do leite instável

Conhecer a composição do leite é ponto chave na investigação dos fatores que interferem na estabilidade ao álcool (Barros, 2002a). Davies & White (1958) já haviam constatado uma correlação significativa entre a concentração de cálcio iônico e a estabilidade do leite ao álcool. Barros et al. (2000), Barros et al. (1998), Barbosa et al. (2006) e Marques et al. (2006) constataram maior concentração de cálcio iônico no leite instável que no estável ao álcool, detectando (118 vs 103,  $P < 0,004$ ), (110 vs 83,  $P < 0,001$ ), (85 vs 76,  $P < 0,001$ ) e (80 vs 70,  $P < 0,004$ ) mg/l, respectivamente.

Zanela (2004), utilizando oito vacas Jersey confinadas, induziu a produção de LINA pela restrição alimentar. Quatro animais receberam 100% das necessidades de nutrientes, enquanto os demais receberam 60% (T60). O grupo T60 produziu leite mais instável ao álcool, com menor concentração de

proteína (3,89 vs 4,04%,  $P < 0,05$ ), mas sem diferença para caseína e sólidos desengordurados.

Barros et al. (2000) obtiveram maior concentração de gordura (4,21 vs 3,50%,  $P < 0,0001$ ) e proteína (3,54 vs 3,23%,  $P < 0,0002$ ), porém menor concentração de lactose (4,67 vs 4,88%,  $P < 0,0001$ ) e sólidos totais (12,23 vs 13,02%,  $P < 0,0006$ ) em leites positivos ao álcool.

Em estudo comparativo entre leite normal e leite instável, Fischer et al. (2004a) constataram diferença significativa para gordura, proteína e lactose. Fischer et al. (2004b) relatam que, à exceção da gordura, que não apresentou variação, todos os demais componentes tiveram concentração menor no leite instável ao álcool. Os pesquisadores concluíram que o leite instável não ácido (LINA) possui composição diferente do leite normal, mas sugerem mais estudos para confirmar estes resultados.

Conhecer quais constituintes e de que maneira eles tornam o leite instável ao álcool ou ao tratamento térmico é fundamental para evitar o descarte equivocado de leites legalmente aceitos, desagradando os produtores, ou o aceite de leites desqualificados, prejudicando as indústrias e os consumidores.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local e período experimental

O experimento foi conduzido em uma propriedade agrícola familiar, integrada à Cooperativa dos Pequenos Agropecuaristas de Campinas do Sul, no Município de Campinas do Sul, entre 30 de dezembro de 2005 e 24 de fevereiro de 2006, em dois períodos de 28 dias.

#### 3.2 Animais

Doze vacas Holandesas, seis primíparas e seis multíparas, foram utilizadas em dois tratamentos. Os animais encontravam-se entre a primeira e a quarta lactação e no estágio de 6 a 71 semanas de produção. Para a análise estatística, os dados relativos às vacas 41 e 53 foram desconsiderados em função das características do leite produzido, em virtude do avançado estágio de lactação (> 40 semanas). Os 10 animais incluídos na análise encontrava-se entre a 6 e a 38 semanas de lactação (Apêndice 1). As vacas, pura por cruza, foram criadas na propriedade, estando, portanto, adaptadas ao manejo e ao pastejo do capim-bermuda no sistema de piquetes rotativos, com cerca elétrica.

Os animais do grupo CS (no primeiro período receberam 100 % e no segundo 60% do NRC) estavam com peso corporal médio, no início do experimento, de  $518,63 \pm 21,32$  kg e escore de condição corporal de

3,02 ± 0,29, produzindo 16,48 ± 1,59 kg/dia de leite corrigido a 4% de gordura. O segundo grupo apresentou, em média, no início do experimento, 469,56 ± 27,10 kg; 2,54 ± 0,36 e 16,85 ± 2,03 para peso corporal, escore de condição corporal e produção de leite corrigida, respectivamente. No período pré-experimental, todos os animais, recebiam oferta de pasto entre 6 e 8 kg MS / 100 kg PV / dia. Vacas produzindo entre 10 e 18 kg/dia estavam recebendo diariamente 4 kg de concentrado energético e aquelas com produção acima de 18 kg/dia recebiam, adicionalmente, 1 kg de concentrado protéico. Animais com produção abaixo de 10 litros diários não estavam recebendo alimentos concentrados.

### 3.3 Tratamentos

Os animais, aleatoriamente escolhidos (sorteio), foram designados aos tratamentos T100 (oferta de dieta para atender 100% das necessidades nutricionais) ou T60 (oferta de dieta para atender 60% das necessidades nutricionais). Os cálculos pré-experimentais foram efetuados visando tratamentos que atendessem 100 e 50% das necessidades nutricionais, entretanto a produção da forrageira durante o período experimental foi suficiente para atender 100 e 60% das necessidades dos animais. As necessidades foram estimadas, a partir das seguintes considerações:

a) Os dados pré-experimentais refletiam o potencial das vacas, sendo utilizados para os cálculos; b) Para as características nutricionais da forrageira foram utilizados os resultados analíticos médios de cada período e tratamento, respectivamente; c) Para considerar a seleção dos animais, o valor nutricional

da forrageira foi estimado a partir da média entre folhas e hastes, para o T100 e entre folhas, hastes e matéria morta, para o T60; d) Os teores de FDN dos concentrados foram considerados no cálculo do consumo máximo de forragem; e) Para os animais com menor oferta de dieta, não foi considerado o concentrado protéico fornecido, visto que, no final dos períodos experimentais, nenhuma vaca com dieta restrita estava produzindo acima de 18 kg/dia de leite; f) O modelo de Mertens (1987) foi utilizada para estimar o consumo máximo de matéria seca (consumo máximo de FDN (kg/dia) = 1,2% PV) (Apêndice 2); g) A estimativa das necessidades nutricionais foram realizadas com *Software* do NRC (2001) para gado de leite (Apêndice 3).

O período experimental total estendeu-se por 56 dias. No primeiro período, do 1º ao 28º dia, as vacas 15, 70, 72, 90, 121 e 124 foram designadas ao tratamento T100 e as demais ao tratamento T60. No segundo período experimental, do 29º ao 56º dia, as dietas foram invertidas.

### 3.4 Composição da dieta

O T100 constituiu-se de oferta diária de 8 kg MS/100 kg PV de pastagem; 2,5 kg/vaca de feno de Tifton e 5 kg/vaca de concentrado energético, contendo 67,6% milho grão moído, 29,0 % cevada grão moído, 2,0% sal mineral e 1,4% calcário calcítico. Os animais designados ao T60 receberam 50% destas quantidades. Vacas com produção a partir de 18 kg/dia de leite receberam 2,0 e 1,0 kg/dia de concentrado protéico, contendo 75% de grão de soja moído e 25% de farelo de soja, respectivamente, para T100 e T60. Cloreto de sódio (NaCl) foi disponibilizado, com livre acesso aos animais.

### 3.4.1 Forrageira

A forrageira, implantada na área dos piquetes há sete anos, constitui-se de capim-bermuda variedade Tifton (*Cynodon dactylon*). No período experimental, a pastagem não recebeu irrigação nem adubação. A precipitação pluviométrica total durante o experimento foi de 292 mm (Apêndice 4). Os piquetes, delimitados por cerca elétrica e com acesso à água e sombra, localizam-se em terreno suave ondulado e solo tipo latossolo profundo, unidade de mapeamento Erechim. O piquete mais distante encontra-se a, aproximadamente, 150 m da sala de ordenha. Os animais entravam na pastagem com altura entre 30 e 40 cm, onde permaneciam 24 horas, saindo apenas para as ordenhas.

As amostras da forrageira, para os dois níveis de oferta de pasto, foram separadas em folha (f), haste (h) e matéria morta (mm). Após secagem ao sol, moídas, acondicionadas em vidros e devidamente etiquetadas foram encaminhadas para o Centro de Pesquisa em Alimentação (CEPA) da Universidade de Passo Fundo, onde foram analisadas para matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), nutrientes digestíveis totais (NDT), energia líquida para lactação (EII), energia líquida para manutenção (Elm) e os minerais cálcio, fósforo, potássio e magnésio (Apêndice 5). A flora da área de pastejo restringiu-se, essencialmente à forrageira implantada, contendo poucas espécies de plantas, embora algumas dicotiledôneas e outras gramíneas tenham sido encontradas (Apêndice 6). A granja não utiliza herbicidas nas áreas destinadas à atividade leiteira. As ervas daninhas foram controladas manualmente.



### 3.4.2 Feno, concentrados e minerais

O feno foi adquirido em fardos de 10 kg e armazenado em galpão, de onde era retirado e distribuído nos respectivos piquetes, após a ordenha da tarde, com livre acesso a todos os animais do grupo. A fim de garantir o acesso a todas as vacas, o feno foi sempre distribuído em vários locais.

Os grãos de milho, soja e cevada utilizados foram produzidos na própria granja. As rações energética e protéica foram preparadas semanalmente, em bateladas de 500 kg e 160 kg, respectivamente. Os grãos, depois de triturados e pesados, foram misturados manualmente nas respectivas proporções aos minerais até homogeneização completa. Os suplementos, tanto energético quanto protéico, foram fornecidos duas vezes ao dia, no cocho, durante as ordenhas.

O feno e os concentrados foram analisados uma única vez, pelo CEPA, para os seguintes parâmetros: matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), nutrientes digestíveis totais (NDT), energia líquida para lactação (ELL), energia líquida para manutenção (ELM) e os minerais cálcio, fósforo, potássio e magnésio. Como fonte de minerais foram utilizados sal mineral *Bovigold*, calcário calcítico e cloreto de sódio (Apêndice 7).

### 3.5 Manejo da ordenha

O sistema de ordenha é do tipo balde-ao-pé, com dois conjuntos de teteiras e sem amostrador automático. As vacas foram ordenhadas pela manhã, as 6 h e à tarde, as 18 h. A sala de ordenha possui capacidade para 12

animais, com água encanada, canzil para imobilização e cocho de alimentação. Enquanto o primeiro grupo estava sendo ordenhado, o segundo aguardava em mangueira de espera. Antes da ordenha, foi realizado rotineiramente lavagem e secagem do úbere e tetos e teste da caneca. Após a ordenha realizou-se a imersão dos tetos em solução desinfetante, reconduzindo imediatamente os animais aos piquetes de capim-bermuda.

### 3.6 Ajuste da carga animal

A carga animal foi ajustada semanalmente, mediante a remarcação dos piquetes, em função da oferta de forragem (kg MS/ha). Realizaram-se três amostragens para cada nível de oferta, totalizando seis pontos semanais, com 0,25 m<sup>2</sup> de área em cada local amostrado. O corte da forrageira foi realizado rente ao solo, de modo a obter-se o total de matéria seca disponível.

A matéria seca da pastagem foi determinada por secagem até peso constante, utilizando balança eletrônica com precisão de uma grama. O peso corporal dos animais foi determinado no 1º, 28º e 56º dias do experimento, em balança eletrônica com precisão de 10 kg. Para fins de cálculo da área dos piquetes, foi utilizado o peso corporal dos animais obtidos no início de cada período (Apêndice 8). Trabalhou-se com o sistema de pastejo rotativo, em piquetes delimitadas por cerca elétrica, com tempo de ocupação de um dia e de descanso médio de vinte dias.

### 3.7 Amostragem do leite

Para cada vaca ordenhada, o sistema de vácuo era desconectado e

imediatamente reconectado em segundo balde. O tarro com o leite recém ordenhado era pesado, filtrado, amostrado e acondicionado em resfriador de imersão. As amostras de leite individuais foram coletadas semanalmente, na ordenha da manhã e da tarde. As amostras finais, formadas pela união de, aproximadamente, 100 ml da ordenha matutina, com igual volume da ordenha vespertina, foram mantidas a 5° C até a manhã do dia seguinte, quando foram encaminhadas para os respectivos locais de análise.

### 3.8 Avaliações

Avaliaram-se os seguintes atributos: escore de condição corporal, conforme a escala de Wildman et al. (1982) e peso corporal no 1°, 28° e 56° dia do experimento (Apêndice 9); produção de leite, semanalmente (Apêndice 10); CMT, (*California mastitis test*) quinzenalmente e o teste da caneca de fundo escuro, diariamente. Animais CMT positivos foram amostrados apenas nos quartos sadios. Não houve nenhum caso em que todos os quartos apresentassem reação positiva ao CMT. Em até 2 quartos, porém, houve 3 casos de mastite: vaca 28 (02-fev), e vaca 53, duas vezes (25-jan e 17-fev). As vacas 121 (20-jan) e 28 (22-fev) manifestaram cio e foram inseminadas.

### 3.9 Análises físico-químicas e microbiológicas

#### 3.9.1 Na propriedade

Acidez titulável (°D): Titulação de 10 ml de leite com solução de hidróxido de sódio 1/9 N (LANARA, 1981). Foi realizada semanalmente. Acidez entre 12 e 20 °D para leite individual foi considerada normal (Apêndice 11).

Teste da fervura: realizado no final de cada período experimental (28° e 56° dias). As amostras foram aquecidas, em recipiente de alumínio, diretamente na chama (Apêndice 12). A metodologia foi adaptada a partir da descrição do LANARA (1981). Foi considerado positivo quando houve coagulação completa do leite, com formação de precipitado facilmente visível.

Densidade: Semanal, com termolactodensímetro. Os efeitos da temperatura foram corrigidos, segundo a metodologia do LANARA (1981) e orientações do fabricante do instrumento, com a auxílio da seguinte equação:  $D_{15} = DL + (T - 15) \cdot K$ . Onde  $D_{15}$  é densidade corrigida para 15 °C, DL= densidade lida, T = Temperatura de leitura da densidade (°C) e  $K = 0,2$  (Apêndice 13).

Prova do álcool: A estabilidade às diferentes graduações de álcool (68, 70, 72, 74, 76, 78 e 80% v/v) foi verificada mediante a mistura, em placa de Petri, de 2 ml de leite com 2 ml de solução alcoólica. Após alguns segundos e completa mistura, fez-se a leitura (Apêndice 14). A metodologia para a prova do álcool 68 está descrita pelo LANARA (1981).

O leite foi classificado em estável (E) e 4 categorias de instabilidade (I) (Modificado de Balbinotti et al., 2002):

E - Estável: sem precipitação;

I1 - Instável com precipitação leve: pequenos coágulos, de aparência granular, homogêneos e regularmente distribuídos;

I2 - Instável com precipitação média: aglomeração dos grânulos, formando coágulos maiores, irregulares, uniformemente distribuídos;

I3 - Instável com precipitação intensa: coágulos maiores, amorfos, heterogêneos e irregularmente distribuídos;

I4 - Instável com precipitação muito intensa: coagulação total das proteínas, formando uma massa disforme, distribuída por toda a área da placa.

Classificou-se como LINA, leites que apresentaram acidez titulável normal e positividade na prova do álcool 76 % v/v.

### 3.9.2 Na Coopasul

Tempo de redução com azul de metileno (TRAM): Análise semanal. Em tubos de ensaio, 3 ml de leite, misturados a 1 ml de azul de metileno, foram aquecidos em banho-maria a 37 °C até descolorir (Apêndice 15).

Crioscopia: Leitura semanal em equipamento ITR, modelo MK-540. O cálculo do teor de água foi realizado, com base no padrão -550 °H, utilizando a seguinte equação:  $\%H_2O = [(T - T') * 100] / T$  (LANARA, 1981). Onde, T = ponto de congelamento padrão do leite (-0,550 °H) e T' = ponto de congelamento do leite analisado (Apêndice 16).

### 3.9.3 Na Universidade de Passo Fundo (UPF)

Contagem bacteriana total (CBT): mensalmente, por citometria de fluxo, segundo a Fédération internationale de Laiterie (FIL) e International Dairy Federation (IDF). Internacional IDF Standard, 100B, 1991, BactoCount IBC (Bentley Instruments, Chaska, USA) (Apêndice 17).

Proteína, lactose, gordura e extrato seco total: análises quinzenais, por espectrofotometria por radiação infravermelho (AOAC, 1972);

Contagem de células somáticas (CCS): quinzenal, por citometria de fluxo, recomendado pela IDF Standard 148A, 1991 (Apêndice 18).

Caseína: mensalmente, pelas normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos físicos para análise de alimentos, método 15.1.10.1, 3 ed., v. 1, Governo do Estado de São Paulo, 1985 (Apêndice 19).

Minerais: realizado no final de cada período experimental (28° e 56° dia). Os teores de potássio, cálcio, sódio e magnésio foram determinados por espectrometria de absorção atômica (USA, 1994), enquanto o fósforo foi avaliado por titulação com kimociac (Apêndice 20). Os métodos analíticos citados são aqueles informados pelo CEPA, UPF.

### 3.10 Análise estatística

As análises estatísticas para efeito dos tratamentos, ordem e estágio de lactação e instabilidade ao álcool (LINA) foram realizadas a partir dos dados analíticos bimensais, obtidos entre o 14° e 56° dia do experimento (Tabela 1).

Tabela 1. Cronograma das avaliações e das análises físico-químicas e microbiológicas do leite, utilizadas na análise estatística

Característica	Data da coleta do leite				n
	13-jan	27-jan	10-fev	24-fev	
Produção de leite, álcool 76, álcool % conte, acidez, densidade, crioscopia e TRAM.....	X	X	X	X	40
Proteína, gordura, lactose e CCS.....	X	X	X	-	30
Minerais, caseína, teste da fervura, peso e escore de condição corporal.....	-	X	-	X	20
Contagem bacteriana total (CBT).....	X	-	X	-	20

n: número de amostras analisadas

Todos os dados referentes às vacas 41 e 53 foram excluídos da análise estatística, em virtude das características diferenciadas do leite, em

virtude do ao avançado estágio de lactação (> 40 semanas) destes animais. Assim, o Grupo CS (seqüência 100-60% do NRC) permaneceu com 6, enquanto o Grupo SC (seqüência 60 - 100% do NRC) passou a constituir-se de 4 animais.

### 3.10.1 Nível de oferta da dieta

Os dados foram avaliados por meio da análise de variância, considerando o delineamento completamente casualizado com reversão, testando os efeitos de oferta de dieta (n = 2), período (n = 2) e a interação entre tratamentos e períodos. O escore de condição corporal e o número de semanas em lactação foram utilizados como covariáveis, usando o programa estatístico SAS (*Statistical Analysis System*), procedimento GLM (*General Linear Models*). A separação das médias foi realizada pelo Lsmeans, teste de Fisher, nível de significância 0,05. Os valores do teste da fervura foram computados como uma distribuição de freqüência, sendo atribuído valor 0 (zero) para resultado negativo (leite normal) e 1 (um) para positivo (leite coagulado). A mesma análise foi feita para a prova do álcool 76, onde os valores 0 e 1 indicam leite estável e instável, respectivamente. Para estes dois parâmetros (teste da fervura e álcool 76) foram realizadas análises não-paramétricas, mediante a aplicação da distribuição  $\chi^2$  ("qui-quadrado").

### 3.10.2 Ordem de lactação

Os animais que participaram do ensaio encontravam-se entre a primeira e quarta lactação. As vacas foram rearranjadas em dois grupos:

primíparas (n = 5) e múltiparas (n = 5). Os dados foram avaliados pela análise de variância, considerando o delineamento completamente casualizado, testando o efeito de ordem de lactação (n = 2) e usando o número de semanas em lactação como covariável. Foi utilizado o programa estatístico SAS, procedimento GLM. A separação das médias foi realizada pelo LSmeans, teste de Fisher, nível de significância 0,05.

### 3.10.3 Estádio de lactação

Para avaliar a influência do estágio de lactação sobre a composição e propriedades do leite, os animais foram redistribuídas em dois grupos: até 180 dias (n = 7) e acima de 180 dias (n = 3) de produção. Os dados foram avaliados mediante análise de variância, considerando número de semanas em lactação (n = 2) e usando o número de lactações como covariável. Foi utilizado o programa estatístico SAS, procedimento GLM. A separação das médias foi realizada pelo LSmeans, teste de Fisher, nível de significância 0,05.

