

**FERNANDO ANDRÉ SCHMIDT**

**EFEITO DO SUPRIMENTO DAS EXIGÊNCIAS DE ENERGIA  
E/OU PROTEÍNA NA RECUPERAÇÃO DA INSTABILIDADE  
DO LEITE AO TESTE DO ÁLCOOL**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências  
Agroveterinárias da Universidade do Estado de  
Santa Catarina, como requisito parcial para  
obtenção do título de Mestre em Ciência  
Animal.

Orientador: Prof. Dr. André Thaler Neto

**LAGES  
2014**

S351e

Schmidt, Fernando André

Efeito do suprimento das exigências de energia e/ou proteína na recuperação da instabilidade do leite ao teste do álcool / Fernando André Schmidt. - Lages, 2014.

78 p.: il.; 21 cm

Orientador: André Thaler Neto

Bibliografia:p. 66-70

Dissertação (mestrado) - Universidade do Estado de

Santa Catarina, Centro de Ciências

Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.

1. Vacas. 2. Estabilidade do leite. 3. Dietas balanceadas. 4. Restrição alimentar. 5. Restrição de nutrientes. I. Schmidt, Fernando André. II. Thaler Neto, André. III. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Setorial do  
CAV/ UDESC

**FERNANDO ANDRÉ SCHMIDT**

**EFEITO DO SUPRIMENTO DAS EXIGÊNCIAS DE ENERGIA  
E/OU PROTEÍNA NA RECUPERAÇÃO DA INSTABILIDADE  
DO LEITE AO TESTE DO ÁLCOOL**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina.

**Banca Examinadora:**

Orientador:



Prof. Dr. André Thaler Neto  
UDESC/Lages-SC

Membro:



Prof. Dr. Ivan Pedro de Oliveira Gomes  
UDESC/Lages-SC

Membro:



Prof. Dr. Sandro Charopen Machado  
FAI/Itapiranga-SC

Membro:



Prof. Dra. Lidia Cristina Almeida Picinin  
UDESC/Lages-SC

Lages, 30/09/2014



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois acredito que exista uma força acima de nós, que nos guia para escolhermos sempre o caminho correto e melhor para nossas vidas e para com os nossos semelhantes.

À minha família, meus pais Celito e Maria Lourdes, e meus irmãos Ronaldo e Ricardo. Tenho muito orgulho em fazer parte desta família e sem eles nada disso faria sentido. Muito obrigado por tudo. Amo vocês!

À minha namorada Thalita pelo amor, compreensão, ajuda e muita paciência que teve comigo durante esses momentos difíceis do mestrado e, principalmente, durante a elaboração da dissertação. Te amo!

A todos meus amigos de Lages, em especial aos irmãos de moradia, Alemão, Gambá, Zé Guto, Willian, Wagner e Calouro, pelos inúmeros churrascos realizados e convivência diária que fizeram parte da minha formação pessoal e profissional.

Ao orientador André Thaler Neto, pelos grandes ensinamentos repassados na área de Bovinocultura de Leite nesses vários anos entre estágios no Tambo até chegar ao Mestrado. Por ter acreditado na minha capacidade, pela grande amizade construída e pelos ensinamentos diários de humildade e generosidade. Devo muito do que sei e sou ao senhor e serei eternamente grato! Muito obrigado Professor!

Aos colegas do grupo de pesquisa que não mediram esforços para que o experimento saísse da melhor forma possível: Leonardo, Natália, Joana, Helder, Deise, Dileta, Beto, Alex, Guilherme, Robson e ainda em especial aos bolsistas: Nadine, Matheus, Eduardo e Maurício.

Ao Centro de Ciências Agroveterinárias - CAV/UEDESC e aos Professores do Programa de Mestrado em Ciência



Animal, pelos ensinamentos de qualidade durante a graduação e mestrado, em especial ao Professor Ivan Pedro de Oliveira Gomes pela ajuda e inestimável cooperação para com o experimento.

À Fundação Instituto de Apoio ao Ensino Pesquisa e Extensão (FIEPE) e ao Setor de Bovinocultura de Leite (Tambo) do CAV/UEDESC, e a todos os seus colaboradores e funcionários, pela oportunidade de aprendizado diário na área e por conceder o espaço físico e os animais para a realização do experimento.

Ao Laboratório de Bromatologia do CAV/UEDESC, em especial ao Professor Henrique Ribeiro Filho e Maurílio dos Santos pela amizade e ajuda nas análises bromatológicas.