### 3.10.4 Leite instável não ácido (LINA)

Para avaliar as diferenças entre o LINA e o leite normal, os dados foram reunidos em positivos e negativos na prova do álcool 76. Das 40 amostras utilizadas para a análise estatística, 26 (65%) coagularam no teste do álcool e 14 (35%) mantiveram-se estáveis. Os dados foram avaliados mediante a análise de variância, considerando a estabilidade do leite (n = 2). Foi utilizado o programa estatístico SAS, procedimento GLM. A separação das médias foi realizada pelo LSmeans, teste de Fisher, nível de significância 0,05.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Nível de oferta da dieta

#### 4.1.1 Efeito do nível de oferta da dieta sobre o peso corporal e o escore de condição corporal

Não foi detectado efeito significativo dos tratamentos sobre o peso corporal (PC) e o escore de condição corporal (ECC) (Tabela 2).

Tabela 2. Médias e análise estatística para os efeitos dos tratamentos, período e interação, com ordem e estágio de lactação como covariáveis, para peso corporal (PC) e escore de condição corporal (ECC)

Item	Tratamentos		Períodos		P > F					EP	CV (%)
	T100	T60	P1	P2	Tratam	Período	T x P	Ordem	Estádio		
PC, kg	494,84	476,51	482	489	0,3981	0,7559	0,1539	0,2124	0,8299	14,94	9,41
ECC, 1-5	2,67	2,51	2,49	2,70	0,5451	0,4511	0,2100	0,0819	0,9605	0,19	22,32

T100: oferta de dieta para 100% das necessidades. T60: oferta de dieta para 60% das necessidades. P1: primeiro período. P2: segundo período. TxP: interação tratamento vs período. EP: erro padrão. CV: coeficiente de variação

No primeiro período, os animais apresentaram peso médio de  $507,51 \pm 20,00$  vs  $458,74 \pm 25,43$  kg ( $P = 0,2140$ ), enquanto que no segundo período, as vacas pesaram  $474,37 \pm 23,87$  vs  $502,09 \pm 18,78$  kg ( $P = 0,4326$ ), para os tratamento T100 e T60, respectivamente. Assim, enquanto que o grupo de animais CS (seqüência T100-T60), perdeu 5,42 kg/vaca, na comparação dos períodos, o grupo de animais SC (no primeiro período

receberam 60 e no segundo 100% do NRC), ganhou em média 15,63 kg/vaca. Portanto, o déficit nutricional, em nenhum dos períodos de 28 dias, alterou significativamente o peso corporal que causasse, *per se*, efeitos relevantes sobre a capacidade produtiva dos animais.

#### 4.1.2 Efeito do nível de oferta da dieta sobre a produção de leite

A produção de leite (PL) e a produção de leite corrigida (PLC) foram significativamente maiores para o tratamento T100. Houve interação significativa entre tratamentos e períodos para PLC (Tabela 3).

Tabela 3. Médias e análise estatística para os efeitos dos tratamentos, períodos e interação, com ordem e estágio de lactação como covariáveis, referentes à produção de leite (PL) e produção de leite corrigida (PLC)

Produção (kg/dia)	Tratamentos		Períodos		P > F					EP	CV (%)
	T100	T60	P1	P2	Trat	Peri	T x P	Ordem	Estádio		
PL	16,84	12,37	15,82	13,40	0,0032	0,2496	0,1287	0,7394	0,0010	0,86	18,10
PLC	16,23	12,58	15,01	13,78	0,0100	0,1336	0,0111	0,7726	0,0001	0,73	15,43

T100: oferta de dieta para 100% das necessidades. T60: oferta de dieta para 60% das necessidades. P1: primeiro período. P2: segundo período. TxP: interação tratamento vs período. EP: erro padrão. CV: coeficiente de variação

No primeiro período, diferentemente das vacas com T100, os animais com T60 consumiram insuficientes quantidades de nutrientes para manter o nível produtivo, resultando em significativa diferença na PLC entre tratamentos. No segundo período, a capacidade produtiva dos animais que tiveram restrição alimentar no período anterior, possivelmente, não tenha se manifestado por completo. A subnutrição aumenta a apoptose das células epiteliais mamárias e a readequação da dieta nem sempre recupera totalmente a produtividade dos animais. Assim, os 28 dias de restrição alimentar do

primeiro período podem ter afetado a capacidade produtiva dos animais do Grupo SC (seqüência de dietas 60-100% do NRC), no segundo período (Tabela 4). Assim, enquanto o Grupo CS diminuiu o volume de leite produzido em virtude do reduzido aporte de nutrientes, o Grupo SC não conseguiu traduzir a alta disponibilidade de alimentos em produção, possivelmente em consequência das seqüelas do período anterior. Este cenário traduziu-se em igualdade de produção entre os tratamentos no segundo período experimental.

Tabela 4. Médias e análise estatística para os efeitos dos tratamentos, para o primeiro e segundo períodos, com ordem e estágio de lactação como covariáveis, referentes à produção de leite corrigida (PLC)

Período	PLC (kg/dia)		P > F			EP		CV (%)
	T100	T60	Tratam	Ordem	Estádio	T100	T60	
Primeiro	17,77	12,31	0,0005	0,4356	0,0013	0,71	0,90	14,54
Segundo	14,49	13,04	0,5660	0,9500	0,0608	1,73	1,36	22,46

As pesquisas de Higginson et al. (1996) e Capuco et al. (2001a) indicam que a subnutrição pode elevar o nível de plasmina no leite, acelerando a apoptose das células epiteliais mamárias, com consequente redução da capacidade produtiva dos animais. Estes trabalhos embasam a argumentação utilizada para justificar o comportamento produtivo dos grupos de animais utilizados neste experimento.

#### 4.1.3 Efeito do nível de oferta da dieta sobre a composição do leite

##### 4.1.3.1. Efeito do nível de oferta da dieta sobre a concentração dos macrocomponentes

As concentrações médias dos principais constituintes do leite não

foram afetadas significativamente pelos tratamentos, períodos, ou interação. Entretanto, a produção total foi significativamente superior para todos os macrocomponentes do leite dos animais do tratamento T100 (Tabela 5).

Tabela 5. Médias e análise estatística para os efeitos dos tratamentos, períodos e interação, com ordem e estágio de lactação como covariáveis, referentes aos teores e produção diária dos macroconstituintes do leite: extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD), lactose, gordura bruta (GB), proteína bruta (PB), caseína (CN) e relação CN/PB

Constituinte	Tratamentos		Períodos		P > F					EP	CV (%)
	T100	T60	P1	P2	Tratam	Período	T x P	Ordem	Estádio		
EST (%)	12,09	11,89	12,09	11,89	0,3974	0,3944	0,5275	0,5859	0,0046	0,16	3,99
ESD (%)	8,39	8,21	8,30	8,30	0,1092	0,9938	0,0953	0,6859	0,0005	0,07	2,76
Lactose (%)	4,61	4,51	4,58	4,55	0,1521	0,7141	0,3571	0,7628	0,2987	0,05	3,15
GB (%)	3,69	3,68	3,78	3,59	0,9521	0,3366	0,8178	0,4087	0,1912	0,14	11,54
PB (%)	2,90	2,85	2,86	2,90	0,5375	0,6666	0,2663	0,8445	0,0001	0,06	5,92
CN (%)	2,25	2,11	2,14	2,22	0,2651	0,5294	0,8431	0,3855	0,0019	0,08	11,68
CN/PB	0,756	0,721	---	---	0,3832	---	---	0,9976	0,1603		6,47
EST (kg)	2,057	1,580	1,891	1,746	0,0044	0,3216	0,1200	0,6393	0,0030	0,100	16,71
ESD (kg)	1,432	1,102	1,311	1,222	0,0100	0,4326	0,1585	0,5743	0,0062	0,079	18,87
Lactose (kg)	0,793	0,611	0,729	0,676	0,0125	0,4175	0,2286	0,5643	0,0018	0,045	19,61
GB (kg)	0,625	0,478	0,579	0,524	0,0017	0,1693	0,0951	0,9230	0,0016	0,027	14,90
PB (kg)	0,489	0,378	0,446	0,421	0,0103	0,5177	0,1069	0,6157	0,0555	0,027	18,69
CN (kg)	0,359	0,204	0,308	0,255	0,0001	0,0234	0,1203	0,5478	0,0172	0,146	15,78

T100: oferta de dieta para 100% das necessidades. T60: oferta de dieta para 60% das necessidades. P1: primeiro período. P2: segundo período. TxP: interação tratamento vs período. EP: erro padrão. CV: coeficiente de variação

A maioria das pesquisas, entretanto, tem apontado decréscimo na concentração de lactose no leite de animais com regime alimentar restrito (Fonseca, 1993; Lacy-Hulbert et al., 1999; Ponce & Hernández, 2005; Capuco et al., 2001b; Mühlbach, 2003; Mustafa, 2006; Zanela et al., 2006).

Segundo Zanela et al. (2006), após período de restrição alimentar, são necessários, em média, 19,5 dias para o restabelecimento dos animais. Neste ensaio, a última remessa de amostras para o laboratório foi perdida. Assim, a última análise dos macrocomponentes do leite foi realizada apenas 14

dias após o início do segundo período. É possível, portanto, que não tenha havido tempo suficiente para que as alterações na composição do leite se manifestassem. Além disso, no primeiro período, a lactose apresentou diferença significativa e esta diferença não teve efeito das covariáveis ordem e estágio de lactação (Tabela 6).

Tabela 6. Médias e análise estatística para os efeitos dos tratamentos, durante o primeiro e segundo períodos, com ordem e estágio de lactação como covariáveis, referentes ao teor de lactose do leite

Período	Lactose (%)		P > F			EP		CV (%)
	T100	T60	Tratam	Ordem	Estádio	T100	T60	
Primeiro	4,67	4,48	0,0474	0,8716	0,4003	0,05	0,06	3,38
Segundo	4,57	4,54	0,7973	0,7842	0,4535	0,09	0,07	3,43

Diante destes fatos, é provável que, caso as amostras coletadas no último dia do período experimental tivessem sido analisadas, os resultados para lactose teriam sido diferentes. Os valores para lactose do primeiro período concordam com Fonseca (1993), que considera a subnutrição como principal causa de redução do teor deste componente no leite.

As pesquisas com animais em regime alimentar restrito têm revelado inconstância nos resultados para os constituintes principais do leite (Tabela 7). Entre os argumentos utilizados pelos pesquisadores para as alterações que a subnutrição causa na composição do leite, destacam-se: a) aumento por causa da concentração, em função da redução no volume produzido; b) o menor consumo de matéria seca leva à maior utilização de aminoácidos para a produção de energia, restringindo a síntese de proteínas no epitélio mamário; c) a baixa relação entre energia e proteína da dieta leva ao direcionamento

preferencial dos aminoácidos para a gliconeogênese, comprometendo a síntese de proteína láctea; d) animais que perdem excessivamente peso tendem a produzir leite com menor concentração de proteína.

Tabela 7. Dados da literatura relacionados ao efeito da subnutrição sobre os principais constituintes do leite

Autor	Lactose	Gordura	Proteína	Caseína
Mackle et al., 1999	A <sup>1</sup>	A	D	D
Mustafa, 2006	D	A	----	----
Lacy-Hulbert et al., 1999	D	A	A	A
Ponce & Hernández, 2005	D	D	D	D
Zanela et al., 2006	D	SE	D	----
Capuco et al., 2001b	D	SE	SE	SE
Auld et al., 2000	SE	SE	D	D
Zanela, 2004	SE	SE	D	SE
Virkajärvi et al., 2002	SE	SE	SE	----

<sup>1</sup>Apenas no verão. A: aumenta, D: diminui, SE: sem efeito

Em períodos de privação alimentar, em que o animal perde massa corporal, compostos cetônicos, mobilizados das reservas corporais são secretados no leite, sendo, equivocadamente, interpretados como gordura (Mühlbach, 2003). Talvez esta seja a razão pela qual, em muitos experimentos com restrição alimentar de curta duração, a concentração de gordura do leite "aumente". Os pesquisadores também sugerem a combinação entre múltiplos fatores para tentar explicar mudanças nos constituintes do leite produzido por vacas com déficit nutricional.

Em virtude da ação dos diferentes fatores que interferem na produção e composição do leite, à interação entre eles e à heterogeneidade natural dos animais, a variação entre os dados experimentais pode ser

bastante elevada. Isto torna mais difícil a detecção de diferenças estatísticas entre as médias. Para reduzir a variação, pode-se aumentar o número de repetições, utilizar bloqueamento ou covariáveis e empregar animais homogêneos quanto à genética, idade, peso corporal, escore de condição corporal, ordem e estágio de lactação e produção de leite. Os efeitos do escore, do estágio e ordem de lactação foram minimizados, ao serem incluídos como covariáveis no modelo estatístico. Além disso, o ideal é trabalhar com vacas na fase intermediária da lactação, evitando-se o período antes do pico e após o sétimo mês de lactação, onde ocorrem as maiores modificações na produção e composição do leite. Esta condição não foi possível de ser satisfeita, pois a granja possuía animais em avançado estágio de produção, entre a primeira e a quarta lactação, com grande amplitude de produção de leite. Finalmente, uma maneira de reduzir o erro experimental é aumentar o número de repetições. Com bovinos, contudo, experimentos com grande quantidade de animais geralmente são proibitivos em virtude do alto custo e das dificuldades de execução.

Diante do cenário anteriormente exposto, procurou-se reduzir o máximo possível o efeito animal. Para isso, as vacas foram aleatoriamente designadas aos tratamentos. Houve reversão das dietas entre os períodos experimentais. Os períodos utilizados para coleta de dados são considerados suficientes para ensaios com bovinos de leite. Além disso, os animais, todos nativos da granja, estavam completamente adaptados ao manejo e ao regime alimentar. Estes fatores provavelmente expliquem parcialmente as divergências entre alguns dos resultados encontrados e aqueles relatados na literatura.

#### 4.1.3.2. Efeito do nível de oferta da dieta sobre a concentração dos minerais no leite

Foram detectados efeitos significativos dos tratamentos sobre os teores de magnésio e efeitos significativos de período sobre as concentrações de potássio e magnésio (Tabela 8).

Tabela 8. Médias e análise estatística para tratamentos, períodos e interação, com ordem e estágio de lactação como covariáveis, referentes aos minerais do leite: K, Ca, P, Na, Mg e relação Ca/P

Minerais (g/l)	Tratamentos		Períodos		P > F					EP	CV (%)
	T100	T60	P1	P2	Trat	Peri	T x P	Ordem	Estádio		
Potássio	1,52	1,61	1,68	1,44	0,2692	0,0044	0,6523	0,0577	0,0040	0,05	10,38
Cálcio	0,96	1,13	1,00	0,96	0,4558	0,4956	0,7557	0,9530	0,0219	0,04	11,02
Fósforo	0,79	0,79	0,81	0,77	0,8458	0,3028	0,3016	0,8339	0,0288	0,02	8,72
Sódio	1,40	1,39	1,41	1,38	0,8880	0,5754	0,4806	0,9974	0,1550	0,04	9,15
Magnésio	0,12	0,11	0,10	0,13	0,0317	0,0001	0,6230	0,5748	0,0026	0,00	7,81
Relação Ca/P	1,23	1,28	1,25	1,26	0,5865	0,9058	0,6172	0,8788	0,6581	0,06	14,61

T100: oferta de dieta para 100% das necessidades. T60: oferta de dieta para 60% das necessidades. P1: primeiro período. P2: segundo período. TxP: Interação tratamento vs período. EP: Erro padrão. CV: Coeficiente de variação

As causas da diferença significativa para o magnésio entre tratamentos e entre períodos não foram identificadas. Pode ter havido erro analítico. A redução média no teor de potássio, no segundo período, pode ter sido causada pela aceleração na involução do tecido secretor de leite. A redução na quantidade de células secretoras pode ser constatada pelo menor volume de leite produzido no segundo período. É provável que a concentração de plasmina tenha aumentado neste período, com conseqüente bloqueio nos canais de potássio, reduzindo seu teor no leite (Silanikove et al., 2000). Dentre os minerais analisados, o potássio e o sódio fazem parte do grupo relacionado à força iônica. A mudança gerada pelos íons monovalentes no meio onde estão



inseridas as micelas interfere na estabilidade ao álcool. Como não foi detectado efeito significativo dos tratamentos sobre a concentração dos minerais, nenhuma mudança na estabilidade ao álcool pode ser atribuída, neste caso, a estes constituintes.

#### 4.1.4 Efeito do nível de oferta da dieta sobre as características físicas do leite

A estabilidade ao álcool, a porcentagem de álcool de corte, a acidez e a crioscopia diferiram significativamente entre os tratamentos. O teste da fervura e a densidade não apresentaram diferença significativa (Tabela 9).

Tabela 9. Médias e análise estatística para tratamentos, período e interação, com ordem e estágio de lactação como covariáveis, referentes às características físicas do leite: prova do álcool 76, álcool % de corte, teste da fervura (Ferv), acidez, crioscopia (Crio) e densidade (Dens)

Item	Tratamentos		Períodos		P > F					EP	CV (%)
	T100	T60	P1	P2	Trat	Peri	T x P	Ordem	Estádio		
Álcool 76	0,41	0,91	0,66	0,66	0,0046	1,0000	0,7418	0,1355	0,4367	0,11	49,97
Álcool, %	77,71	71,42	75,08	74,04	0,0017	0,5326	0,9445	0,1091	0,4296	1,16	4,78
Ferv (0,1)	0,00	0,00	0,00	0,00	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,00	0,00
Acidez, °D	16,80	15,26	16,43	15,63	0,0153	0,1782	0,6683	0,4984	0,1355	0,40	7,65
Crio, °H	-0,547	-0,536	-0,548	-0,535	0,0002	0,0001	0,0166	0,7256	0,4609	0,00	-0,87
Dens, g/l	1030,76	1030,20	1030,32	1030,63	0,1758	0,4415	0,1542	0,3087	0,0171	0,39	0,08

T100: oferta de dieta para 100% das necessidades. T60: oferta de dieta para 60% das necessidades. P1: primeiro período. P2: segundo período. TxP: Interação tratamento vs período. EP: erro padrão. CV: coeficiente de variação

A densidade manteve-se dentro da faixa estipulada pela Instrução Normativa N° 51 (MAPA, 2002), entre 1.028 a 1.034 g/l, mostrando ser uma característica do leite pouco variável.

Houve interação significativa para o ponto crioscópico. A IN51 estabelece índice crioscópico máximo de -530 °H (-0,512 °C). As médias para

os tratamentos, nos dois períodos, atenderam os limites legais. Todavia, foi detectada diferença significativa entre os tratamentos no primeiro período (Tabela 10).

Tabela 10. Médias e análise estatística para tratamentos, referentes ao primeiro e segundo períodos, com ordem e estágio de lactação como covariáveis, referentes ao índice crioscópico do leite

Período	Crioscopia (°H)		P > F			EP		CV (%)
	T100	T60	Tratam	Ordem	Estádio	T100	T60	
Primeiro	-0,557	-0,540	0,0390	0,9125	0,6834	0,004	0,006	-0,58
Segundo	-0,537	-0,534	0,3727	0,7932	0,8532	0,003	0,002	-1,26

É possível que, no primeiro período, a diferença no ponto crioscópico tenha sido em consequência da maior concentração de extrato seco desengordurado, especialmente lactose, no leite das vacas com T100. No segundo período, não foi detectado diferença significativa entre os tratamentos T100 e T60 para ESD (8,27 vs 8,33,  $P = 0,7696$ ) e lactose (4,57 vs 4,54,  $P = 0,7973$ ). Provavelmente, por este motivo, o ponto crioscópico também não variou entre os tratamentos nesta fase experimental.

A partir da revisão de Kirchgessner et al. (1965) referente aos efeitos da alimentação sobre a composição do leite, Mühlbach (2003) relata que dietas deficientes, principalmente em concentrados e minerais, levam à produção de leite com menor densidade e maior temperatura de congelamento. Os resultados obtidos neste ensaio para o ponto crioscópico concordam com este relato, mas discordam em relação à densidade do leite.