Ao Núcleo de Tecnologia de Alimentos (NUTA) por ceder o espaço físico e material para a realização das análises laboratoriais e a Professora Loredana d'Ovidio pelo apoio técnico laboratorial.

Aos meus colegas e amigos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS): Alexandre, Daíse, Marcelo, Elissa, Nicole e Professora Vivian Fischer pela ajuda na elaboração do projeto e execução do experimento.

E por fim, à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC), pelo apoio financeiro no experimento e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de auxílio financeiro.



## RESUMO

SCHMIDT, Fernando André. **Efeito do suprimento das exigências de energia e/ou proteína na recuperação da instabilidade do leite ao teste do álcool**. 2014. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a recuperação de LINA com dietas que suprem as exigências de energia e/ou proteína, assim como seu efeito sobre a produção e composição do leite, consumo de alimentos, peso vivo e escore de condição corporal. O experimento foi desenvolvido em quadrado-latino 3x3, com três tratamentos e três períodos experimentais. Cada período experimental teve duração de 24 dias, sendo composto por três fases: adaptação (dias 1 a 13), indução da instabilidade do leite ao teste do álcool (dias 13 a dia 17) e recuperação da instabilidade do leite ao teste do álcool (dias 17 a 24). Doze vacas leiteiras Holandês e mestiças Holandês x Jersey foram divididas em três grupos homogêneos sendo alimentados somente no cocho, com suas dietas formuladas segundo o NRC (2001), sendo pesadas antes do fornecimento, bem como eventuais sobras, avaliando o consumo de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), nutrientes digestíveis totais (NDT) e fibra em detergente neutro (FDN). A produção de leite foi registrada durante todas as ordenhas e amostras de leite foram coletadas para avaliar a estabilidade do leite ao teste do álcool, análise dos teores de gordura, proteína, lactose, nitrogênio uréico e contagem de células somáticas (CCS). Os dados da fase de recuperação da instabilidade do leite foram submetidos à análise de variância e regressão linear, utilizando-se os



procedimentos MIXED e REG do pacote estatístico SAS. A estabilidade do leite ao teste do álcool foi afetada pelos tratamentos ( $P < 0,0001$ ), sendo que os animais só atingiram recuperação da estabilidade do leite com a utilização de dietas que atendem as exigências, de energia e proteína, com alguma recuperação em dietas que atenderam as exigências de energia. A produção de leite também foi maior com a utilização de dietas que atenderam as exigências de energia e proteína, intermediária com dietas que atenderam somente a exigência de energia e menores com o fornecimento de dietas que atenderam somente as exigências de proteína. Os consumos de MS, PB, NDT e FDN foram afetados pelas dietas de recuperação de LINA ( $P < 0,0001$ ), sendo que o consumo de MS, PB e NDT foi maior no tratamento com dietas que atendem as exigências de energia e proteína, e consumo de FDN foi maior no tratamento com dieta que atende somente a exigência de energia. As análises de composição (gordura, proteína, lactose, nitrogênio uréico) também foram afetadas pelos tratamentos ( $P < 0,0001$ ), assim como o peso vivo e o escore de condição corporal ( $P < 0,0001$  e  $P = 0,0002$ , respectivamente). Conclui-se que a recuperação de LINA somente é possível com níveis adequados de energia e proteína na dieta.

**Palavras-chave:** vacas, estabilidade do leite, dietas balanceadas, restrição alimentar, restrição de nutrientes



## ABSTRACT

SCHMIDT, Fernando André. **Effect of supplying the energy requirement, protein or both to recovery of the instability of milk to the alcohol test.** 2014. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2014

The aim of this study was to evaluate the recovery of LINA with diets that supply the requirements of energy, protein and both, as evaluating its effect about the milk production and composition, food intake, body weight and body condition score. The experiment was conducted in 3x3 Latin-square with three treatments and three experimental periods. Each experimental period lasted 24 days and consisted of three phases: adaptation (days 1-13), induction of milk instability to the alcohol test (13-17) and recovery of milk instability to the alcohol test (17-24). Twelve dairy cows Holstein and crossbreed Holstein x Jersey were divided into three homogeneous groups being fed only in the trough, with their diets formulated according to NRC (2001), and weighed before supplying, and eventual leftovers, evaluating the dry matter intake (DMI), crude protein (CP), total digestible nutrients (TDN) and neutral detergent fiber (NDF). Milk production was recorded at each milking and milk samples were collected to evaluate the stability of milk to the alcohol test, analysis of fat, protein, lactose, urea nitrogen concentration and somatic cell count (SCC). The data of phase of recovery of milk instability were submitted to analysis of variance and linear regression, using the MIXED and REG procedures of SAS statistical



package. The stability of milk to the alcohol test was affected by the treatments ( $P < 0,0001$ ), and the animals only reached the recovery of milk stability with the use of diets that supplied the requirements of energy and protein, with some recovery in diets that supplied only the energy requirements. Milk production was also higher with the use of diets that supplied the requirements of energy and protein, intermediate production with the use of diets that supplied only the energy requirement, and lower with the supplying of only protein requirements. The intakes of DM, CP, NDF and TDN were affected by diets for recovery of LINA ( $P < 0,0001$ ) and intake of DM, CP and TDN was higher in the treatment with diet that supplied the requirements of energy and protein, and NDF intake was higher in the treatment with diet that only supplied the energy requirement. Analyses of composition (fat, protein, lactose, urea nitrogen) were also affected by the treatments ( $P < 0,0001$ ), as well as body weight and body condition score ( $P < 0,0001$  and  $P = 0,0002$ , respectively). It is conclude that the recovery of LINA is possible only with adequate levels of energy and protein in the diet.

**Key-words:** cows, milk stability, balanced diets, feed restriction, nutrient restriction



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Quantidade e composição dos alimentos fornecidos nas diferentes fases experimentais, com dietas visando suprir 50 ou 100% das exigências de energia (E) e proteína (P).....	71
<b>Tabela 2</b> – Médias e erro-padrão das médias (EPM) do peso vivo, escore de condição corporal e consumo de alimentos, de acordo com as dietas visando suprir as exigências de energia (100E+50P), proteína (50E+100P) ou ambas (100E+100P), no período de recuperação da instabilidade do leite.....	72
<b>Tabela 3</b> – Médias e erro-padrão das médias (EPM) da estabilidade ao teste do álcool, produção e composição do leite de acordo com de acordo com as dietas visando suprir as exigências de energia (100E+50P), proteína (50E+100P) ou ambas (100E+100P), no período de recuperação da instabilidade do leite.....	73



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Valores médios e regressões para consumo diário de Matéria Seca (MS), Proteína Bruta (PB) e Nutrientes Digestíveis Totais (NDT) nos últimos dias de adaptação e no período de indução a perda da estabilidade do leite e, regressão linear em função dos dias de tratamento, para dietas visando suprir as exigências de energia (100E+50P), proteína (50E+100P) ou ambas (100E+100P).....74
- Figura 2** – Concentração média de álcool em que ocorreu a coagulação do leite nos últimos dias de adaptação e no período de indução a perda da estabilidade do leite e, regressão linear da concentração de álcool em função dos dias de tratamento, para dietas visando suprir as exigências de energia (100E+50P), proteína (50E+100P) ou ambas (100E+100P)...75
- Figura 3** – Produção média de leite nos últimos dias de adaptação e no período de indução a perda da estabilidade do leite e, regressão linear da concentração de álcool em função dos dias de recuperação, para dietas visando suprir as exigências de energia (100E++50P), proteína (50E+100P) ou ambas (100E+100P).....76
- Figura 4** – Teor Médio de Nitrogênio Uréico no leite (NUL) nos últimos dias de adaptação e no período de indução a perda da estabilidade do leite e, regressão linear da concentração de álcool em função dos dias de recuperação, para dietas visando suprir as exigências de energia (100E+50P), proteína (50E+100P) ou ambas (100E+100P).....77
- Figura 5** – Análise multivariada das variáveis consumo de alimentos, estabilidade do leite ao teste do álcool, produção e composição do leite avaliadas juntamente com a oferta de energia e proteína nas dietas (A) ou na ausência destas variáveis (B).....78