A acidez ficou dentro dos limites normais e legais (14-18 °D)

(Veloso, 1988; Silva, 1997; MAPA, 2002). Entretanto, detectaram-se os maiores valores no leite dos animais do tratamento T100. Segundo Veloso (1988), a acidez natural do leite origina-se, além do CO<sub>2</sub>, das caseínas, fosfatos, albumina e citratos. Embora os citratos não tenham sido avaliados neste ensaio, é de conhecimento que as forrageiras são as grandes fontes de ácido cítrico (Silva & Almeida, 2006). Por isso, é provável que animais com maior oferta de pasto, consumam mais, pela maior massa disponível e com mais qualidade, pela possibilidade de seleção, produzindo leite mais rico em citrato. Mesmo não havendo diferença significativa entre as médias das caseínas e proteínas totais, é possível que o efeito cumulativo destes constituintes tenha contribuído para a maior acidez do leite produzido no T100.

O teste da fervura indica o provável comportamento do leite durante o processamento térmico a temperaturas de até 100 °C. A ausência de diferença significativa entre as médias dos tratamentos revela que, apesar de mais instável ao álcool, o leite produzido no T60, não foi necessariamente mais instável termicamente. Estes resultados corroboram as pesquisas de Negri (2002), a partir das quais, a pesquisadora concluiu que o teste do álcool, isoladamente, não é suficiente para avaliar a estabilidade térmica do leite.

Foi detectado efeito significativo dos tratamentos sobre a estabilidade do leite ao álcool, com maior número de positivos para o leite dos animais do T60. Os animais cujas necessidades nutricionais para manutenção e produção não são atendidas produzem leite diferenciado que, de alguma maneira ainda não totalmente elucidada, comporta-se de forma diferente na prova do álcool. Do mesmo modo, o leite das vacas mais bem nutridas

necessitou de solução alcoólica 6,29% mais concentrada para precipitar, o que possivelmente esteja relacionado às alterações no grau de hidratação das micelas de caseína. A desidratação, além do teor de sais, pH e temperatura, modifica as interações físico-químicas entre as caseínas, podendo aumentar a reatividade superficial das micelas, levando-as à coagulação (Goff, 1995).

Vários estudos têm demonstrado que em períodos de carência alimentar aumenta a instabilidade do leite ao álcool. Ponce & Hernández (2001, 2005), Marques (2004), Zanela, 2004 (54 vs 25%,  $P > 0,05$ ), Zanela et al., 2006 (81 vs 25%,  $P = 0,0001$ ), Fischer et al. (2004a, 2004b, 2006a, 2006b) constataram maior incidência de positivos na prova do álcool para o leite de vacas com déficit nutricional. Nos experimentos realizados por Ponce & Hernández (2005), em Cuba, além da deficiência de proteína degradável no intestino (PDI), é provável que o excesso de cana-de-açúcar na dieta tenha provocado distúrbios ruminais. O rompimento do equilíbrio natural do ambiente ruminal, provavelmente, tenha afetado o metabolismo das células epiteliais mamárias, causando mudanças na composição do leite que estão relacionadas à sua capacidade de resistir à desidratação alcoólica.

Os efeitos negativos da subnutrição sobre a produção, as características físico-químicas e a estabilidade do leite ao álcool constatados neste experimento ratificam os resultados de pesquisas anteriores. O desafio, a partir deste conhecimento, é identificar como os desequilíbrios nutricionais modificam os processos fisiológicos e metabólicos do animal, especialmente das células epiteliais mamárias, e como estas modificações afetam a estabilidade do leite ao álcool e ao tratamento térmico.

#### 4.1.5 Efeito do nível de oferta da dieta sobre as características microbiológicas do leite

Não foi constatado efeito significativo dos tratamentos ou períodos para a contagem bacteriana total (CBT), tempo de redução com azul de metileno (TRAM) e contagem de células somáticas (CCS). A interação entre tratamento e período foi significativa para o TRAM (Tabela 11).

Tabela 11. Médias e análise estatística para tratamentos, com ordem e estágio de lactação como covariáveis, referentes às características microbiológicas do leite: contagem bacteriana total (CBT), tempo de redução com azul de metileno (TRAM) e contagem de células somáticas (CCS)

Item	Tratamentos		Períodos		P > F					EP	CV (%)
	T100	T60	P1	P2	Trat	Peri	T x P	Ordem	Estádio		
CBT <sup>1</sup>	422,81	434,35	482,81	374,35	0,9414	0,4935	0,3759	0,4163	0,9407	109,57	82,11
TRAM, h	3,38	3,69	3,68	3,58	0,1428	0,5599	0,0172	0,0080	0,4211	0,13	10,69
CCS <sup>2</sup>	142,27	139,75	140,33	141,68	0,9584	0,9776	0,2370	0,6438	0,0017	33,70	70,20

T100: oferta de dieta para 100% das necessidades. T60: oferta de dieta para 60% das necessidades. P1: primeiro período. P2: segundo período. T x P: Interação tratamento vs período. EP: erro padrão. CV: coeficiente de variação  
<sup>1</sup> UFCx10<sup>9</sup>/ml, <sup>2</sup> Celx10<sup>9</sup>/ml

A contagem de células somáticas, a contagem bacteriana total e o tempo de redução com azul de metileno relacionam-se à contaminação microbiológica do leite: deficiências higiênico-sanitárias, ocorrência de infecções na glândula mamária ou deficiente conservação do leite (alta temperatura de armazenamento).

Em virtude da falta de significância para o efeito dos tratamentos sobre o TRAM, nos dois períodos experimentais, atribui-se a significância da interação para esta característica aos efeitos de período (Tabela 12). A diferença entre períodos, possivelmente deve-se às diferenças no tempo

transcorrido entre a retirada das amostras da refrigeração e a realização das análises, aliado a maior temperatura ambiental do segundo período.

Tabela 12. Médias e análise estatística para os efeitos dos tratamentos, durante o primeiro e segundo períodos, com ordem e estágio de lactação como covariáveis, referentes ao tempo de redução com azul de metileno (TRAM)

Período	TRAM (h)		P > F			EP		CV (%)
	T100	T60	Tratam	Ordem	Estádio	T100	T60	
Primeiro	3,26	4,12	0,6333	0,6298	0,7853	1,01	1,28	89,25
Segundo	3,72	3,44	0,4136	0,2114	0,6743	0,24	0,19	16,87

A CBT ficou acima do valor máximo recomendado pelas autoridades sanitárias internacionais, de 100 mil UFC/ml, mas abaixo do limite estipulado pela IN51 (MAPA, 2002) a partir de 2005 ( $10^6$  UFC/ml) e acima do valor previsto pela mesma norma para 2011 (300 mil UFC/ml).

Os resultados para CCS concordam com Zanela (2004) que não constatou diferença significativa (393 vs 206 mil cel/ml,  $\alpha = 0,05$ ) entre animais com 60% e 100% das necessidades nutricionais atendidas.

Os valores verificados para as características microbiológicas situaram-se dentro de amplitudes consideradas normais *para leite in natura*. Portanto, provavelmente não ocorreu nenhuma interferência destes parâmetros sobre as características físico-químicas e a estabilidade do leite ao álcool.

#### 4.2 Ordem de lactação

Não foi constatado efeito significativo da ordem de lactação sobre o peso e o escore de condição corporal dos animais (Apêndice 21).

#### 4.2.1 Efeito da ordem de lactação sobre a produção de leite

Não foi detectado diferença significativa entre vacas primíparas e multíparas para produção de leite e produção de leite corrigida (Tabela 13).

Tabela 13 Médias e análise estatística para ordem de lactação, com estágio de lactação como covariável, para produção de leite (PL) e produção de leite corrigida (PLC)

Produção	Ordem de lactação		P > F		EP	CV (%)
	Primíparas	Multíparas	Ordem	Estádio		
PL (kg/dia)	13,72	15,71	0,1740	0,0011	0,97	27,91
PLC (kg/dia)	13,69	16,17	0,0737	0,0025	0,90	22,03

A produção de leite é função das características morfofisiológicas do úbere e do peso corporal dos animais. As vacas primíparas ainda não desenvolveram completamente a glândula mamária, tendo menor quantidade de células secretoras de leite e menor volume cisternal da glândula e do teto (Sá et al., 2006). Na primeira lactação, as vacas produzem 75-80% do leite que produzirão na fase adulta (Morrison, 1966; Fonseca, 1993). Segundo Fonseca (1993), o acréscimo na produção de leite deve-se ao aumento do peso corporal (5%) e da capacidade produtiva da glândula mamária (20%), que aumenta em função da maior quantidade de tecido conjuntivo, vascular, mioepitelial e, principalmente, secretor. De acordo com este autor, a produção de leite varia proporcionalmente ao peso metabólico do animal ( $PL \propto PC^{0,7}$ ). Fazendo a razão produtiva entre multíparas e primíparas, obtemos 1,05. Assim, de acordo com Fonseca (1993) as vacas multíparas deste ensaio deveriam produzir 5% mais leite que as primíparas, em conseqüência do maior peso corporal.

Analisando a produção de leite corrigida obtemos: 18% a mais para as vacas multíparas. Assim, pelo modelo de Fonseca (1993), a maior PLC dos animais com múltiplas lactações ( $P = 0,0737$ ) deveu-se ao maior peso corporal (5%) e ao maior desenvolvimento da glândula mamária (13%).

#### 4.2.2 Efeito da ordem de lactação sobre a composição do leite

##### 4.2.2.1 Efeito da ordem de lactação sobre os macrocomponentes

Não foi constatado efeito significativo da ordem de lactação sobre os macroconstituintes do leite, exceto para proteína total (Tabela 14).

Tabela 14. Médias e análise estatística para ordem de lactação, referentes aos macroconstituintes do leite, com estágio de lactação como covariável: extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD), lactose, gordura bruta (GB), proteína bruta (PB), caseína (CN) e relação entre caseína e gordura bruta (CN/GB)

Constituintes	Ordem de lactação		P > F		EP	CV (%)
	Primíparas	Multíparas	Ordem	Estádio		
EST (%)	12,11	11,99	0,5723	0,0033	0,14	4,27
ESD (%)	8,29	8,38	0,4615	0,0021	0,08	3,59
Lactose (%)	4,59	4,57	0,7882	0,0826	0,04	3,53
GB (%)	3,82	3,62	0,2632	0,1725	0,12	12,18
PB (%)	2,84	2,93	0,2519	0,0001	0,05	6,31
CN (%)	2,10	2,26	0,1787	0,0006	0,08	11,01
CN/PB	74,29	74,06	0,9487	0,1029	2,29	6,54
EST (kg/dia)	1,718	2,055	0,0673	0,0060	0,119	23,16
ESD (kg/dia)	1,189	1,436	0,0672	0,0085	0,088	24,52
Lactose (kg/dia)	0,664	0,790	0,0977	0,0017	0,049	24,94
GB (kg/dia)	0,530	0,618	0,1033	0,0059	0,035	22,68
PB (kg/dia)	0,402	0,497	0,0403	0,0832	0,030	24,84
CN (kg/dia)	0,258	0,313	0,2898	0,3307	0,034	35,66

EP: erro padrão. CV: coeficiente de variação

Estes resultados divergem de Fonseca (1993), que menciona



acréscimos nas concentrações dos constituintes principais do leite à medida que aumenta o número de lactações. Todavia, os resultados para proteína total e caseína concordam com Lopes et al. (2006) que não constataram diferença significativa para estes componentes (3,08 vs 3,14 e 2,52 vs 2,49,  $P > 0,05$ ) entre vacas de primeira e de quarta lactação.

Segundo Lopes et al. (2006), para detectar mudanças nos macroconstituintes do leite, em função da ordem de lactação, é necessário realizar ensaios com vacas que estejam além da quarta lactação. Tanto as vacas utilizadas por aquele pesquisador, quanto aquelas deste experimento estavam, no máximo, na quarta lactação.

#### 4.2.2.2 Efeito da ordem de lactação sobre os minerais

Não foram detectados efeitos significativos da ordem de lactação sobre a concentração dos minerais no leite (Tabela 15).

Tabela 15. Médias e análise estatística referentes aos efeitos da ordem de lactação, com estágio de lactação como covariável, para os minerais do leite: K, Ca, P, Na, Mg e relação Ca/P

Minerais (g/l)	Ordem de lactação		P > F		EP	CV (%)
	Primíparas	Multíparas	Ordem	Estádio		
Potássio	1,63	1,50	0,2303	0,0113	0,07	13,29
Cálcio	0,98	0,99	0,8725	0,0203	0,03	10,37
Fósforo	0,79	0,80	0,8765	0,0511	0,02	8,61
Sódio	1,40	1,39	0,8824	0,1005	0,04	8,61
Magnésio	0,12	0,12	0,7869	0,1689	0,01	17,40
Relação Ca/P	1,25	1,25	0,9796	0,5502	0,06	13,56

EP: erro padrão. CV: coeficiente de variação

As vacas primíparas têm maior capacidade de manter os níveis sanguíneos de

cálcio (7,4 - 13,0 mg/dl), especialmente em situação de déficit nutricional, o que contribui para a manutenção dos teores de cálcio no leite destes animais. Em vacas mais velhas, o intercâmbio de cálcio nos ossos e a capacidade de absorção de cálcio pelo intestino diminuem, tornando-as mais propensas à hipocalcemia. Vacas de primeira lactação raramente apresentam hipocalcemia (González e Silva, 2003). Estes efeitos, contudo tornam-se significativos após a quarta lactação (Lopes et al., 2006), a partir da qual a homeostase sangüínea do cálcio perde eficiência e o tecido epitelial mamário torna-se mais permeável, especialmente a íons. Uma vez que as vacas múltiparas deste experimento encontravam-se no máximo na 4ª lactação (3ª em média), possivelmente as modificações fisiológicas e anatômicas ainda não tenham sido suficientes para provocar alterações na composição mineralógica do leite.

#### 4.2.3 Efeito da ordem de lactação sobre as características físicas do leite

Não foram verificados efeitos significativos da ordem de lactação sobre a estabilidade na prova do álcool, ponto de corte do álcool, estabilidade no teste da fervura, acidez titulável, ponto crioscópico e densidade do leite (Tabela 16).

Com base nos resultados referentes às características físicas do leite produzido por vacas primíparas ou múltiparas até a quarta lactação, podemos conjecturar que, se existem diferenças entre elas, devem ser de magnitude relativamente baixa e, provavelmente, não afetam significativamente a estabilidade do leite na prova do álcool, ou durante o tratamento térmico até

100 °C. Não foram localizados dados na literatura que pudessem ser confrontados com estes resultados.

Tabela 16. Médias e análise estatística para ordem de lactação, com estágio de lactação como covariável, referentes às características físicas do leite: prova do álcool 76, álcool % de corte, teste da fervura, acidez titulável, ponto crioscópico e densidade

Parâmetros	Ordem de lactação		P > F		EP	CV (%)
	Primíparas	Múltiparas	Ordem	Estádio		
Álcool 76 (0,1)	0,51	0,79	0,0923	0,2270	0,11	73,12
Álcool, % corte	76,36	72,74	0,0557	0,2468	1,24	7,03
Fervura (0,1)	0,00	0,00	1,0000	1,0000	0,00	0,00
Acidez, °D	16,57	15,43	0,0654	0,2979	0,40	10,64
Crioscopia, °H	-0,542	-0,544	0,7017	0,5715	0,003	-2,67
Densidade, g/l	1030,23	1030,87	0,0915	0,0080	0,25	0,10

EP: erro padrão. CV: coeficiente de variação

#### 4.2.4 Efeito da ordem de lactação sobre as características microbiológicas do leite

Não foi detectado efeito significativo da ordem de lactação sobre a contagem bacteriana total (CBT), tempo de redução com azul de metileno (TRAM) e contagem de células somáticas (CCS) (Tabela 17).

Os resultados referentes às características microbiológicas para efeito da ordem de lactação indicam semelhantes cargas microbianas no leite das vacas primíparas e múltiparas, revelando igualdade de condições sanitárias dos animais e higiênico-sanitárias do ambiente e dos equipamentos de ordenha para os dois grupos. Além disso, a proliferação e a apoptose das células epiteliais mamárias possivelmente seguiram semelhante padrão para os dois grupos.

Tabela 17. Médias e análise estatística para ordem de lactação, com estágio de lactação como covariável, para as características microbiológicas do leite: contagem bacteriana total (CBT), tempo de redução com azul de metileno (TRAM) e contagem de células somáticas (CCS)

Parâmetros	Ordem de lactação		P > F		EP	CV (%)
	Primíparas	Múltiparas	Ordem	Estádio		
CBT, UFCx10 <sup>3</sup> /ml	450,66	372,47	0,6287	0,8756	107,00	77,96
TRAM, h	3,40	3,75	0,6532	0,6595	0,51	60,82
CCS, celx10 <sup>3</sup> /ml	154,22	141,64	0,8332	0,0133	39,89	99,03

### 4.3 Estádio de lactação

Não foi constatado efeito significativo do estágio de lactação sobre o peso e o escore de condição corporal dos animais (Apêndice 22).

#### 4.3.1 Efeito do estágio de lactação sobre a produção de leite

A produção de leite e a produção de leite corrigida foram significativamente maiores para os animais com menos de seis meses de lactação (Tabela 18).

Tabela 18. Médias e análise estatística para estágio de lactação, com ordem de lactação como covariável, referentes à produção de leite (PL) e produção de leite corrigida (PLC)

Produção (kg/dia)	Estádio de lactação		P > F		EP		CV (%)
	<180 dias	>180 dias	Estádio	Ordem	<180 d	>180 d	
PL	16,51	10,90	0,0044	0,0134	0,84	1,71	28,51
PLC	16,81	11,56	0,0057	0,0113	0,79	1,61	22,95

A produção de leite é determinada pelo número e pela atividade secretora das células epiteliais do tecido mamário (Capuco et al., 2001a). Estes

pesquisadores constataram que a porcentagem de células epiteliais em relação ao número total de células da glândula mamária reduziu 6% entre o 90° e 240° dia de lactação. Após o pico de produção, a apoptose supera a taxa de proliferação celular, resultando em perda líquida de tecido secretor e, conseqüentemente, em redução na produção de leite (Capuco et al., 2001a). Este, provavelmente, tenha sido o principal motivo da menor produção de leite das vacas na segunda fase de lactação.

#### 4.3.2 Efeito do estágio de lactação sobre a composição do leite

##### 4.3.2.1. Efeito do estágio de lactação sobre os macrocomponentes

As vacas com mais de seis meses de lactação produziram leite com concentração significativamente maior de extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD), proteína bruta (PB) e caseína (CN), mas apresentaram uma relação entre caseína e proteína bruta (CN/PB) menor. Em valores absolutos, EST, ESD, lactose e GB foram significativamente superiores para os animais no primeiro estágio de lactação. A produção diária de caseína, contudo, não revelou diferença significativa (Tabela 19).

Os resultados para a concentração de PB concordam com trabalhos anteriores, onde foi verificada relação inversa entre volume de leite produzido e teor de proteína (Auld et al., 1995; Ostensen et al., 1997; Teixeira et al., 2003; Hurley, 2006; Waldner et al., 2006; Barros, 2006; Silva & Almeida, 2006; Campos et al., 2006).

Corroborando os dados de Auld et al. (1995) e Lopes (2006), a concentração de caseína no leite dos animais lactando há mais de seis meses

foi significativamente superior. As concentrações de proteína bruta e caseína normalmente são maiores no início e final da lactação e menor na fase intermediária, formando uma curva com perfil oposto à curva de produção de leite (Rose, 1961a, Auld et al, 1995).

Tabela 19. Médias e análise estatística para estágio de lactação, com ordem de lactação como covariável, referentes ao teor e produção total dos macroconstituintes do leite: extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD), lactose, gordura bruta (GB), proteína bruta (PB), caseína (CN) e relação entre caseína e proteína bruta (CN/PB)

Constituinte	Estádio de lactação		P > F		EP		CV (%)
	<180 dias	>180 dias	Estádio	Ordem	< 180 d	>180 d	
EST (%)	11,85	12,61	0,0075	0,0729	0,12	0,24	4,29
ESD (%)	8,25	8,70	0,0038	0,1666	0,06	0,13	3,34
Lactose (%)	4,61	4,48	0,1148	0,0895	0,04	0,07	3,42
GB (%)	3,61	3,92	0,1996	0,2030	0,11	0,22	12,53
PB (%)	2,79	3,29	0,0001	0,0741	0,05	0,09	6,95
CN (%)	2,11	2,61	0,0109	0,4343	0,08	0,16	12,74
CN/PB	0,771	0,667	0,0354	0,3504	0,017	0,034	5,56
EST (kg/dia)	2,123	1,487	0,0107	0,0141	0,106	0,214	24,14
ESD (kg/dia)	1,480	1,033	0,0142	0,0150	0,078	0,157	25,54
Lactose (kg/dia)	0,829	0,529	0,0047	0,0102	0,044	0,900	26,25
GB (kg/dia)	0,643	0,454	0,0107	0,0272	0,031	0,063	23,53
PB (kg/dia)	0,498	0,394	0,0791	0,0309	0,026	0,053	25,04
CN (kg/dia)	0,317	0,258	0,3896	0,4791	0,030	0,062	37,56

EP: erro padrão. CV: coeficiente de variação

Visto que a caseína (CN) e as soroproteínas (SP) variam de forma semelhante com o decorrer da lactação, a proporção entre elas tende a permanecer relativamente constante (Rose, 1961a). No final da lactação, contudo, o acentuado aumento na permeabilidade das membranas das células epiteliais mamárias às SP faz com que estas aumentem em taxas superiores às caseínas, elevando sua participação no *pool* de proteínas do leite.

A razão CN/PB no leite bovino situa-se em torno de 0,80 (Walstra & Jenness, 1984). O valor obtido para as vacas no primeiro estágio de lactação ficou muito próximo deste índice. Na segunda fase de lactação, contudo, a participação da CN no *pool* de proteínas do leite diminuiu. Este resultado pode indicar maior taxa de involução da glândula mamária, com aumento da atividade da plasmina e conseqüente desdobramento das caseínas, especialmente  $\beta$ -CN. Outra razão para o decréscimo na relação CN/PB pode ter sido o aumento na permeabilidade das membranas das células epiteliais mamárias às SP em conseqüência do rompimento das junções firmes das células. Rose (1961a) constatou valores anormalmente altos ( $> 1$ ) para as razões entre gama e beta caseína ( $\gamma$ -CN/ $\beta$ -CN) e entre albumina do soro bovino e alfa-lactoalbumina (BSA/ $\alpha$ -La) no leite do final da lactação (295 dias). Estas relações revelam alta atividade da plasmina e elevada permeabilidade das membranas das células do epitélio mamário no final da lactação.

Segundo Peres (2001) a porcentagem de gordura tende a ser maior no final da lactação. Esta tendência não foi ratificada pelos dados deste experimento. Apesar de não ter havido diferença significativa para a concentração de gordura, o valor absoluto foi maior no leite das vacas do primeiro estágio de lactação, indicando que, em valores absolutos, este macrocomponente tem maior potencial produtivo na primeira fase da lactação.

Ao contrário da concentração de proteína e gordura que declinam nas primeiras semanas, passando a aumentar a seguir, o teor de lactose diminui constantemente até o final da lactação (Fonseca, 1993). Este dissacarídeo, diferentemente da maioria dos constituintes do leite, geralmente

não segue a tendência de concentrar pela redução no volume de leite produzido. A lactose, por determinar 60% da pressão osmótica, é o principal responsável pela quantidade de leite secretado (Silanikove et al., 2000). Por isso, sua concentração é relativamente constante, a menos que a vaca esteja subnutrida (Mühlbach, 2003) ou que danos às junções firmes das células epiteliais mamárias permitam o extravasamento para a corrente sanguínea. De acordo com O'Mahony (1988), nos primeiros dias a lactose aumenta, passando a declinar até o final da lactação. Entretanto, para vacas gestando, geralmente, ocorre aumento no teor de lactose do leite na fase final de produção (Fonseca, 1993). Embora não tenha sido detectada diferença significativa para o teor de lactose, a quantidade absoluta produzida foi significativamente maior para as vacas do primeiro estágio de lactação.

#### 4.3.2.2 Efeito do estágio de lactação sobre os minerais

Houve aumento significativo no teor de cálcio e redução da concentração de potássio no leite das vacas com mais de seis meses de lactação (Tabela 20).

A redução na concentração de potássio na segunda fase da lactação, provavelmente tenha sido consequência do aumento da atividade da plasmina. A fração peptídica 1-28, fragmento originado pela quebra da beta-caseína, pela plasmina, bloqueia os canais de potássio nas membranas apicais das células epiteliais mamárias, diminuindo a passagem deste mineral para o alvéolo (Shamay et al., 2003). Segundo estes autores, o complexo ativador de plasminogênio-plasminogênio-plasmina, aumenta sua concentração no leite,



com o decorrer da lactação, atuando na involução da glândula mamária. A maior atividade da plasmina causa rompimento das junções firmes das células epiteliais, aumentando a permeabilidade do tecido mamário. Assim, em função da diferença na concentração de íons entre o leite e o fluido intersticial, quando as junções firmes são rompidas, a concentração de potássio no leite diminui, enquanto que as de sódio e cloro tendem a aumentar. Esta, possivelmente, tenha sido a razão para a redução no teor de potássio no leite dos animais lactando há mais de seis meses.

Tabela 20. Médias e análise estatística para estágio de lactação, com ordem de lactação como covariável, referentes aos minerais do leite: K, Ca, P, Na, Mg e relação Ca/P

Minerais (g/l)	Estádio de lactação		P > F		EP		CV (%)
	< 180 dias	> 180 dias	Estádio	Ordem	<180 d	>180 d	
Potássio	1,63	1,25	0,0063	0,8433	0,05	0,11	12,33
Cálcio	0,93	1,11	0,0058	0,4738	0,03	0,05	9,28
Fósforo	0,78	0,82	0,4589	0,7481	0,02	0,04	9,78
Sódio	1,34	1,48	0,0650	0,4070	0,03	0,07	8,37
Magnésio	0,11	0,13	0,2040	0,6971	0,01	0,01	18,28
Relação Ca/P	1,19	1,37	0,0787	0,4705	0,04	0,09	12,16

EP: erro padrão. CV: coeficiente de variação

O valor percentual de cálcio aumentou na segunda fase da lactação, provavelmente, em virtude da concentração causada pelo decréscimo em 34% no volume de leite produzido.

#### 4.3.3 Efeito do estágio de lactação sobre as características físicas do leite

Não foram detectados efeitos significativos do estágio de lactação

sobre a prova do álcool, álcool % de corte, teste da fervura, acidez titulável e ponto crioscópico. A densidade, entretanto, foi significativamente maior para as vacas em mais avançado estágio de lactação (Tabela 21).

Tabela 21. Médias e análise estatística para estágio de lactação, com ordem de lactação como covariável, referentes às características físicas do leite: prova do álcool 76, álcool % de corte, teste da fervura, acidez, ponto crioscópico e densidade

Característica	Estádio de lactação		P > F		EP		CV (%)
	< 180 dias	> 180 dias	Estádio	Ordem	<180 d	>180 d	
Álcool 76 (0,1)	0,67	1,02	0,1013	0,2738	0,09	0,19	72,17
Álcool, % corte	74,00	71,00	0,1956	0,1659	1,04	2,11	6,96
Fervura (0,1)	0,00	0,00	1,0000	1,0000	0,00	0,00	0,00
Acidez, °D	15,76	16,18	0,5596	0,0109	0,33	0,67	10,24
Crioscopia, °H	-0,544	-0,540	0,5346	0,8922	0,003	0,006	-2,75
Densidade, g/l	1030,36	1031,45	0,0222	0,5858	0,21	0,42	0,10

EP: erro padrão. CV: coeficiente de variação

O aumento na densidade do leite das vacas além dos seis meses de lactação, possivelmente, tenha sido causado pelo acréscimo na concentração do extrato seco desengordurado, especialmente sais minerais, em consequência da redução no volume de leite secretado e à maior permeabilidade da membrana das células epiteliais mamárias.

De acordo com Horne e Parker (1983), a concentração por evaporação, centrifugação ou por adição de NaCl diminui a estabilidade do leite ao álcool em virtude do aumento da força iônica (FI) do meio. Com o aumento no teor dos íons que compõem a FI (haletos e metais alcalinos) ocorre uma redução proporcional na estabilidade do leite ao álcool. A FI é uma medida do campo elétrico gerado pelos íons existentes na solução, sendo definida como:

$\mu = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2$  (c = concentração iônica molar, z = carga iônica correspondente). Segundo Horne & Parker (1983), a FI modifica a estabilidade do sistema micelar por meio de três mecanismos: a) reduzindo as ligações do cálcio com as caseínas, o que eleva a estabilidade do sistema micelar; b) reduzindo a capacidade do citrato de quelatar cálcio ( $\text{Ca}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2 \rightleftharpoons 2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{-3} + 3\text{Ca}^{+2}$ ), o que diminui a estabilidade das micelas e c) modificando o pK das fosfoserinas das proteínas. Estes pesquisadores demonstraram que a concentração do leite (pH > 6,5), pela diálise ou ultrafiltração, aumentou o teor de íons monovalentes, com conseqüente redução na estabilidade ao álcool. Neste ensaio, contudo, a redução nos teores de K, causados pelo bloqueio dos respectivos canais, pela plasmina, combinado com o insuficiente aumento nos teores de  $\text{Na}^+$  (0,14 g/l, P = 0,0650) e, possivelmente de  $\text{Cl}^-$  (equilíbrio de cargas) não possibilitaram que houvesse efeito significativo do estágio de lactação sobre a estabilidade do leite ao álcool.

#### 4.3.4 Efeito do estágio de lactação sobre as características microbiológicas do leite

Não foi constatado efeito significativo da fase de lactação sobre a contagem bacteriana total (CBT) e o tempo de redução com azul de metileno (TRAM), mas constatou-se maior contagem de células somáticas (CCS) no leite dos animais no segundo estágio de lactação (Tabela 22).

O aumento na contagem de células somáticas no leite das vacas além dos seis meses de lactação, possivelmente, tenha sido causado pelo acréscimo na taxa de morte celular e das descamações dos tecidos da

glândula mamária.

Os resultados para CCS ratificam os relatos de Higginson et al. (1996). Estes pesquisadores verificaram aumento na concentração de plasmina e de ativadores de plasminogênio (AP) no leite à medida que a lactação avança, com o plasminogênio atingindo o nível máximo no quinto mês de lactação. O aumento nos níveis de plasmina deve-se, segundo estes autores, ao acréscimo na concentração de seu precursor (plasminogênio), o qual reflete a maior permeabilidade do epitélio mamário com o decorrer da lactação. Entretanto, a relação entre plasminogênio e plasmina diminui à medida que a lactação avança, indicando acelerada conversão do primeiro no segundo, pela ação dos AP. Os autores constataram uma correlação significativa ( $r=0,50$ ;  $P<0,05$ ) entre os AP e CCS, o que explicaria o aumento na CCS do leite com o decorrer da lactação.

Tabela 22. Médias e análise estatística para estágio de lactação, com ordem de lactação como covariável, referentes às características microbiológicas do leite: contagem bacteriana total (CBT), tempo de redução com azul de metileno (TRAM) e contagem de células somáticas (CCS)

Característica	Estádio de lactação		P > F		EP		CV (%)
	<180 dias	>180 dias	Estádio	Ordem	<180 d	>180 d	
CBT, CFCx10 <sup>3</sup> /ml	463,09	196,38	0,1543	0,1609	81,36	164,82	69,66
TRAM, h	3,56	3,87	0,7554	0,9900	0,45	0,91	62,51
CCS, celx10 <sup>3</sup> /ml	89,43	317,15	0,0031	0,3735	31,77	64,36	92,68

EP: erro padrão. CV: coeficiente de variação

A relação entre estágio de lactação e perda de células secretoras é do tipo parabólica, com ponto de mínimo próximo à trigésima quinta semana de lactação (Fonseca, 1993). Portanto, enquanto às vacas com menos de 180

dias de lactação estavam reduzindo, aquelas com mais de 180 dias estavam aumentando as perdas de células epiteliais. Estas células irão somar-se aos linfócitos para compor a CCS. Assim, o aumento na concentração de plasmina no leite e a mais elevada taxa de perda de células epiteliais mamárias, provavelmente tenham sido as razões para a maior CCS no leite secretado pelas vacas em mais avançado estágio de lactação.

#### 4.4 Leite instável não ácido (LINA)

O peso corporal e o escore de condição corporal não apresentaram diferença significativa entre os animais produzindo leite normal e aqueles secretando leite instável (Apêndice 23).

##### 4.4.1 Efeito do LINA sobre a produção de leite

A produção de leite e a produção de leite corrigida tiveram diferença significativa entre o leite normal e o leite instável (Tabela 23).

Tabela 23. Médias e análise estatística para estabilidade ao álcool, com estágio e ordem de lactação como covariáveis, referentes à produção de leite (PL) e produção de leite corrigida (PLC)

Produção (kg/dia)	Estabilidade		P > F			EP		CV (%)
	E	I	LINA	Estádio	Ordem	E	I	
PL	17,57	13,18	0,0012	0,0001	0,0747	0,10	0,72	24,80
PLC	17,38	13,30	0,0006	0,0004	0,0093	0,80	0,64	18,05

E: estável. I: Instável. EP: erro padrão. CV: coeficiente de variação

A quantidade de leite produzido não tem, *per se*, nenhuma interferência sobre a prova do álcool, a não ser que o menor volume secretado

seja por causa do avançado estágio de lactação ou à baixa sanidade dos animais. Vacas de baixo potencial genético podem secretar leite estável e animais de alta aptidão leiteira podem produzir leite instável ao álcool. Deste modo, é provável que este fator não tenha influenciado a estabilidade do leite ao álcool.

#### 4.4.2 Efeito do LINA sobre a composição do leite

##### 4.4.2.1 Efeito do LINA sobre os macrocomponentes

Não foram detectadas diferenças significativas entre os teores dos macroconstituintes do leite normal e do leite instável. A produção diária de extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD), lactose, gordura bruta (GB) e proteína bruta (PB) foram significativamente menores no leite instável (Tabela 24).

Estes resultados indicam que, se há algum envolvimento dos macroconstituintes nas reações que determinam a instabilidade do leite ao álcool, provavelmente, tenha importância secundária, sendo de difícil detecção. Mais importante que o teor de proteína, gordura e lactose para a estabilidade na prova do álcool, são os níveis de cálcio iônico (Horne & Muir, 1990; Barros, 2002b), pH e força iônica (Horne & Parker, 1981b).

Diferentemente deste ensaio, outros trabalhos obtiveram diferenças significativas entre os macrocomponentes do leite instável e normal. Ponce & Hernández (2005), constataram menor concentração de caseína (2,11/2,04 vs 2,31%), proteína bruta (2,82/2,80 vs 3,01%) e lactose (4,53/4,56 vs 4,62%) mas não detectaram diferença significativa ( $P < 0,05$ ) no teor de gordura (3,36/3,35

vs 3,42%) do leite positivo na prova do álcool. A cana-de-açúcar foi a base da alimentação, constituindo 50% da matéria seca da dieta dos animais que produziram leite instável (G50). Para o grupo controle não foi fornecida cana-de-açúcar e as necessidades nutricionais foram atendidas em 100%. Este volumoso é alimento pobre em proteína (PB ~ 10 g/kg MS), o que provocou déficit de 20% na proteína degradável no intestino (PDI).

Tabela 24. Médias e análise estatística, para estabilidade ao álcool, com estádio e ordem de lactação como covariáveis, referentes ao teor e produção dos macroconstituintes do leite: extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD), lactose, gordura bruta (GB) proteína bruta (PB), caseína (CN) e relação CN/PB

Constituinte	Estabilidade		LINA	P > F		EP		CV (%)
	E	I		Estádio	Ordem	E	I	
EST (%)	11,95	12,11	0,4393	0,0022	0,7162	0,15	0,12	4,32
ESD (%)	8,29	8,36	0,5650	0,0014	0,1537	0,09	0,07	3,50
Lactose (%)	4,61	4,56	0,3543	0,1850	0,1804	0,05	0,04	3,45
GB (%)	3,66	3,75	0,6048	0,1238	0,1858	0,13	0,11	12,27
PB (%)	2,82	2,93	0,1091	0,0001	0,4648	0,05	0,04	6,13
CN (%)	2,23	2,16	0,5988	0,0010	0,2378	0,11	0,06	11,42
CN/PB	0,77	0,72	0,2947	0,3093	0,6725	0,03	0,02	6,28
EST (kg/dia)	2,192	1,683	0,0013	0,0014	0,0070	0,108	0,087	19,37
ESD (kg/dia)	1,523	1,172	0,0028	0,0025	0,0074	0,081	0,066	20,96
Lactose (kg/dia)	0,851	0,644	0,0015	0,0003	0,0073	0,044	0,036	20,70
GB (kg/dia)	0,669	0,511	0,0009	0,0015	0,0192	0,032	0,026	18,86
PB (kg/dia)	0,514	0,406	0,0086	0,0442	0,0100	0,029	0,024	21,88
CN (kg/dia)	0,356	0,262	0,0882	0,3160	0,3283	0,045	0,025	34,13

E: estável. I: instável. EP: erro padrão. CV: coeficiente de variação

Segundo Ponce & Hernández (2005), a quantidade de proteína que o animal pode mobilizar das reservas corporais limita-se a 145 g/dia. Assim, o alimento constitui-se a fonte primordial deste nutriente para a produção de leite. Além disso, o excesso de carboidratos rapidamente fermentáveis

possivelmente tenha causado distúrbios no rúmen, com depressão da flora celulolítica, redução do pH e acidose ruminal. De acordo com os pesquisadores, o déficit de PDI e os desarranjos ruminais foram as causas da redução nos macroconstituintes do leite. Neste experimento, foi utilizado outro grupo de animais, porém com 80% da matéria seca fornecida pela cana-de-açúcar (G80) e déficit de PDI de 25%. Os resultados foram semelhantes ao G50. Os valores acima, colocados após a barra referem-se ao tratamento G80.

Barros et al. (2000) verificaram maior concentração de gordura (3,95 vs 3,40%,  $P < 0,0001$ ), proteína (3,49 vs 3,23%,  $P < 0,0002$ ) e EST (13,04 vs 12,16%,  $P < 0,0001$ ), mas menor teor de lactose (4,65 vs 4,84%  $P < 0,0001$ ) em leites positivos na prova do álcool. Não foi observada diferença significativa para caseína (2,34 vs 2,26%) e extrato seco desengordurado (8,75 vs 8,68%).

Zanela (2004) detectou menor porcentagem de proteína (3,01 vs 3,05), lactose (4,20 vs 4,39), extrato seco total (11,65 vs 11,78) e extrato seco desengordurado (8,23 vs 8,39) no leite instável que no leite normal.

Fischer et al. (2006a) relatam maiores concentrações de gordura (3,43 vs 3,39%,  $P < 0,07$  e 3,60 vs 3,48%,  $P < 0,0001$ ) e menores teores de lactose (4,29 vs 4,39%,  $P < 0,0001$  e 4,28 vs 4,39%,  $P < 0,0001$ ) e EST (11,65 vs 11,78%,  $P < 0,0001$ ) para o leite instável não ácido, em dois experimentos realizados em Panambi e Pelotas, respectivamente.

Os trabalhos revisados revelaram divergência para o teor de gordura e proteína, mas todos apontaram redução significativa na concentração de lactose no leite instável ao álcool.

Comparando os resultados deste ensaio com os experimentos



analisados, constata-se concordância apenas para os ESD e CN (Barros et al., 2000) e GB (Ponce & Hernández, 2005). Várias podem ser as razões para tais divergências: concentração da solução alcoólica utilizada, nível de subnutrição, composição da dieta, sistema de produção (confinamento vs pastejo), delineamento e duração dos experimentos, ordem e estágio de lactação das vacas, raça e número de animais utilizados, são algumas delas.

#### 4.4.2.2 Efeito do LINA sobre os minerais

Os minerais não apresentaram diferença significativa entre as médias do leite instável e do leite normal. Assim, não foi possível vincular qualquer mineral à estabilidade do leite na prova do álcool (Tabela 25).