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>26</b>
2.1 LEITE E SUA COMPOSIÇÃO.....	26
2.1.1 Gordura.....	27
2.1.2 Lactose.....	28
2.1.3 Nitrogênio Uréico do Leite (NUL).....	29
2.1.4 Proteína.....	30
2.1.5 Caseína.....	30
2.2 ESTABILIDADE DO LEITE.....	31
2.2.1 Leite Instável não ácido (LINA).....	33
2.2.2 Nutrição e LINA.....	34
2.2.3 Estresse térmico e LINA.....	35
2.3 RESTRIÇÃO ALIMENTAR.....	37
2.3.1 Desbalanço entre energia e proteína na dieta.....	38
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>40</b>
<b>4 EFEITO DO SUPRIMENTO DAS EXIGÊNCIAS DE ENERGIA E/OU PROTEÍNA NA RECUPERAÇÃO DA INSTABILIDADE DO LEITE AO TESTE DO ÁLCOOL.....</b>	<b>52</b>
4.1 IMPLICAÇÕES.....	54
4.2 INTRODUÇÃO.....	54
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
4.4 RESULTADOS.....	59
4.5 DISCUSSÃO.....	62
4.6 CONCLUSÃO.....	65
4.7 AGRADECIMENTOS.....	65
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>



## INTRODUÇÃO

O Brasil é o um dos maiores produtores de leite em nível mundial, ocupando a quarta colocação com produção total aproximada em 32 bilhões de litros em 2012 (FAO, 2012). Estimativas governamentais apontam crescimento de 1,9% ao ano na produção e igual índice no consumo do leite e seus derivados para os próximos dez anos, o que faz com que o país ainda mantenha a necessidade da importação do produto no mercado internacional BRASIL (2013). Inserido neste contexto, destaca-se a necessidade de investimentos no setor para atingir níveis internacionais de produção e, especialmente, de qualidade do produto final, suprimindo primeiramente a demanda interna e posteriormente possível comercialização do excedente. Por apresentar dimensões continentais com diferentes climas e tipos de solo e vegetação, além de uma formação cultural multi-étnica, nosso país conta com uma produção de leite heterogênea nas mais diversas regiões, com diferenças nos rebanhos (raça, potencial genético, número de animais etc), bem como ao manejo dos mesmos nos diferentes sistemas, em aspectos como higiene de ordenha e nutrição. A maioria dos produtores de leite do Brasil tem baixo grau de instrução educacional não fazendo grande uso de tecnologia em suas propriedades (IBGE, 2009), tais como a preparação, adubação e correção do solo, correto armazenamento de forragens em forma de silagem ou feno, o que está diretamente ligado com a qualidade e quantidade de leite produzido, principalmente em épocas de transição entre as estações do ano quando há escassez de pastagens.

Objetivando-se padronizar e melhorar a qualidade do leite brasileiro, encontra-se em vigor a Instrução Normativa 62 (BRASIL, 2011), que atualizou a normatização anterior e fixou prazos para que os parâmetros da qualidade do leite sejam cumpridos pelos produtores em relação à higiene durante a ordenha e o armazenamento sob-refrigeração. Nesta Instrução

Normativa também constam os testes que deverão ser realizados para averiguar a qualidade do produto no momento do carregamento do mesmo pelo transportador na propriedade leiteira e na recepção da indústria.

O Teste do álcool alizarol é o primeiro a ser realizado na propriedade, o qual consiste da mistura de amostra de leite com igual quantidade de álcool a 72% v/v, observando-se a formação de grumos quando a amostra é positiva, considerando-a instável. É avaliada ainda a acidez do leite através da variação da cor devido a adição da alizarina.. Amostras positivas ao teste do álcool são descartadas pela indústria mesmo quando apresentam acidez considerada normal, caracterizado como o Leite Instável não ácido (LINA), o que gera inúmeros prejuízos a toda a cadeia produtiva do leite, pois o mesmo pode ser utilizado na fabricação de derivados, não apresentando riscos à saúde dos consumidores. O problema é agravado ainda mais, pela utilização de concentrações de álcool de até 80% v/v pelas indústrias, na tentativa de selecionar um leite de maior estabilidade térmica devido a crescente produção de leite em pó e UHT (FISCHER et al., 2012).

O LINA é uma síndrome multifatorial com sua origem ligada ao estresse, mas com suas causas e relações não totalmente elucidadas. Buscar a compreensão da sua formação e bem como dos seus efeitos se faz necessário para que possamos diminuir sua ocorrência e ter embasamento científico para corrigi-lo em propriedades onde ocorre, evitando prejuízos maiores aos produtores.