Tabela 25. Médias e análise estatística para estabilidade ao álcool, com estágio e ordem de lactação como covariáveis, referentes aos minerais do leite: K, Ca, P, Na, Mg e relação Ca/P

Minerais (g/l)	Estabilidade		LINA	P > F		EP		CV (%)
	E	I		Ordem	Estádio	E	I	
Potássio	1,63	1,55	0,4876	0,0164	0,1397	0,09	0,05	13,01
Cálcio	0,97	0,99	0,6971	0,0229	0,8514	0,05	0,03	10,62
Fósforo	0,84	0,78	0,0660	0,0117	0,5121	0,03	0,02	7,94
Sódio	1,42	1,38	0,5211	0,0724	0,7531	0,06	0,03	8,72
Magnésio	0,12	0,12	0,9015	0,1351	0,8870	0,01	0,01	17,95
Relação Ca/P	1,15	1,28	0,1591	0,7578	0,7420	0,07	0,04	13,10

E: estável. I: instável. EP: erro padrão. CV: coeficiente de variação

Segundo Barros (2006), para a estabilidade do leite na prova do álcool, é muito mais importante a porcentagem de cálcio iônico que a concentração de cálcio total. Barros (2002b, 2006) e Fischer et al. (2006a)

constatarem maior teor de cálcio iônico no leite positivo que no leite negativo na prova do álcool, detectando 117 vs 98 mg/l ( $P < 0,011$ ); 100 vs 80 mg/l e 94 vs 78 mg/l ( $P < 0,0001$ ), respectivamente.

Ponce & Hernández (2005), detectaram diferenças significativas, ( $P < 0,05$ ) entre leites instáveis e estáveis ao álcool, para as concentrações médias de cálcio total (101,1/95,5 vs 113,7 mg/l), fósforo (79,4/76,6 vs 92,5 mg/l) e magnésio (8,24/8,26 vs 9,19 mg/l). A dieta das vacas que produziram leite instável continha 50% (G50) ou 80% (G80) de cana-de-açúcar. Os pesquisadores atribuíram o menor teor de fósforo e magnésio no leite instável à baixa porcentagem destes minerais na dieta e a menor concentração de cálcio foi atribuído ao déficit de proteína degradável no intestino. Os valores após a barra correspondem ao grupo G80.

Diferentemente dos experimentos descritos na bibliografia consultada, neste ensaio, os alimentos fornecidos aos animais, mesmo em oferta de dieta para 60% das necessidades (T60), não causaram déficit mineral suficientemente alto para determinar decréscimo no teor destes nutrientes no leite. Por estes resultados, as concentrações dos minerais nas amostras de leite analisadas possivelmente não interferiram de forma decisiva sobre a estabilidade do leite na prova do álcool.

#### 4.4.3 Efeito do LINA sobre as características físicas do leite

Não foram detectadas diferenças significativas entre leite instável na prova do álcool e leite normal, para o teste da fervura, acidez titulável, ponto crioscópico e densidade (Tabela 26).

Tabela 26. Médias e análise estatística para estabilidade ao álcool, com estágio e ordem de lactação como covariáveis, referentes às características físicas do leite: teste da fervura, acidez titulável, ponto crioscópico e densidade

Característica	Estabilidade		P > F			EP		CV (%)
	E	I	LINA	Estádio	Ordem	E	I	
Fervura, (0,1)	0,00	0,00	1,0000	1,0000	1,0000	0,00	0,00	0,00
Acidez, °D	16,35	15,81	0,3793	0,0765	0,4507	0,48	0,35	11,02
Crioscopia, °H	-0,546	-0,540	0,2346	0,6158	0,4352	0,00	0,00	-2,65
Densidade, g/l	1030,92	1030,35	0,1141	0,0037	0,0087	0,00	0,00	0,10

E: estável. I: instável. EP: erro padrão. CV: coeficiente de variação

Ponce & Hernández (2005) estudaram os efeitos de dois níveis de restrição nutricional sobre as propriedades físico-químicas do leite. Para comparar de forma adequada os resultados deste ensaio com os dados daqueles pesquisadores, os dois níveis de subnutrição induzidos serão analisados separadamente:

Grupo G50 (50% cana-de-açúcar, -20% PDI) (Veja item 4.4.2.1). Para este grupo, Ponce e Hernández constataram diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre leite instável e normal para ponto crioscópico (-0,510 vs -0,519 °C) e não significativa para acidez (1,20 vs 1,35 g/l) e densidade (1029 vs 1029 g/l). O teste da fervura foi negativo para todos os tratamentos. Com exceção do ponto crioscópico, os demais resultados coincidiram com este experimento.

Grupo G80 (80% cana-de-açúcar, PDI -25%). Neste caso, apenas os resultados do teste da fervura coincidem com este trabalho. Para as demais características, os pesquisadores detectaram diferença significativa entre o leite instável e normal, para acidez (1,18 vs 1,35 g/l), ponto crioscópico (-511 vs -0,519 °C) e densidade (1028 vs 1029 g/l).

Os resultados do presente ensaio discordam de Barros et al. (2000) que detectou diferença significativa (-0,53 vs -0,52,  $P < 0,016$ ) entre o ponto crioscópico do leite positivo e negativo na prova do álcool.

#### 4.4.4 Efeito do LINA sobre as características microbiológicas do leite

Não foi constatada diferença significativa entre leite instável e leite normal, para contagem bacteriana total, tempo de redução com azul de metileno e contagem de células somáticas (Tabela 27).

Tabela 27. Médias e análise estatística para estabilidade ao álcool, com estágio e ordem de lactação como covariáveis, referentes às características microbiológicas do leite: contagem bacteriana total (CBT), tempo de redução com azul de metileno (TRAM) e contagem de células somáticas (CCS)

Característica	Estabilidade		P > F			EP		CV (%)
	E	I	LINA	Estádio	Ordem	E	I	
CBT, UFCx10 <sup>3</sup> /ml.	510,97	330,23	0,2517	0,8030	0,3999	109,62	98,52	77,06
TRAM, h	3,95	3,37	0,4439	0,6280	0,5010	0,60	0,43	61,11
CCS, celx10 <sup>3</sup> /ml	147,07	148,51	0,9803	0,0074	0,7723	44,02	35,68	100,81

E: estável. I: instável. EP: erro padrão. CV: coeficiente de variação.

Os valores para contagem de células somáticas ratificam com os resultados experimentais de Barros, 2002a (319 vs 210 mil cel/ml); Zanela, 2004 (393 vs 206 mil cel/ml,  $P > 0,05$ ) e Zanela et al. 2006 (479 vs 324 mil cel/ml,  $P > 0,1595$ ) que não detectaram significância para diferença entre leite positivo e negativo na prova do álcool. A diferença não significativa para contagem bacteriana total confirma os relatos de Barros (2002b) que não constatou diferença (119,5 vs 563,08 UFCx10<sup>3</sup>/ml) para esta característica entre leite instável e estável ao álcool.

## 4.5 Análise de correlação

### 4.5.1 Correlação entre o ponto de corte ao álcool e a composição do leite

A concentração alcoólica de corte apresentou correlação significativa com a proteína bruta ( $r = -0,59$ ;  $P = 0,0001$ ), lactose ( $r = 0,44$ ;  $P = 0,0017$ ), EST ( $r = -0,42$ ;  $P = 0,0026$ ) e ESD ( $r = -0,51$ ;  $P = 0,0002$ ) (Apêndice 24). Destaca-se o valor relativamente alto do coeficiente para proteína. Estas interações são corroboradas pelos respectivos coeficientes de correlação do álcool 76 com os macrocomponentes do leite. A interferência do teor de sólidos do leite sobre a concentração do álcool de corte está também implícita na correlação significativa ( $r = -0,35$ ;  $P = 0,0058$ ) entre o ponto de corte e a densidade do leite. Não foram constatadas correlações significativas entre o ponto de corte ao álcool e a concentração da caseína ( $P = 0,2341$ ) ou dos minerais do leite.

### 4.5.2 Correlação entre contagem de células somáticas e produção, características físico-químicas e microbiológicas do leite

Houve correlação significativa entre CCS e produção de leite corrigida ( $r = -0,58$ ;  $P = 0,0001$ ), indicando que vacas com alta CCS produzem menos leite, possivelmente por causa das infecções da glândula mamária.

A correlação significativa ( $r = -0,31$ ;  $P = 0,0345$ ) entre CCS e concentração da solução alcoólica no ponto de corte indica que alta CCS pode aumentar a instabilidade do leite ao álcool.

A CCS apresentou correlação significativa com o extrato seco total ( $r = 0,43$ ;  $P = 0,0021$ ), extrato seco desengordurado ( $r = 0,53$ ;  $P = 0,0001$ ), teor de

proteína ( $r=0,56$ ;  $P=0,0001$ ), caseína ( $r=0,58$ ;  $P=0,0488$ ) e lactose ( $r=-0,30$ ;  $P=0,0391$ ), mas não significativa com a gordura ( $r=0,26$ ;  $P=0,0688$ ). Estes resultados concordam com Pereira et al. (1999) e Ng-Kwai-Hang et al. (1982) para o teor de proteína e lactose, mas divergem de Pereira et al. (1999) em relação à concentração de gordura.

Ng-Kwai-Hang et al. (1982) correlacionaram a proteína bruta do leite ( $\Delta PB$ ) com o escore de células somáticas (ECS) com o auxílio da seguinte equação:  $\Delta PB (\%) = PB_i (1,0099 * \Delta ECS)$ . Onde:  $\Delta PB = PB_f - PB_i$  e  $\Delta ECS = ECS_f - ECS_i$ . Os índices f e i significam inicial e final, respectivamente. Os valores de extrato seco total dissentem de Prada e Silva et al. (2000) que não constataram correlação significativa deste com a CCS ( $r = -0,02$ ;  $P = 0,3956$ ).

O aumento no teor de proteína do leite em função da elevação da CCS ocorre em virtude do maior fluxo de albumina (até 252%) e imunoglobulinas (até 316%) do sangue para a glândula mamária (Pereira et al. 1999). Segundo estes autores, infecções da glândula mamária tornam as membranas que separam o sangue do leite mais permeáveis, permitindo maior fluxo de proteínas do primeiro para o segundo. Em quadro mastítico, a concentração de lactose do leite diminui, essencialmente, em consequência de três fatores: a) danos ao tecido secretor; b) degradação microbiana e c) extravasamento para a corrente sangüínea (Shuster et al. 1991). Desta forma, aumentos na CCS, normalmente vêm acompanhados por redução no teor de lactose do leite. Prada e Silva et al. (2000) relacionaram a concentração de lactose do leite com o escore de células somáticas (ECS) por meio da seguinte equação:  $Lac (\%) = -0,0568 ECS + 4,7978$ .

## 5. CONCLUSÕES

A restrição alimentar e a ordem de lactação não afetaram de forma expressiva a composição do leite, exceto pelas reduções no teor de lactose (no primeiro período) e de magnésio, causadas pela deficiência nutricional. Em valores absolutos, contudo, todos os macrocomponentes reduziram com a subnutrição. No estágio de lactação mais avançado, houve redução no teor de potássio e aumento na concentração de EST, ESD, proteína, caseína e cálcio, mas redução na produção total de EST, ESD, lactose e gordura.

O déficit nutricional, a ordem e estágio de lactação afetaram algumas das características físicas do leite, como a densidade cujo valor foi maior para o segundo estágio de lactação e da acidez, que diminuiu, crioscopia e estabilidade ao álcool que aumentaram para as vacas subnutridas. A instabilidade ocorreu mesmo com acidez normal, caracterizando o quadro de leite instável não ácido (LINA). A adequação da dieta reverteu a instabilidade para 50% dos animais. A subnutrição não afetou a estabilidade térmica do leite, mas elevou a instabilidade ao álcool, o que pode acarretar falhas na detecção de problemas na qualidade do leite, com injusta penalização dos produtores.

As características microbiológicas do leite não foram afetadas pelo nível de oferta da dieta, pela ordem ou pelo estágio de lactação, com exceção da CCS, cujo valor foi maior no leite das vacas lactando por mais de 6 meses.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A prova do álcool, isoladamente, não é suficiente para avaliar a estabilidade térmica do leite, especialmente em altas temperaturas, como as utilizadas no processo UHT. Entretanto, pela facilidade, rapidez e baixo custo, tem sido bastante útil para classificar o leite em pelo menos dois grupos: ácidos ou mamíticos e outros.

São necessárias mais pesquisas para determinar as verdadeiras causas da instabilidade etílica e térmica do leite e qual a correlação entre elas, buscando:

a - Viabilizar outros testes que possam avaliar de forma mais ampla a qualidade do leite, mas que ao mesmo tempo sejam rápidos, facilmente executáveis e economicamente viáveis.

b - Capacitar o setor produtivo a nutrir, manter a sanidade e manejar adequadamente os rebanhos leiteiros, a fim de que produzam leite higiênico e nutritivo que atenda, ao mesmo tempo, as normas legais, as necessidades industriais e as exigências mercadológicas internacionais.

Alimentando adequadamente as matrizes leiteiras está-se combatendo uma das principais causas da ocorrência de leite instável, tornando a atividade mais rentável e competitiva, com reflexos positivos em toda a cadeia do leite. A provisão de alimentos volumosos conservados suficientes



para suprir pelo menos 50% das necessidades nutricionais do rebanho leiteiro, no mínimo 12 meses adiante, é decisivo para eliminar ou, pelo menos, minimizar a subnutrição dos animais nos meses mais críticos do ano. Volumoso conservado de boa qualidade, em quantidades compatíveis com as necessidades do rebanho e as imposições climáticas, deve ser a primeira medida dos produtores para melhorar a qualidade do leite e eliminar a ocorrência de leite instável em suas propriedades. Sem esta providência, não será possível manter a rentabilidade, a competitividade e a permanência da granja leiteira no exigente mercado globalizado.

Finalmente, ressalta-se o fundamental engajamento das instituições de pesquisa e das autoridades competentes na elaboração e divulgação de diretrizes e práticas de produção, concomitante a estratégias e sistemas de informação para as indústrias, cooperativas e organizações de produtores.

A Instrução Normativa 51 (MAPA, 2002) exige que o leite seja estável ao álcool 72. Contudo, os animais que tiveram déficit nutricional de 40%, produziram leite com estabilidade insuficiente para atender esta exigência legal. E quando ocorre déficit nutricional mais severo, envolvendo todo o rebanho e por longos períodos, que tipo de leite estará sendo produzido?

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, Y. M. et al. Calidad de leche: alimentación y rendimiento de sólidos. In: JORNADA DE LECHERÍA. Estanzuela, Uruguay: INIA, 2002. p. 46-57. (Serie Actividades de Difusión, 287).

ANEMA, S. G.; KLOSTERMEYER, H. Heat-induced, pH-dependent dissociation of casein micelle on heating reconstituted skim milk at temperature below 100 °C. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, p. 1108-1115, 1997.

ANEMA, S. G.; LI, Y. Association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk and its effect on casein micelle size. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 70, n.1, p. 73-83, 2003.

ARMSTRONG, D. V. Symposium: Nutrition and heat stress. Heat stress interaction with shade cooling. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 7, p. 2044-2050, 1994.

AULDIST, M. J. et al. Changes in the composition of milk from healthy and mastitic dairy cows during the lactation cycle. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 35, p. 427-436, 1995.

AULDIST, M. J.; HUBBLE, I. B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. **The Australian Journal of Dairy Technology**, Melbourne v. 53, p. 28-36, 1998.

AULDIST, M. J. et al. Effects of pasture allowance on the yield and composition of milk from cows of different  $\beta$ -lactoglobulin phenotypes. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 83, n. 9, p. 2069-2074, 2000.

BALBINOTTI, M. et al. Incidência do leite instável não ácido (LINA) na Região Sul do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO PAN-AMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DA MASTITE, 2., 2002, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto, 2002.

BANSAL, B.; CHEN, X. D. A critical review of milk fouling in heat exchangers. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 5, n. 2, p. 27-33, 2006.

BARBOSA, R. S. et al. Efeitos dos horários de medida, do estágio de lactação e do leite instável não ácido (LINA) sobre alguns atributos físicos do leite bovino – parte 2. In: CONGRESSO PAN-AMERICANO DE LEITE, 9., 2006, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre, 2006, p. 205-208.

BARROS, L. et al. Ionic calcium related to alcohol test in milk. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PRODUCTION DISEASES IN FARM ANIMALS, 10., 1998, Utrecht. **Abstracts...** Utrecht, 1998, p. 144.

BARROS, L. et al. Variaciones de la leche e prueba del alcohol. In: URUGUAYAN BUIATRICS JOURNEY, 28., Punta del Este. **Abstracts...** Punta del Este, 2000. p. 132.

BARROS, L. Transtornos metabólicos que afetam a qualidade do leite. In: **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**, Porto Alegre: UFRGS, 2001, p. 46-58.

BARROS, L. Problemas de calidad de leche asociados a la alimentación. In: JORNADA DE LECHERÍA. INIA, 2002a. Estanzuela, Uruguay, 2002, p. 58-69 (Serie Actividades de Difusión, 287).

BARROS, L. Transtornos metabólicos que podem ser detectados por meio do leite. In: **Avaliação metabólico-nutricional de vacas leiteiras por meio de fluidos corporais (sangue, leite, urina)**, Porto Alegre: UFRGS, 2002b, p. 27-39.

BARROS, L. Ionized calcium as responsible of stability of milk. In: CONGRESSO PAN-AMERICANO DE LEITE, 9., 2006, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre, 2006, p. 427.

BERNABUCCI, U. et al. Effects of the hot season on milk protein fractions in Holstein cows. **Animal Research**, Les Ulis, v. 51, p. 25-33, 2002.

BLOOMFIELD, V. A.; MEAD, R. J. J. Structure and stability of casein micelles. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 58, n. 4, p. 592-601, 1975.

BOVENHUIS, H. et al. Association between milk protein polymorphisms and milk production traits. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 75, n. 9, p. 2549-2559, 1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Laboratório nacional de referência animal (LANARA). **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes II: Métodos físico-químicos**. Brasília, 1981.

CAMPOS, R. et al. Indicadores do ambiente ruminal e suas relações com a composição do leite e células somáticas em diferentes períodos da primeira fase da lactação em vacas de alta produção. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.

36, n. 2, p. 525-530, 2006.

CAPUCO, A. V. et al. Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during a bovine lactation: relation to milk production and effect of bST. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 84, n. 10, p. 2177-2187, 2001a.

CAPUCO, A. V. et al. Effect of somatotropin on thyroid hormones and cytokines in lactating dairy cows ad libitum and restricted feed intake. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 84, n.11, p. 2430-2439, 2001b.

CARVALHO, G. R.; OLIVEIRA, A. F. Conjuntura agropecuária. Leite e derivados - Set/2006. Embrapa gado de leite; Embrapa monitoramento por satélite. Disponível em: <<http://www.cnpem.br/conjuntura/>>. Acesso em: 29 out. 2006.

CHASE, L. E.; OVERTON, T. R. Feeding strategies to optimize milk protein. Disponível em: <[www.ansci.cornell.edu/tmplobs/doc138.pdf](http://www.ansci.cornell.edu/tmplobs/doc138.pdf)>. Acesso em: 10 set. 2006.

CHAVEZ, M. S. et al. Bovine milk composition parameters affecting the ethanol stability. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 71, n. 1, p. 1-6, 2004.

COSTA, F. F. et al. Influência da temperatura no teste de estabilidade do leite frente ao etanol. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 154-156, 2004.

COTRINO, V.; GAVIRIA, B. C. Cómo se determina la calidad microbiológica de la leche cruda. LTV Ltda, Bogotá – Colombia, 2003. Disponível em: <<http://www.lmvltda.com/programas/ar05.html#top>>. Acesso em: 31 ago. 2006.

CREAMER, L. K. et al. Micelle stability:  $\kappa$ -casein structure and function. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 81, n. 11, p. 3004-3012, 1998.

DARLING, D. F. Heat Stability of Milk. **Journal of dairy research**, Cambridge, v. 47, n. 2, p. 199-210, 1980.

DAVIES, D. T.; WHITE, J. C. D. The relation between the chemical composition of milk and the stability of the caseinate complex. II. Coagulation by ethanol. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 25, p. 256-266, 1958.

FISCHER, V. et al. Ocorrência e caracterização do leite instável não-ácido (LINA) e sua variação entre os meses na Região Sul do Rio Grande do Sul "1". In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004a. Campo Grande, **Anais...** Campo Grande, 2004a.

FISCHER, V. et al. Variação sazonal e composição do leite instável não-ácido (LINA) na Região de Panambi. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004b. Campo Grande, **Anais...** Campo

Grande, 2004b.

FISCHER, V. Incidência, caracterização, quadro experimental e tratamento do leite instável não ácido (LINA) no RS. In: **Relatório técnico final das atividades desenvolvidas relativas ao projeto 474974/2003-0**. Porto Alegre, 2005. 70p.

FISCHER, V. et al. Chemical composition of unstable non-acid milk. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON THE BIOLOGY OF LACTATION FARM ANIMALS. **Revista de Ciências Veterinárias**, Pirassununga, v. 4, n. 4, s.1, p. 52, 2006a.

FISCHER, V. et al. Blood chemical composition of cows producing unstable non-acid milk. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON THE BIOLOGY OF LACTATION FARM ANIMALS. **Revista de Ciências Veterinárias**, Pirassununga, v. 4, n. 4, s.1, p. 53, 2006b.

FONSECA, A. F. **Fisiologia da lactação**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa: Imprensa Universitária, 1993. 137 p.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). The statistics division. Major food and agricultural commodities and producers, 2006. Disponível em: <<http://www.fao.org/es/ess/top/country.html>>. Acesso em: 28 out. 2006.

FOX, P. F. Heat-induced changes in milk preceding coagulation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 64, n. 11, p. 2127-2137, 1981a.

FOX, P. F. Proteinases in dairy technology. **Netherlands Milk Dairy Journal**, Wageningen, v. 35, p. 233-353, 1981b.

FOX, P. F.; MORRISSEY, P. A. Reviews of the progress of dairy science: the heat stability of milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 44, n.3, p. 627-646, 1977.

GAUCHERON, F. The minerals of milk. **Reproduction Nutrition Development**, Rennes, v. 45, p. 473-483, 2005.

GOFF, D. Dairy science and technology. University of Guelph. Canadá, 1995. Disponível em: <<http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/home.html>>. Acesso em: 18 out. 2005.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**: UFRGS, 2003, 198 p.

GONZALEZ, H. L. **Qualidade do leite em diferentes sistemas de produção e meses do ano na bacia leiteira de Pelotas**, 2002. 120 f. Tese (Mestrado em Produção Animal)-Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade

Federal de Pelotas, Pelotas, 2002.

GUSTAFSSON, A. H.; PALMQUIST, D. L. Diurnal variation of rumen ammonia, serum urea, and milk urea in dairy cows at high and low yields. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 2, p 475-484. 1993.

HARRIS, B.; BACHMAN, K. C. Nutritional and management factors affecting solids-non-fat, acidity and freezing point of milk. Institute of food and agricultural sciences. Extension – DS25. University of Florida, 2003. Disponível em: <[http://www.animal.ufl.edu/Dairy/Pubs/dairy\\_pubs.htm](http://www.animal.ufl.edu/Dairy/Pubs/dairy_pubs.htm)>. Acesso em: 03 maio 2006.

HEINRICHS, J. et al. Milk components: Understanding the causes and importance of milk fat and protein variation in your dairy herd. Disponível em: <<http://www.das.psu.edu/dairynutrition/documents/milkcomp0597.pdf>>. Acesso em: 30 set. 2006.

HIGGINSON, A. M. et al. Changes in plasmin-plasminogen-plasminogen activator system in Milk from Italian Friesian Herds. **International Dairy Journal**, Barking, v. 6, n. 11, p. 1045-1053, 1996.

HOLT, C.; MUIR, D. D. Inorganic constituents of milk: I. Correlation of soluble calcium with citrate in bovine milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 46, n. 3, p. 433-439, 1979.

HOLT, C. An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein micelles and its application to the calculation of the partition of salts in milk. **European Biophysics Journal**, Heidelberg, v. 33, p. 421-434, 2004.

HORNE, D. S.; MUIR, D. D. Alcohol and heat stability of milk protein. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, n. 12, p. 3613-3626, 1990.

HORNE, D. S.; PARKER, T. G. Factors affecting the ethanol stability of bovine milk: Effect of serum phase components. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 48, n. 2, p. 273-284, 1981a.

HORNE, D. S.; PARKER, T. G. Factors affecting the ethanol stability of bovine milk: The origin of the pH transition. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 48, n. 2, p. 285-291, 1981b.

HORNE, D. S.; PARKER, T. G. Factors affecting the ethanol stability of bovine milk: Effect of forewarming. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 48, n.3, p. 405-415, 1981c.

HORNE, D. S.; PARKER, T. G. Factors affecting the ethanol stability of bovine milk V. Effects of chemical modification of milk protein. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 49, 3, p. 449-457, 1982.

HORNE, D. S.; PARKER, T. G. Factors affecting the ethanol stability of bovine skim-milk: Effect of concentration. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 50, n. 4, p. 425-432, 1983.

HORNE, D. S. Ethanol stability of casein micelles a hypothesis concerning the role of calcium phosphate. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 54, n. 3, p. 389-395, 1987.

HURLEY, W. L. Milk Composition; Synthesis: Physicochemical properties. Resource Library. University of Illinois, 2006. Disponível em: <<http://classes.aces.uiuc.edu/AnSci308/Milkcompsynth/milkcompsynthresources.html>>. Acesso em: 03 nov. 2006.

JONES, G. M.; STALLINGS, C. C. Reducing heat stress for dairy cattle, 1999. Disponível em: <<http://www.ext.vt.edu/pubs/dairy/404-200/404-200.html>>. Acesso em: 02 jan. 2007.

JONES, G. M. Milking practices recommended to assure milk quality and prevent mastitis. Virginia Polytechnic Institute and State University. **Virginia Tech**, Virginia, n. 404-227, 1998.

KAY, J. K. et al. Effects of week of lactation and genetic selection for milk yield on milk fatty acid composition in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 88, n. 11, p. 3886-3893, 2005.

LACY-HULBERT, S. J. et al. Effect of milking frequency and pasture intake on milk yield and composition of late lactation cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 82, n. 6, p. 1232-1239, 1999.

LA MANNA, A. et al. Alimentación y urea em leche: aspectos nutricionales, reproductivos y ambientales. In: JORNADA DE LECHERÍA. INIA, Estanzuela, Uruguay, 2002, p. 69-74. (Serie Actividades de Difusión, 287).

LE GRAËT, Y.; GAUCHERON, F. pH-induced of minerals from casein micelles: influence of casein concentration and ionic strength. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 66, n. 2, p. 215-224, 1999.

LIN, M. J. et al. Effect of pH on the calcium movement in milk between colloidal and Ionic phases. In: WORLD CONFERENCE ON ANIMAL PRODUCTION, 9., and REUNIÃO DA ASSOCIAÇÃO LATINO-AMERICANA DE PRODUÇÃO ANIMAL, 18., Porto Alegre, **Anais...** Porto Alegre: ALPA, 2003.

LIN, M. J. et al. Measurement of ionic calcium in milk. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 59, n. 3, 2006.

LINN, J. G. Nutritional management of lactating dairy cows during periods of heat stress. University of Minnesota, 1997. Disponível em:

<<http://www.ansci.umn.edu/dairy/dairyupdates/du125.htm>>. Acesso em: 16 out. 2006.

LOPES, J. C. et al. Efeito da fase e ordem da lactação sobre o teor em caseína no leite de vaca. Escola Superior Agrária de Ponte de Lima. Disponível em: <[http://www.dcam.upv.es/acteon/CONGRESOS/Aida2001/docs/artigo\\_caseina1.PDF](http://www.dcam.upv.es/acteon/CONGRESOS/Aida2001/docs/artigo_caseina1.PDF)>. Acesso em: 30 out. 2006.

MACKLE, T. R. et al. Nutritional Influences on the composition of milk from cows of different protein phenotypes in New Zealand. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 82, n.1, p.172-180, 1999.

MARQUES, L. T. **Ocorrência do leite instável não ácido (LINA) e seu efeito sobre a composição química, aspectos físicos e microbiológicos do leite**, 2004. 66 f. Tese (Mestrado em Produção Animal)- Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.

MARQUES, L. T. et al. Efeito da dieta aniônica sobre a ocorrência do leite instável não ácido (LINA). In: CONGRESSO PAN-AMERICANO DE LEITE, 9., 2006, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre, 2006, p. 229-232.

MENDOZA, A. et al. Efecto de la suplementación con semilla de girasol entera sobre la producción, composición y estabilidad térmica de leche de vacas en pastoreo. In: CONGRESSO PAN-AMERICANO DE LEITE, 9., 2006, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre, 2006, p. 19-22.

MERTENS, D. R. Predicting intake and digestibility using mathematical models of ruminal function. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 64, n. 7, p. 1548-1558, 1987.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Instrução Normativa N. 51**. Brasília, 2002.

MOLINA et al. Correlación entre la termoestabilidad y prueba de alcohol de la leche a nivel de un centro de acopio lechero. **Archivos de Medicina Veterinaria**, Valdivia, v. 33 n. 2, 2001.

MORRISON, F. B. **Alimentos e alimentação dos animais**, 2. ed. Rio de Janeiro: Melhoramentos, 1966. 892 p.

MÜHLBACH, P. R. F. A Produção de leite em ambiente ameno. Opções forrageiras como alternativa de produção de energia alimentar no inverno. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO DE BOVINOS LEITEIROS, 2000, Carambei. **Anais...** Carambei: Fundação ABC, 2000, p 11-21.

MÜHLBACH, P. R. F. Nutrição da vaca em lactação e a qualidade do leite. In: SIMPÓSIO DE BOVINOCULTURA DE LEITE, 2003, Chapecó. **Anais...**



Chapecó-SC, 2003, p. 25-43.

MUSTAFA, A. Factors Affecting Milk Yield. Dairy Production 342-450A. McGill University. Department of Animal Science. Montreal. Disponível em: <<http://animsci.agrenv.mcgill.ca/courses/450/>>. Acesso em: 10 out. 2006.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). Board on Agricultural and Nature Resource. Committee on Animal Nutrition, Washington, D.C., 2000. Software, 1 CD-ROM.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7. ed. National Academy Press, Washington, D.C., 2001. 381 p.

NEGRI, L. M. et al. The effect of silo milk composition parameters on heat stability of whole milk powder. **Food Science Technology Institute**, London, v. 10, n. 6, p. 415-420, 2004.

NEGRI, L. M. **Estudio de los factores fisicoquímicos de la leche cruda que Inciden sobre la estabilidad térmica**. 2002. 180 f. Tese (Magister em Ciencia y Tecnologia de los Alimentos). Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional Del Litoral, Santa Fe, 2002.

NG-KWAI-HANG, K. F. et al. Environmental influences on protein content and composition of bovine milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 65, n. 10, p. 1993-1998, 1982.

NG-KWAI-HANG, K. F. et al. Variability of test-day production and composition and relation of somatic cell counts with yield and compositional changes of bovine milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 67, n. 2, p. 361-366, 1984.

O'CONNELL, J. E.; FOX P. F. Effect of  $\beta$ -lactoglobulin and precipitation of calcium phosphate on the thermal coagulation of milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 68, n. 1, p. 81-94, 2001.

O'MAHONY, F. Rural dairy technology. Experiences in Ethiopia. Disponível em: <[http://www.ilri.cgiar.org/InfoServ/Webpub/Fulldocs/ILCA\\_Manual4/Toc.htm](http://www.ilri.cgiar.org/InfoServ/Webpub/Fulldocs/ILCA_Manual4/Toc.htm)>. Acesso em: 04 set. 2006.

OSTERSEN, S. et al. Effects of stage of lactation, milk protein genotype and condition at calving on protein composition and renneting properties of bovine milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 64, n. 2, p. 207-249, 1997.

O'SULLIVAN, M. M. et al. Short communication: Influence of transglutaminase on the heat stability of milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 84, n. 6, p. 1331-1334, 2001.

PAEZ, R. et al. Estudio de la estabilidad térmica y al alcohol durante los días

pos-parto em leite cruda de vaca. In: CONGRESSO PAN-AMERICANO DE LEITE, 9., 2006, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre, 2006, p. 67-70.

PEREIRA, A. R. et al. Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite I-gordura e proteína. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, São Paulo, v. 36, n. 3, 1999.

PERES, J. R. O leite como ferramenta do monitoramento nutricional. In: **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**: UFRGS, Porto Alegre, 2001, p. 30-45.

PHILIPPE, M. et al. Physicochemical characterization of calcium-supplemented skim milk. **Lait**, Le Ulis, v. 83, p. 45-59, 2003.

PONCE, P. C.; HERNÁNDEZ, R. Propriedades físico-químicas do leite e sua associação com transtornos metabólicos e alterações na glândula mamária. In: **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**: UFRGS, Porto Alegre, 2001, p. 61-72.

PONCE, P. C.; HERNÁNDEZ, R. Efecto de tres tipos de dieta sobre la aparición de trastornos metabólicos y su relación con alteraciones en la composición de la leche en vacas Holstein Friesian. **Zootecnia Tropical**, Maracay, v. 23, n. 3, p. 295-310, 2005.

PRADA e SILVA, L. F. et al. Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite II - lactose e sólidos totais. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, São Paulo, v. 37, n. 4, 2000.

ROCHE, J.; DALLEY, D. Nutrition and milk composition. In: Agriculture notes, AGO534, ISSN 1329-8062, 1996. Disponível em: <<http://www.dse.vic.gov.au/dpi/nreninf.nsf/displayerror?readform&message=unexpected%20access>>. Acesso em: 03 maio 2006.

ROSE, D. Variations in the heat stability and composition of milk from individual cows during lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 44, n. 3, p. 430-441, 1961a.

ROSE, D. Factors affecting the pH-sensitivity of the heat stability of milk from individual cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 44, n. 8, p. 1405-1413, 1961b.

ROSE, D. Factors affecting the heat stability of milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 45, n. 11, p. 1305-1311, 1962.

SÁ, J. C. et al. Comparação entre a morfofisiologia do úbere de vacas primíparas e multíparas. Resumo. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo. Disponível em: <<http://www.usp.br/siicusp/13osiicusp/aprovados/ficha1866.htm>>. Acesso em:

30 dez. 2006.

SALAÜAN, F. et al. Buffering Capacity of dairy products. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, p. 95-109, 2005.

SANTOS, M. V. A estação do ano e o estresse térmico influenciam a CCS dos rebanhos leiteiros? MilkPoint, set. 2001. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/pop/noticia.asp?noticialD=16198&secaoID=180>>. Acesso em: 19 set. 2006.

SCHROEDER, J. W. Feeding for milk components and profit. 1996. NDSU Extension Service, North Dakota State University. Disponível em: <[www.ag.ndsu.edu/pubs/ansci/dairy/as1118.pdf](http://www.ag.ndsu.edu/pubs/ansci/dairy/as1118.pdf)>. Acesso em: 01 nov. 2006.

SHAMAY, A. et al. Infusions of casein hydrolyzates into the mammary gland disrupt tight junction integrity and induce involution in cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 86, n. 4, p. 1250-1258, 2003.

SHUSTER, D. E. et al. Suppression of milk production during endotoxin-induced mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 11, p. 3763-3774, 1991.

SILANIKOVE, N. et al. Stress down regulates milk yield in cows by plasmin induced  $\beta$ -casein product that blocks  $K^+$  channels on the apical membranes. **Life Sciences**, Elmsford, v. 67, p. 2201-2212, 2000.

SILVA, P. H. F. Leite: aspectos de composição e propriedades. **Química Nova na Escola**, São Paulo, n. 6, nov. 1997.

SILVA, P. H. F.; ALMEIDA, M. C. F. Estabilidade térmica do leite. Artigo PH1-1. 8 p. Atrius. Disponível em: <<http://www.atruius.com.br/download.html>>. Acesso em: 10 nov. 2005.

SINGH, H.; FOX, P. F. Heat stability of milk: further studies on the pH-dependent dissociation of micellar  $\kappa$ -casein. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 53, n. 2, p. 237-248, 1986.

SINGH, H.; FOX, P. F. Heat stability of milk: role of  $\beta$ -lactoglobulin in the pH-dependent dissociation of micellar  $\kappa$ -casein. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 54, n. 4, p. 509-521, 1987a.

SINGH, H.; FOX, P. F. Heat stability of milk: Influence of colloidal and soluble salts and protein modification on the pH-dependent dissociation of micellar  $\kappa$ -casein. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 54, n. 4, p. 523-534, 1987b.

SINGH, H. Heat stability of milk. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 57, n. 2/3, p. 111-119, 2004.

STANLEI, I. K. O fenômeno da hidratação e os eletrólitos: a definição de ácidos, bases e sais segundo Svante Arrhenius. Disponível em: <<http://inorgan221.iq.unesp.br/quimgeral/respostas/eletrolitos.html>>. Acesso em: 02 dez. 2006.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM (SAS). User' guide, version 5. 4. ed. Cary, Carolina do Norte, EUA: SAS, 1989.

TEIXEIRA, N. M. et al. Influência de fatores de meio ambiente na variação mensal da composição e contagem de células somáticas do leite em rebanhos no Estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 4, 2003.

TONELLI, L. B. P. A. et al. Relação entre contagem de células somáticas e porcentagem de gordura, proteína e lactose em leite de vacas. In: CONGRESSO PAN-AMERICANO DE LEITE, 9., 2006, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre, 2006, p. 307-309.

UNIVERSAL BRASIL. Qualidade do leite: conceitos básicos de higiene. Disponível em: <<http://www.universalbrasil.com.br/qualidade.htm>>. Acesso em: 20 dez. 2006.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca, New York: Cornell University, 1994, 476 p.

VASBINDER, A. J. et al. Gelation mechanism of milk as influenced by temperature and pH; studied by the use of trasglutaminase cross-linked casein micelles. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 86, n. 5, p. 1556-1563, 2003.

VELOSO, C. R. V. Noções básicas da acidez. In: **A qualidade do leite**, 1998, Juiz de Fora. BRITO J. R. F.; DIAS, J. C. (Eds), São Paulo: Tortuga, 1998, p. 91-98.

VIRKAJÄRVI, P. et al. Effect of herbage allowance on pasture utilization, regrowth and milk yield of dairy cows in early, mild and late season. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 97, p. 23-40, 2002.

VISSER, J. et al. The role of calcium, phosphate and citrate ions in the stabilization of casein micelles. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 46, n. 2, p. 333-335, 1979.

WALDNER, D. N. et al. Managing milk composition: normal sources of variation. Disponível em: <[http://www.osuextra.okstate.edu/pdfs/F-4016\\_web.pdf](http://www.osuextra.okstate.edu/pdfs/F-4016_web.pdf)>. Acesso em: 30 set. 2006.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Química y física lactológica**. Zaragoza: 1984, 422p.

WALSTRA, P. On the stability of casein micelles. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, n. 8, p. 1965-1979, 1990.

WALSTRA, P. Casein sub-micelles: do they exist? **International Dairy Journal**, Barking, v. 9, p. 189-192, 1999.

WEBB, B. H.; HOLM, G. E. The heat coagulation of milk, II. The influence of various added salts upon the heat stability of milk of different concentrations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 15, p. 345-366, 1932.

WIELGOSZ-GROTH, Z.; GROTH, I. Effect of the udder on the composition and quality of quarter milk from black-and-white cows. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, Szczecin, v. 6, n. 2, 2003.

WILDMAN, E. E. et al. A dairy condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 65, n. 3, p. 495-501, 1982.

WILLIAMS, R. pK data values. 33 p. Disponível em: <[research.chem.psu.edu/brpgroup/pKa\\_compilation.pdf](http://research.chem.psu.edu/brpgroup/pKa_compilation.pdf)>. Acesso em: 18 out. 2006.

YOUNG, A. Milk urea nitrogen test (MUN). USU, dec 2001. Disponível em: <[http://extension.usu.edu/files/publications/publication/AG\\_Dairy-01.pdf](http://extension.usu.edu/files/publications/publication/AG_Dairy-01.pdf)>. Acesso em: 14 jun. 2006.

ZANELA, M. B. **Caracterização do leite produzido no Rio Grande do Sul, ocorrência e indução experimental do leite instável não ácido (LINA)**, 2004. 175 f. Tese (Doutorado em Produção Animal)- Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.