O desbalanço entre energia e proteína é comum em propriedades leiteiras pouco tecnificadas, onde o concentrado é misturado pelos próprios produtores, muitas vezes sem a orientação necessária de um profissional da área. Tal desequilíbrio nutricional está relacionado à instabilidade do leite (FISCHER et al., 2012) e trabalhos foram realizados para avaliar a recuperação de LINA, tais como o de MARQUES et

al. (2010), que avaliou a recuperação do quadro através de dietas que suprem as exigências de energia e proteína em animais em pastejo de campo nativo. Porém, tal experimento, não avaliou a recuperação do quadro com o suprimento da exigência energética sem suprir proteína, e também não avaliou o consumo dos animais, o que motivou o presente estudo.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do suprimento das exigências de energia e/ou proteína na recuperação da instabilidade do leite ao teste do álcool, assim como avaliar o efeito sobre a produção e composição do leite, concentração de nitrogênio uréico, consumo de alimentos, peso vivo e escore de condição corporal.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 LEITE E SUA COMPOSIÇÃO**

O leite é composto por diversas substâncias, cuja função biológica é fornecer nutrientes e proteção imunológica ao neonato, além de oferecer possibilidades de processamento industrial para obtenção de diversos produtos para a alimentação humana (SANTOS e FONSECA, 2007). O leite bovino é formado por água, proteína, gordura, lactose, além de minerais e vitaminas (WATTIAUX, 1995). Ainda, deve ter cor branca opalescente homogênea com sabor e odor característicos, contendo teores mínimos de 3% de gordura e 2,9% de proteína, 8,4% de sólidos não gordurosos, além de valores máximos de 300.000 Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL) e Contagem de Células Somáticas (CCS) de 500.000 para a região sul do Brasil de acordo com a Instrução Normativa 62 (BRASIL, 2011).

Os componentes do leite bovino sofrem variações devido a uma série de fatores, tais como a raça (CZERNIEWICZ et al., 2006), sistema de produção e estação do ano (AMENU et al., 2004; PÉREZ et al., 2007), clima (JOKSIMOVIC-TODOROVIC et al., 2011), saúde da glândula mamária (CUNHA et al., 2008; MALEK DOS REIS et al., 2013) e principalmente nas dietas fornecidas (SUTTON, 1989; JENKINS e MCGUIRE, 2006). Para Arnould et al. (2013), a avaliação dos componentes do leite pode ser utilizada como uma ferramenta para o monitoramento da sanidade do rebanho, melhorando o bem estar dos animais bem como a sustentabilidade da atividade.

### 2.1.1 Gordura

A gordura do leite é composta quase que totalmente por triglicerídeos, sendo que os ácidos graxos que os compõem podem ter origem de duas fontes: corrente sanguínea (da dieta ou reservas corporais) ou por uma nova síntese nas células epiteliais (SANTOS e FONSECA, 2007). É o componente lácteo de mais fácil alteração através da dieta do animal e de modo geral, diminui com o aumento da produção de leite. Dietas deficientes em fibra efetiva, excesso de concentrado resultando em uma diminuição do pH ruminal e consequente relação acético:propiónico inferior a 3, aliada a presença de gordura poli-insaturada na dieta diminuem o teor gordura no leite. Os ácidos graxos de cadeia curta (< 16 carbonos) estão diminuídos durante a depressão da gordura do leite, o que sugere que o mecanismo envolvido está na síntese "de novo" na glândula mamária, o que é alterado por enzimas relacionadas diretamente ao fornecimento de ácidos graxos poli-insaturados na dieta (NRC, 2001). Em trabalho recente, Rico et al. (2014) induziram vacas a produzirem 30% menos gordura no leite, sem alterar a produção total, através de uma dieta pobre em fibra (26,5% de FDN) e com alto teor de ácidos graxos insaturados (5,8%), porém mantendo as exigências nutricionais da dieta, não ocorrendo diferenças na produção de leite.

Fatores ambientais como o estresse térmico podem afetar os teores de gordura no leite. Joksimovic-Todorovic et al. (2011) em trabalho comparando vacas da raça Holandês em início de lactação (até 60 dias) no inverno e verão, observaram uma diminuição de 8% na produção de leite total e 20% no teor de gordura durante a estação quente, o que pode estar relacionado com a menor ingestão de alimentos nesse período e também por uma menor concentração de acetato e leve queda de pH nessas vacas, o que ocorreu em experimento avaliando

animais mantidos em temperaturas de 30°C (KADZERE et al., 2002).