ZANELA, M. B. et al. Indução e reversão do leite instável não ácido (LINA). In: CONGRESSO PAN-AMERICANO DE LEITE, 9., 2006, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre, 2006, p. 439-442.

ZETA-METER, INC. Potencial zeta: Un curso em cinco minutos. Disponível em: <[www.zeta-meter.com/redchile.pdf](http://www.zeta-meter.com/redchile.pdf)>. Acesso em: 03 jan. 2007.

## 8. APÊNDICES

Apêndice 1. Dados pré-experimentais referentes aos animais utilizados no experimento: escore de condição corporal (ECC), peso corporal (PC), produção de leite (PL), estágio de lactação (EL) e ordem de lactação (OL)

Vaca	ECC (1-5)	PC (kg)	PL (kg/dia)	EL (dias)	OL (1-4)
Grupo CS					
72	2,00	540	24,2	40	4
70	3,50	550	18,1	116	1
15	2,50	480	20,6	145	1
124	2,50	600	18,0	237	4
121	3,00	430	23,1	93	2
90	4,00	570	18,2	132	3
Média	2,92	528	20,4	127	2,5
Grupo SC					
28	2,50	490	29,1	86	2
53 <sup>1</sup>	3,50	510	10,7	302	4
38	2,75	450	17,1	156	1
122	3,00	410	16,6	182	1
41 <sup>1</sup>	3,75	540	10,2	495	1
71	2,50	470	8,5	266	1
Média	3,00	478	15,4	248	1,7

Todos os dados referentes às vacas 53 e 41 foram excluídos das análises estatísticas<sup>1</sup>;  
Grupo CS: No primeiro período, os animais receberam 100% das necessidades nutricionais, de acordo com as recomendações do NRC (2001);  
Grupo SC: No primeiro período, os animais receberam 60% das necessidades nutricionais, de acordo com as recomendações do NRC (2001);  
No segundo período, as dietas foram invertidas.

Apêndice 2. Estimativas do consumo máximo de matéria seca, utilizando o modelo de Mertens: consumo de FDN (kg/dia) = 1,2% do peso vivo

Discriminação	Un	Primeiro período		Segundo período	
		T100	T60	T100	T60
Peso vivo médio dos animais	kg	528	478	478	528
FDN, consumo máximo	% PV	1.20	1.20	1.20	1.20
	kg/dia	6.34	5.74	5.74	6.34
FDN, outros alimentos	kg/dia	2.32	1.00	2.32	1.00
FDN, saldo	kg/dia	4.02	4.74	3.42	5.34
FDN, média da forrageira	%	71.73	76.03	62.23	65.08
Consumo máximo, forrageira	kg MS/dia	5.60	6.23	5.49	8.20
Consumo, outros alimentos	kg MS/dia	8.29	3.25	8.29	3.25
Consumo total	kg MS/dia	13.90	9.48	13.79	11.45
	% PV	2.63	1.98	2.88	2.17

Apêndice 3. Balanço nutricional, de acordo com o modelo de Mertens (1987) e NRC (2001)

Grupo	Discriminação	NEI	PB	Ca	P	K
		Mcal/dia		g/dia		
Primeiro período						
T100	Necessidade	22,8	1324	42	34	139
	Suprido	23,2	1371	59	36	172
	Saldo	0,4	47	17	3	36
T60	Necessidade	19,7	1065	34	24	101
	Suprido	14,3	673	36	19	167
	Saldo	-5,4	-392	2	-5	66
Segundo período						
T100	Necessidade	19,7	1176	34	29	127
	Suprido	21,4	1335	56	32	141
	Saldo	1,7	159	22	4	14
T60	Necessidade	22,8	1282	42	31	121
	Suprido	14,6	762	38	19	120
	Saldo	-8,1	-520	-4	-12	-2

## Apêndice 4. Precipitação pluviométrica (ppt) entre 30/12/05 e 24/02/06 (mm)

	Dez					Jan					Fev						
Data	31	01	02	08	13	21	22	23	24	27	P1	5	7	14	22	P2	Tot
ppt	40	50	42	5	2	30	6	5	10	8	198	22	12	18	42	94	292

P1: precipitação total do primeiro período. P2: precipitação total do segundo período

Fonte: EMATER/Campinas do Sul, informação pessoal.

## Apêndice 5. Composição bromatológica do capim-bermuda variedade Tifton

Componente	NDT	MS	FDN	FDA	PB	Ca	P	Mg	K	DMSE	ElI	Elm
	%											Mcal/kg
Primeiro período												
Oferta de 8%												
Folha	64.88	29.01	71.09	32.80	15.48	0.38	0.30	0.25	2.13	63.35	1.48	1.59
Haste	60.87	27.87	72.64	38.53	9.85	0.42	0.22	0.23	1.66	58.89	1.37	1.48
M. morta	51.95	62.67	80.19	51.13	5.18	0.34	0.12	0.16	0.56	48.96	1.16	1.22
Média (f+h)	63.51	28.55	71.73	34.77	13.50	0.39	0.27	0.24	1.97	61.82	1.44	1.55
Média (f+h+mm)	61.40	34.93	73.27	37.74	11.83	0.38	0.24	0.22	1.71	59.47	1.39	1.49
Oferta de 4%												
Folha	65.37	27.87	72.96	32.09	13.52	0.41	0.30	0.25	2.22	63.90	1.49	1.61
Haste	60.70	28.61	76.00	38.77	9.29	0.46	0.19	0.23	1.65	58.70	1.37	1.47
M. morta	51.79	60.22	82.70	51.50	5.06	0.33	0.11	0.16	3.44	48.78	1.15	1.21
Média (f+h)	63.54	28.23	74.15	34.71	12.07	0.43	0.25	0.24	2.00	61.86	1.44	1.56
Média (f+h+mm)	60.86	35.13	76.03	38.54	10.48	0.41	0.22	0.22	2.54	58.88	1.38	1.48
Segundo período												
Oferta de 8%												
Tifton, f	55.36	27.98	62.30	31.10	14.77	0.27	0.21	0.14	1.58	56.29	1.16	1.25
Tifton, h	49.19	25.60	62.10	33.14	8.68	0.36	0.10	0.19	1.00	57.58	1.11	1.18
Tifton, mm	41.42	62.05	68.11	35.78	4.62	0.36	0.06	0.09	0.05	52.06	0.93	0.98
Média (f+h)	53.09	27.11	62.23	31.85	12.53	0.30	0.17	0.16	1.37	56.76	1.14	1.22
Média (f+h+mm)	49.37	38.27	64.11	33.10	10.01	0.32	0.13	0.14	0.95	55.26	1.07	1.15
Oferta de 4%												
Tifton, f	56.70	26.37	63.30	26.28	14.99	0.37	0.23	0.20	2.18	64.95	1.29	1.40
Tifton, h	48.95	28.60	63.26	34.86	5.88	0.34	0.13	0.15	0.92	56.45	1.10	1.18
Tifton, mm	42.09	52.11	69.70	34.20	4.50	0.28	0.08	0.13	0.36	55.81	1.05	1.13
Média (f+h)	53.50	27.29	63.28	29.82	11.23	0.36	0.19	0.18	1.66	61.44	1.21	1.31
Média (f+h+mm)	50.30	34.25	65.08	31.05	9.34	0.34	0.16	0.17	1.30	59.86	1.17	1.26

MS: Matéria seca, PB: Proteína bruta, FDN: Fibra em detergente neutro, FDA: Fibra em detergente ácido, NDT: Nutrientes digestíveis totais, ElI: Energia líquida de lactação, Elm: Energia líquida de manutenção, DMSE: Digestibilidade da matéria seca, estimada.



Apêndice 6. Composição florística da área da pastagem durante os dois períodos experimentais, conforme os níveis de oferta de pasto

Período	Alta oferta de pasto (%MS)			Baixa oferta de pasto (%MS)		
	Tifton	OG	DI	Tifton	OG	DI
Primeiro	93,31	0,46	6,23	92,42	2,85	4,73
Segundo	89,69	3,10	7,21	89,13	3,64	7,23

OG: Outras gramíneas. DI: Dicotiledôneas

Apêndice 7. Composição do feno, concentrados e sais minerais fornecidos aos animais durante o período experimental

Alimento	MS	PB	FDN	FDA	NDT	Ca	P	K	Mg	DMSE	EII	Elm	
	%											Mcal/kg	
Forragem conservada													
Feno, tifton	81,96	9,75	68,88	30,18	51,13	0,31	0,18	1,72	0,2	60,22	1,15	1,24	
Concentrados energéticos													
Milho, grão	88,12	9,25	13,54	3,99	88,04	0,04	0,26	0,37	0,10	-	2,17	-	
Cevada, grão	90,02	14,52	13,90	3,22	82,90	0,5	0,5	0,48	0,07	-	1,88	-	
Concentrados protéicos													
Soja, grão	90,06	40,02	18,84	13,04	86,08	0,30	0,54	2,02	0,18	-	2,53	-	
Soja, farelo	88,00	46,40	15,09	8,98	80,76	0,36	0,61	1,87	0,31	-	2,34	-	
Minerais													
Fonte	MS	Na	Ca	S	P	Mg	Co	Cu	I	Fe	Mn	Se	Zn
		% da MS						mg/kg					
Bovigold	100,0	48,0	23,0	15,0	9,0	2,0	100	700	80	2000	1250	20	2700
C. calcítico	100,0	0,01	34,0	-	-	2,0	-	-	-	-	-	-	-

MS: Matéria seca, PB: Proteína bruta, FDN: Fibra em detergente neutro, FDA: Fibra em detergente ácido, NDT: Nutrientes digestíveis totais, EII: Energia líquida de lactação, Elm: Energia líquida de manutenção, Cálcio, P: Fósforo, K: Potássio, Mg: Magnésio, DMSE: Digestibilidade da matéria seca, estimada

## Apêndice 8. Ajuste da carga animal

Discriminação	Primeiro período				Segundo período			
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>
T100								
MS disponível, kg/ha	4339	2450	3680	3840	5800	5420	5520	5240
Peso corporal, kg PV	3170	3170	3170	3170	2970	2970	2970	2970
MS necessária, kg MS/dia	254	254	254	254	238	238	238	238
Área necessária, m <sup>2</sup> /dia	584	1.035	689	660	410	438	430	453
T60								
MS disponível, kg/ha	2168	3040	4040	3120	5040	3660	5920	5700
Peso corporal, kg PV	2870	2870	2870	2870	3130	3130	3130	3130
MS necessária, kg MS/dia	115	115	115	115	125	125	125	125
Área necessária, m <sup>2</sup> /dia	530	378	284	368	248	342	211	220

MS: massa seca total, incluindo matéria morta (mm)

## Apêndice 9. Peso corporal (kg) e escore de condição corporal (1-5)

Vaca	30-dez		27-Jan		24-fev	
	Peso	Escore	Peso	Escore	Peso	Escore
Grupo CS (100 - 60% do NRC)						
72	540	2.00	520	1.50	530	1.50
70	550	3.50	520	3.00	550	3.50
15	480	2.50	480	2.50	490	2.50
124	600	2.50	580	2.50	460	2.25
121	430	3.00	420	3.00	450	3.00
90	570	4.00	580	3.50	550	3.50
Média	528	2.92	517	2.67	505	2.71
Grupo SC (60 - 100% do NRC)						
28	490	2.50	480	2.50	500	2.75
53 <sup>1</sup>	510	3.50	500	3.50	520	4.00
38	450	2.75	420	2.50	440	2.75
122	410	3.00	420	2.50	460	3.25
41 <sup>1</sup>	540	3.75	560	4.00	560	4.00
71	470	2.50	460	2.00	480	2.25
Média	478	3.00	473	2.83	493	3.17

<sup>1</sup>Dados excluídos da análise estatística

## Apêndice 10. Produção de leite (kg/dia)

Vaca	30-dez	6-jan	13-jan	20-jan	27-jan	3-fev	10-fev	17-fev	24-fev
	Pré-exp	T100				T60			
72	24.2	24.4	22.6	19.4	21.6	19.7	16.4	11.9	12.0
70	18.1	19.2	17.8	17.0	17.2	14.8	12.6	9.0	9.1
15	20.6	25.6	21.5	19.0	20.9	16.1	18.8	13.4	12.8
124	18.0	17.1	18.5	13.2	17.1	13.9	11.5	7.0	5.8
121	23.1	25.0	20.2	20.3	19.6	18.5	15.9	13.5	12.4
90	18.2	19.6	18.0	14.0	18.5	14.6	13.8	10.2	9.6
Média	20.4	21.8	19.8	17.2	19.2	16.3	14.8	10.8	10.3
Vaca	Pré-exp	T60				T100			
28	29.1	24.5	22.6	17.9	15.4	18.4	23.2	19.5	21.3
53	10.7	8.9	7.1	4.1	2.1	3.8	3.7	2.8	1.1
38	17.1	15.5	15.0	8.6	6.6	9.3	11.3	11.7	11.4
122	16.6	13.2	11.5	7.7	9.3	11.8	13.6	13.1	12.0
41	10.2	8.1	6.9	3.1	2.9	3.5	4.4	4.5	3.3
71	8.5	9.6	7.2	6.1	6.4	7.4	9.2	9.7	8.4
Média	15.4	13.3	11.7	7.9	7.1	9.0	10.9	10.2	9.6

## Apêndice 11. Acidez titulável (°D) do leite individual

Vaca	30-dez	6-jan	13-jan	20-jan	27-jan	3-fev	10-fev	17-fev	24-fev
		T100				T60			
72	16	15	16	16	17	14.	14	17	14
70	16	17	18	16	19	16	12	17	17
15	16	17	17	16	17	16	12	17	17
124	15	16	17	14	17	16	15	13	14
121	16	15	13	16	15	14	14	14	14
90	16	16	19	16	17	16	16	16	15
Média	15,8	16,0	16,7	15,7	17,0	15,3	13,7	15,7	15,2
Vaca	T60				T100				
28	14	15	15	15	13	14	15	16	16
53 <sup>1</sup>	19	15	14	13	12	16	13	13	14
38	18	17	19	17	17	17	18	17	18
122	17	16	16	16	16	17	16	18	17
41 <sup>1</sup>	16	15	20	20	17	16	16	17	17
71	17	17	17	16	16	17	17	18	18
Média	16,8	15,8	16,8	16,2	15,2	16,2	15,8	16,5	16,7

## Apêndice 12. Teste da fervura (100 ° C) para o leite individual

Data	Vaca											
	72	70	15	124	121	90	28	53 <sup>1</sup>	38	122	41 <sup>1</sup>	71
27-jan	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	P	N
24-fev	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N: negativo, P: positivo. <sup>1</sup>Dados excluídos da análise estatística

## Apêndice 13. Densidade do leite individual, corrigida para 15 °C (g/l)

## Primeiro período

Vaca	30-dez			6-jan			13-jan			20-jan			27-jan			
	T (°C)	Lida	Corrigida	T (°C)	Lida	Corrigida	T (°C)	Lida	Corrigida	T (°C)	Lida	Corrigida	T (°C)	Lida	Corrigida	
T100																
72	21	1.030	1.031,20	24	1.028	1.029,80	19	1.029	1.029,80	15	1.031	1.031,00	14	1.031	1.030,80	
70	19	1.029	1.029,80	24	1.028	1.029,80	17	1.031	1.031,40	17	1.031	1.031,40	19	1.032	1.032,80	
15	22	1.029	1.030,40	24	1.027	1.028,80	17	1.031	1.031,40	15	1.030	1.030,00	17	1.030	1.030,40	
124	22	1.028	1.029,40	24	1.027	1.028,80	20	1.031	1.032,00	15	1.031	1.031,00	17	1.032	1.032,40	
121	24	1.027	1.028,80	24	1.026	1.027,80	23	1.029	1.030,60	15	1.031	1.031,00	16	1.031	1.031,20	
90	24	1.026	1.027,80	25	1.027	1.029,00	24	1.028	1.029,80	14	1.031	1.030,80	14	1.029	1.028,80	
Média	22	1.028	1.029,57	24	1.027	1.029,00	20	1.030	1.030,83	15	1.031	1.030,87	16	1.031	1.031,07	
T60																
28	24	1.027	1.028,80	25	1.027	1.029,00	18	1.029	1.029,60	17	1.029	1.029,40	15	1.029	1.029,00	
53	24	1.030	1.031,80	23	1.030	1.031,60	18	1.033	1.033,60	17	1.034	1.034,40	15	1.035	1.035,00	
38	25	1.028	1.030,00	24	1.027	1.028,80	16	1.030	1.030,20	18	1.029	1.029,60	16	1.029	1.029,20	
122	25	1.027	1.029,00	24	1.027	1.028,80	17	1.029	1.029,40	16	1.029	1.029,20	15	1.030	1.030,00	
41	25	1.028	1.030,00	25	1.026	1.028,00	17	1.035	1.035,40	16	1.034	1.034,20	19	1.033	1.033,80	
71	25	1.029	1.031,00	26	1.028	1.030,20	18	1.029	1.029,60	14	1.030	1.029,80	17	1.031	1.031,40	
Média	25	1.028	1.030,10	25	1.028	1.029,40	17	1.031	1.031,30	16	1.031	1.031,10	16	1.031	1.031,40	

## Segundo período

Vaca	3-fev			10-fev			17-fev			24-fev		
	T (°C)	Lida	Corrigida	T (°C)	Lida	Corrigida	T (°C)	Lida	Corrigida	T (°C)	Lida	Corrigida
T60												
72	28	1.026	1.028,60	14	1.030	1.029,80	18	1.028	1.028,60	13	1.030	1.029,60
70	19	1.030	1.030,80	12	1.033	1.032,40	17	1.028	1.028,40	12	1.031	1.030,40
15	19	1.028	1.028,80	12	1.031	1.030,40	14	1.030	1.029,80	14	1.029	1.028,80
124	15	1.031	1.031,00	13	1.033	1.032,60	14	1.033	1.032,80	13	1.033	1.032,60
121	17	1.030	1.030,40	11	1.030	1.029,20	15	1.030	1.030,00	18	1.029	1.029,60
90	19	1.028	1.028,80	19	1.031	1.031,80	13	1.030	1.029,60	14	1.030	1.029,80
Média	20	1.029	1.029,73	14	1.031	1.031,03	15	1.030	1.029,87	14	1.030	1.030,13
T100												
28	16	1.029	1.029,20	13	1.031	1.030,60	17	1.030	1.030,40	12	1.031	1.030,40
53	19	1.033	1.033,80	12	1.035	1.034,40	15	1.033	1.033,00	12	1.036	1.035,40
38	19	1.029	1.029,80	12	1.030	1.029,40	13	1.030	1.029,60	11	1.031	1.030,20
122	16	1.032	1.032,20	12	1.033	1.032,40	15	1.032	1.032,00	10	1.032	1.031,00
41	17	1.033	1.033,40	12	1.035	1.034,40	16	1.033	1.033,20	12	1.033	1.032,40
71	15	1.031	1.031,00	11	1.032	1.031,20	13	1.032	1.031,60	13	1.031	1.030,60
Média	17	1.031	1.031,57	12	1.033	1.032,07	15	1.032	1.031,63	12	1.032	1.031,67

Apêndice 14. Prova do álcool, graduações 68 a 80% v/v, para o leite individual. Estável (0) e instável (1 a 4)

Vaca	30-dez							6-jan							13-jan							20-jan							27-jan						
	68	70	72	74	76	78	80	68	70	72	74	76	78	80	68	70	72	74	76	78	80	68	70	72	74	76	78	80	68	70	72	74	76	78	80
Alta oferta de pasto																																			
72	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	1	1	2	-	-	-	-	-	-	-	
70	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	1	2	-	-	-	-	-	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2	2	2	2	
15	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
124	-	-	-	1	2	3	3	-	-	-	-	-	2	2	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	1	2	-	-	-	-	2	2	2
121	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	2	2	-	-	-	-	-	-	1
90	-	-	-	-	1	1	2	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	2	2	2	-	-	-	-	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2
Baixa oferta de pasto																																			
28	-	-	-	-	-	1	2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	2	2	1	1	2	2	2	2	3	
53 <sup>1</sup>	1	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	1	1	2		
122	-	-	-	-	-	2	2	-	-	-	1	2	2	2	-	1	1	2	2	2	2	-	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3
41 <sup>1</sup>	-	-	1	2	3	3	3	-	-	1	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	3	3	3	3	3	3	4
71	-	-	-	-	-	1	2	-	-	-	1	2	2	-	-	-	-	1	2	3	-	-	-	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3
Vaca	3-fev							10-fev							17-fev							24-fev													
	Baixa oferta de pasto																																		
72	-	-	-	-	-	1	1	1	1	2	2	2	3	3	1	1	2	2	3	3	3	1	1	2	2	2	3	3							
70	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	1	1	1	1	3	3	3	3	4	4	4	1	1	2	2	3	3	3							
15	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	2	2	3	3	-	-	1	1	1	2	2							
124	-	-	-	1	2	3	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	2	2	2	3							
121	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4							
90	-	-	-	-	1	1	2	1	2	2	2	3	3	3	2	2	2	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	3	3						
Alta oferta de pasto																																			
28	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1	-	-	1	1	2	2	2	-	-	-	-	1	1	1							
53 <sup>1</sup>	1	1	2	3	3	3	3	2	2	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	1	2	2	3	3	3	3							
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
122	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-							
41 <sup>1</sup>	2	2	3	3	3	3	3	-	-	1	1	1	2	3	-	-	1	1	2	3	3	-	1	1	2	2	2	3							
71	-	-	1	1	2	2	3	-	-	-	1	2	2	2	-	-	-	-	-	1	1	-	-	1	1	1	1	2							

<sup>1</sup>Dados excluídos da análise estatística

## Apêndice 15. Tempo de redução com azul de metileno (TRAM)

Vaca	TRAM (h)								
	30-dez	6-jan	13-jan	20-jan	27-jan	3-fev	10-fev	17-fev	24-fev
	PP	T100				T60			
72	1,50	6,50	6,50	5,00	0,50	1,00	4,00	1,00	4,50
70	4,00	5,00	5,00	5,00	0,50	1,50	3,00	1,00	3,00
15	1,00	5,00	5,00	2,50	0,50	1,50	4,00	1,00	3,00
124	1,50	7,50	7,50	5,00	1,00	1,00	3,00	1,00	4,00
121	1,00	6,50	6,50	4,50	0,50	1,00	3,00	1,00	3,50
90	1,00	6,50	6,50	4,50	0,50	1,00	3,00	1,00	4,50
Média	1,67	6,17	6,17	4,42	0,58	1,17	3,33	1,00	3,75
	PP	T60				T100			
28	1,00	7,00	7,00	5,00	1,00	5,50	3,00	2,00	3,50
53 <sup>1</sup>	1,50	6,50	6,50	4,50	0,50	1,50	3,00	1,00	2,50
38	1,00	6,50	6,50	2,50	0,50	1,50	4,50	1,00	4,00
122	1,00	7,00	7,00	4,50	1,00	1,00	3,00	2,00	3,50
41 <sup>1</sup>	0,50	7,00	7,00	2,30	0,50	1,50	3,00	2,00	3,50
71	1,00	7,00	7,00	4,50	1,50	1,00	3,00	2,00	4,00
Média	1,00	6,83	6,83	3,88	0,83	2,00	3,25	1,67	3,50

T100: oferta de dieta para atender 100% das necessidades, segundo o NRC (2000 e 2001)

T60: oferta de dieta para atender 60% das necessidades

Dados excluídos da análise estatística<sup>1</sup>

CTB: contagem bacteriana total

PP: pré-experimental

## Apêndice 16. Ponto crioscópico (°H) e porcentagem de água do leite individual

Vaca	30-dez		6-jan		13-jan		20-jan		27-jan		3-fev		10-fev		17-fev		24-fev	
	Crio	Água	Crio	Água	Crio	Água	Crio	Água	Crio	Água	Crio	Água	Crio	Água	Crio	Água	Crio	Água
	Pré-exp		T100								T60							
72	-0.527	4.18	-0.552	-	-0.548	0.36	-0.532	3.27	-0.568	-	-0.547	0.55	-0.531	3.45	-0.526	4.36	-0.528	4.00
70	-0.529	3.82	-0.557	-	-0.550	-	-0.548	0.36	-0.571	-	-0.546	0.73	-0.533	3.09	-0.531	3.45	-0.529	3.82
15	-0.538	2.18	-0.556	-	-0.551	-	-0.549	0.18	-0.567	-	-0.568	-	-0.548	0.36	-0.532	3.27	-0.536	2.55
124	-0.535	2.73	-0.546	0.73	-0.555	-	-0.553	-	-0.560	-	-0.550	-	-0.537	2.36	-0.538	2.18	-0.530	3.64
121	-0.530	3.64	-0.552	-	-0.539	2.00	-0.537	2.36	-0.570	-	-0.546	0.73	-0.532	3.27	-0.528	4.00	-0.529	3.82
90	-0.531	3.45	-0.550	-	-0.544	1.09	-0.544	1.09	-0.566	-	-0.536	2.55	-0.535	2.73	-0.535	2.73	-0.533	3.09
Média	-0.532	3.33	-0.552	-	-0.548	0.39	-0.544	1.12	-0.567	-	-0.549	0.21	-0.536	2.55	-0.532	3.33	-0.531	3.48
	Pré-exp		T60								T100							
28	-0.534	2.91	-0.550	-	-0.534	2.91	-0.532	3.27	-0.551	-	-0.548	0.36	-0.541	1.64	-0.540	1.82	-0.552	-
53 <sup>1</sup>	-0.537	2.36	-0.555	-	-0.535	2.73	-0.533	3.09	-0.574	-	-0.536	2.55	-0.539	2.00	-0.537	2.36	-0.540	1.82
38	-0.530	3.64	-0.551	-	-0.523	4.91	-0.525	4.55	-0.560	-	-0.534	2.91	-0.531	3.45	-0.524	4.73	-0.528	4.00
122	-0.535	2.73	-0.548	0.36	-0.524	4.73	-0.526	4.36	-0.556	-	-0.533	3.09	-0.537	2.36	-0.536	2.55	-0.536	2.55
41 <sup>1</sup>	-0.526	4.36	-0.546	0.73	-0.551	-	-0.549	0.18	-0.594	-	-0.542	1.45	-0.541	1.64	-0.534	2.91	-0.532	3.27
71	-0.538	2.18	-0.555	-	-0.518	5.82	-0.546	0.73	-0.549	0.18	-0.535	2.73	-0.531	3.45	-0.539	2.00	-0.541	1.64
Média	-0.533	3.03	-0.551	-	-0.531	3.48	-0.535	2.70	-0.564	-	-0.538	2.18	-0.537	2.42	-0.535	2.73	-0.538	2.15

Crio: Crioscopia (°H). Cálculo do teor de água realizado a partir do padrão 550 °H (H° = 1,035 °C)

<sup>1</sup>Dados excluídos da análise estatística

Apêndice 17. Contagem bacteriana total (CBT) do leite individual (UFCx10<sup>3</sup>/ml)

Data	Vaca													
	72	70	15	124	121	90	Média	28	53 <sup>1</sup>	38	122	41 <sup>1</sup>	71	Média
13-Jan	622	2006	609	805	1348	510	983	401	508	889	677	1249	130	642
10-fev	630	2574	740	1116	1197	593	1142	214	437	444	669	414	290	411

Apêndice 18. Concentração dos macrocomponentes (%) e CCS (cel x 10<sup>3</sup>/ml) do leite individual

Vaca	30-dez						13-jan						27-jan						10-fev					
	PB	GB	Lac	EST	ESD	CCS	PB	GB	Lac	EST	ESD	CCS	PB	GB	Lac	EST	ESD	CCS	PB	GB	Lac	EST	ESD	CCS
	Pré-experimental						T100						T60											
72	2,83	1,75	4,53	9,96	8,21	70	2,60	3,53	4,83	11,84	8,31	55	2,58	3,19	4,81	11,46	8,27	101	2,48	3,34	4,73	11,33	7,99	68
70	2,91	3,42	4,54	11,74	8,32	1038	3,03	3,80	4,82	12,60	8,80	238	3,08	3,76	4,68	12,44	8,68	219	3,01	3,82	4,71	12,42	8,60	175
15	2,68	3,09	4,79	11,39	8,30	105	2,85	3,25	4,78	11,78	8,53	119	2,77	3,42	4,63	11,69	8,27	337	2,72	3,27	4,59	11,41	8,14	305
124	2,84	3,10	4,38	11,16	8,06	202	3,21	3,44	4,67	12,27	8,83	183	3,32	3,76	4,62	12,66	8,90	514	3,35	3,41	4,54	12,25	8,84	214
121	2,68	3,22	4,60	11,33	8,11	3	2,60	4,66	4,48	12,53	7,87	16	2,89	3,93	4,50	12,17	8,24	64	2,81	3,34	4,31	11,30	7,96	4
90	2,83	3,64	4,55	11,86	8,22	209	2,99	3,72	4,61	12,22	8,50	127	3,11	3,81	4,65	12,50	8,69	376	2,82	3,71	4,45	11,81	8,10	105
Média	2,80	3,04	4,57	11,24	8,20	271	2,88	3,73	4,70	12,21	8,47	123	2,96	3,65	4,65	12,15	8,51	269	2,87	3,48	4,56	11,75	8,27	145
	Pré-experimental						T60						T100											
28	2,52	2,82	4,62	10,75	7,93	88	2,61	2,95	4,59	10,98	8,03	105	2,57	3,33	4,51	11,22	7,89	182	2,67	3,27	4,69	11,45	8,18	8
53 <sup>1</sup>	3,56	3,35	4,64	12,56	9,21	222	3,81	3,77	4,50	13,10	9,33	307	4,44	3,85	4,14	13,48	9,63	643	4,26	4,31	4,45	14,11	9,80	486
38	2,59	3,29	4,76	11,4	8,16	90	2,58	3,93	4,36	11,63	7,70	64	2,76	4,52	4,63	12,76	8,24	256	2,61	3,38	4,54	11,33	7,95	51
122	3,00	3,75	4,69	12,33	8,58	5	2,88	4,02	4,25	11,93	7,91	40	3,06	4,83	4,39	13,13	8,30	78	3,21	4,39	4,42	12,92	8,53	61
41 <sup>1</sup>	3,48	3,99	4,25	12,70	8,71	99	4,12	4,96	4,38	14,51	9,55	121	4,58	4,72	4,25	14,65	9,93	245	4,07	6,70	4,11	15,89	9,19	451
71	3,10	3,33	4,66	12,01	8,68	632	2,98	4,81	4,43	13,07	8,26	1007	3,26	4,35	4,62	13,17	8,82	453	3,33	3,92	4,52	12,70	8,78	494
Média	3,04	3,42	4,60	11,97	8,55	189	3,16	4,07	4,42	12,54	8,46	274	3,45	4,27	4,42	13,07	8,80	310	3,36	4,33	4,46	13,07	8,74	259

PB: proteína bruta. GB: gordura bruta. Lac: lactose. EST: extrato seco total. ESD: extrato seco desengordurado. CCS: contagem de células somáticas  
 Dados excluídos da análise estatística<sup>1</sup>



## Apêndice 19. Concentração de caseína (%) no leite individual

Vaca														
Data	72	70	15	124	121	90	Med	28	53 <sup>1</sup>	38	122	41 <sup>1</sup>	71	Med
27-jan	1,96	2,20	1,97	2,33	2,20	2,46	2,19	1,80	3,22	2,15	2,36	2,52	2,14	2,37
24-fev	1,65	2,18	1,70	2,90	2,08	2,25	2,13	1,95	5,39	2,00	2,58	2,30	2,76	2,83

Méd: Média do tratamento

## Apêndice 20. Concentração dos minerais no leite individual (g/kg)

Vaca	27-jan					24-fev				
	K	Ca	P	Na	Mg	K	Ca	P	Na	Mg
	T100					T60				
72	1,67	0,94	0,72	1,39	0,10	1,46	0,85	0,67	1,27	0,11
70	1,54	1,08	0,77	1,29	0,11	1,46	1,06	0,76	1,29	0,14
15	1,85	1,00	0,83	1,52	0,10	1,82	0,87	0,79	1,40	0,12
124	1,54	0,98	0,90	1,45	0,11	1,05	1,30	0,90	1,45	0,14
121	1,81	0,99	0,88	1,43	0,10	1,66	0,89	0,73	1,31	0,12
90	1,58	0,84	0,80	1,20	0,10	1,54	0,88	0,81	1,31	0,14
Média	1,67	0,97	0,82	1,38	0,11	1,50	0,98	0,78	1,34	0,13
	T60					T100				
28	1,85	1,02	0,71	1,57	0,09	1,50	0,90	0,68	1,27	0,12
53 <sup>1</sup>	1,04	1,62	0,89	1,43	0,14	0,81	1,80	1,31	1,64	0,22
38	1,76	1,02	0,88	1,45	0,10	1,54	0,93	0,89	1,31	0,14
122	1,76	1,00	0,82	1,45	0,10	1,54	0,86	0,81	1,38	0,14
41 <sup>1</sup>	1,22	1,93	1,01	1,34	0,15	0,65	1,08	0,87	2,38	0,23
71	1,49	1,09	0,79	1,34	0,10	0,93	1,15	0,71	1,75	0,17
Média	1,52	1,28	0,85	1,43	0,12	1,16	1,12	0,88	1,62	0,17

<sup>1</sup> Dados excluídos da análise estatística

Apêndice 21. Médias e análise estatística para os efeitos da ordem de lactação, com estágio de lactação como covariável, referentes ao peso corporal (PC) e escore de condição corporal (ECC)

Parâmetro	Ordem de lactação		P > F		EP	CV (%)
	Primíparas	Múltiparas	Ordem	Estádio		
PC, kg	471,87	507,13	0,1724	0,9800	16,69	10,22
ECC, 1-5	2,69	2,59	0,7424	0,8416	0,20	23,25

EP: erro padrão, CV: coeficiente de variação

Apêndice 22. Médias e análise estatística para estágio de lactação, com ordem de lactação como covariável, referentes ao peso corporal (PC) e escore de condição corporal (ECC)

Parâmetro	Estádio de lactação		P > F		EP		CV (%)
	< 180 dias	> 180 dias	Estádio	Ordem	<180 d	>180 d	
PC, kg	506,11	502,64	0,8969	0,0278	12,02	24,36	8,66
ECC, 1-5	2,75	2,66	0,7525	0,0130	0,12	0,25	16,47

Apêndice 23. Médias e análise estatística, em função da estabilidade ao álcool, com estágio e ordem de lactação como covariáveis, para peso corporal (PC) e escore de condição corporal (ECC)

Parâmetro	Estabilidade			P > F		EP		CV (%)
	E	I	LINA	Estádio	Ordem	E	I	
PC, kg	466,16	497,128	0,2154	0,6587	0,0478	20,73	11,78	9,25
ECC, 1-5	2,54	2,67	0,7000	0,6505	0,1685	0,27	0,16	22,60

E: estável, I: instável

Apêndice 24. Coeficiente de correlação de Pearson e valores de  $P > |t|$ 

Item	Peso	ECC	PL	PLC	AL76	Alcor	Acidez	Dens	TRAM	Crio	GB	PB	Lac	EST	ESD	CCS	K	Ca	P	Na	Mg	
ECC	0,31																					
P >  t	0,06																					
PL	0,01	-0,34																				
P >  t	0,95	0,04																				
PLC	0,06	-0,24	0,97																			
P >  t	0,77	0,26	0,00																			
AL76	0,39	0,24	-0,52	-0,53																		
P >  t	0,02	0,17	0,00	0,00																		
Alcor	-0,31	-0,25	0,61	0,64	-0,84																	
P >  t	0,07	0,15	0,00	0,00	0,00																	
Acidez	0,00	0,05	0,01	0,01	-0,14	0,21																
P >  t	0,99	0,79	0,94	0,96	0,29	0,11																
Dens	0,13	0,24	-0,54	-0,52	0,21	-0,35	-0,08															
P >  t	0,44	0,16	0,00	0,00	0,10	0,01	0,54															
TRAM	0,06	-0,02	-0,02	0,07	0,04	0,02	0,06	0,07														
P >  t	0,71	0,92	0,87	0,65	0,76	0,87	0,62	0,61														
Crio	-0,03	-0,02	-0,01	0,08	-0,03	0,03	-0,08	-0,32	0,38													
P >  t	0,86	0,90	0,96	0,58	0,85	0,83	0,54	0,01	0,00													
GB	-0,13	0,44	-0,67	-0,53	0,35	-0,27	0,08	0,47	0,14	-0,20												
P >  t	0,56	0,03	0,00	0,00	0,01	0,07	0,59	0,00	0,34	0,16												
PB	0,26	0,56	-0,76	-0,76	0,46	-0,59	0,02	0,79	-0,05	-0,32	0,59											
P >  t	0,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,90	0,00	0,75	0,03	0,00											
Lac	-0,17	-0,43	0,58	0,57	-0,37	0,44	0,23	-0,35	-0,01	0,00	-0,52	-0,58										
P >  t	0,42	0,04	0,00	0,00	0,01	0,00	0,12	0,01	0,93	0,99	0,00	0,00										
EST	0,04	0,53	-0,77	-0,67	0,43	-0,42	0,12	0,69	0,07	-0,32	0,91	0,84	-0,47									
P >  t	0,85	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,42	0,00	0,66	0,03	0,00	0,00	0,00									
ESD	0,26	0,51	-0,64	-0,64	0,38	-0,51	0,13	0,77	-0,06	-0,38	0,46	0,93	-0,23	0,79								
P >  t	0,22	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,36	0,00	0,67	0,01	0,00	0,00	0,11	0,00								
CCS	0,08	-0,06	-0,54	-0,58	0,23	-0,31	-0,18	0,50	-0,22	-0,29	0,26	0,56	-0,30	0,43	0,53							
P >  t	0,71	0,78	0,00	0,00	0,11	0,03	0,23	0,00	0,14	0,05	0,07	0,00	0,04	0,00	0,00							
K	-0,35	-0,43	0,69	0,64	-0,34	0,37	0,12	-0,70	-0,34	-0,19	-0,62	-0,89	0,69	-0,80	-0,84	-0,73						
P >  t	0,09	0,04	0,00	0,03	0,10	0,07	0,58	0,00	0,10	0,38	0,03	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01						
Ca	0,17	0,47	-0,66	-0,74	0,26	-0,36	-0,26	0,84	-0,24	-0,39	0,62	0,88	-0,70	0,79	0,82	0,46	-0,61					
P >  t	0,43	0,02	0,00	0,01	0,23	0,09	0,21	0,00	0,26	0,06	0,03	0,00	0,01	0,00	0,00	0,13	0,00					
P	0,08	0,55	-0,54	-0,49	0,02	-0,09	-0,14	0,65	-0,16	-0,15	0,74	0,72	-0,47	0,81	0,73	0,19	-0,45	0,73				
P >  t	0,71	0,01	0,01	0,11	0,94	0,68	0,53	0,00	0,44	0,48	0,01	0,01	0,12	0,00	0,01	0,56	0,03	0,00				
Na	0,08	0,24	-0,36	-0,03	0,08	-0,05	0,03	0,22	0,12	0,17	-0,32	-0,30	-0,02	-0,41	-0,42	-0,11	-0,58	0,18	0,23			
P >  t	0,70	0,26	0,08	0,92	0,71	0,82	0,89	0,29	0,58	0,43	0,32	0,35	0,96	0,19	0,17	0,74	0,00	0,40	0,28			
Mg	0,30	0,60	-0,65	-0,62	0,18	-0,22	-0,01	0,54	0,46	0,35	0,67	0,92	-0,68	0,85	0,88	0,48	-0,88	0,49	0,55	0,67		
P >  t	0,16	0,00	0,00	0,03	0,39	0,29	0,97	0,01	0,02	0,10	0,02	0,00	0,02	0,00	0,00	0,12	0,00	0,01	0,01	0,00		
CN	0,10	0,48	-0,55	-0,56	0,17	-0,25	-0,29	0,71	-0,00	-0,01	0,68	0,80	-0,81	0,72	0,64	0,58	-0,64	0,70	0,82	0,23	0,63	
P >  t	0,63	0,02	0,01	0,06	0,44	0,23	0,17	0,00	0,99	0,97	0,02	0,00	0,00	0,01	0,03	0,05	0,00	0,00	0,00	0,28	0,00	