### **2.1.2 Lactose**

A lactose é o principal carboidrato do leite e tem o propionato de origem microbiana ruminal como o principal precursor da glicose que dará origem à lactose na glândula mamária. É o principal osmorregulador, sendo responsável direto pela quantidade de leite produzido (SANTOS e FONSECA, 2007). Segundo o NRC (2001), é o componente do leite que menos sofre variação, mantendo-se constante, ocorrendo somente leves diferenças em relação à raça dos animais. Para Jenkins e McGuire (2006), alterações no teor de lactose no leite ocorrem somente em casos extremos e incomuns de alimentação dos animais, o que dificilmente ocorre em países desenvolvidos devido à grande tecnificação da atividade e consequente fornecimento de dietas adequadas aos animais durante todo o ano. Entretanto, esta parece não ser a realidade nos países em que as condições de manejo e alimentação de vacas leiteiras ainda são heterogêneas.

Em trabalho recente, Alessio (2013), avaliando a composição do leite de 73 rebanhos catarinenses, observou menores teores de lactose na estação outono, e maiores teores na primavera. Tal fato está associado à deficiência de pastagem no outono e maior oferta de alimento na primavera devido ao uso de pastagens de clima temperado. A diminuição dos teores de lactose também está associada a altos níveis de CCS, lactações avançadas e número de lactações, o que pode ser explicado pelas alterações no potencial osmótico na glândula mamária, bem como mudanças na permeabilidade das junções firmes, ocorrendo perdas de lactose para a corrente sanguínea (STUMPF et al., 2013).

### **2.1.3 Nitrogênio Uréico do Leite (NUL)**

O nitrogênio uréico do leite é originário da ureia sanguínea que é sintetizada a partir do processo de detoxificação da amônia no fígado. O nitrogênio uréico sanguíneo é o principal produto final do metabolismo de N em ruminantes e altas concentrações podem indicar utilização ineficiente do nitrogênio da dieta (NOUSIAINEN et al., 2004). Devido à rápida estabilização entre ureia e fluidos corporais, incluindo leite, há uma estreita relação entre nitrogênio do leite e N sanguíneo (BRODERICK e CLAYTON, 1997; HOF et al., 1997). Vários são os fatores conhecidos por contribuir para altos níveis de nitrogênio uréico, sendo a proteína em excesso o principal deles. Tal fato pode ser causado por ingestão de matéria seca acima do esperado, desvios na proteína da forragem, ração desbalanceada ou ainda misturada inadequada (AGUILAR et al., 2012). Biswajit et al. (2011) em revisão analisando diversos trabalhos que avaliaram nitrogênio uréico no leite, observaram efeito da estação do ano e ordem de parto, e também efeito da forma de coleta e armazenamento da amostra. Cao et al. (2010) observaram menor teor de NUL nos primeiros 30 dias em lactação e maiores entre 90-120 dias, com consequente diminuição após esse período, o que pode estar ligado à adaptação ruminal e reduzida capacidade de absorção no início da lactação e ingestão de matéria seca crescente atingindo o pico máximo nesse segundo período.

O monitoramento dos níveis de nitrogênio uréico no leite leva a uma série de benefícios econômicos e ecológicos (ARNOULD et al., 2013). Dietas que são muito ricas em proteína levam a custos mais elevados de alimentação, poluição ambiental e problemas de fertilidade do rebanho (BISWAJIT et al., 2011).

### 2.1.4 Proteína

As principais proteínas do leite são as caseínas e as proteínas do soro, também chamadas de soroproteínas (PINTO, 2013). Algumas proteínas presentes no leite não são sintetizadas na glândula mamária, sendo transportadas pelo sangue até entrarem no lúmen alveolar, tais como a albumina e imunoglobulinas (SANTOS e FONSECA, 2007). Em estudo comparando a produção de leite de animais da década de 50 com os atuais, Bijl et al. (2013) observaram alterações importantes, na qual houve aumento de 11% de proteína e 20% de gordura e a produção de leite quase duplicou no período. Ainda, houve incremento dos teores de caseína e das frações micelares de cálcio, fósforo e magnésio, o que segundo os autores, tem relação direta com as propriedades tecnológicas do leite, bem como da estabilidade da caseína ligada à distribuição do fosfato de cálcio entre suas micelas.

### 2.1.5 Caseína

A caseína é principal proteína do leite, caracterizada como uma substância coloidal complexa, formada pelas submicelas ( $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$  e  $\kappa$  -) que são mantidas por interações hidrofóbicas, hidrofílicas e pontes salinas (TRONCO, 2010). As caseínas podem ser separadas por precipitação no pH 4,6, o que corresponde ao ponto isoelétrico, e possuem composição de aminoácidos, variação genética e propriedades funcionais individuais (FOX, 2009). A precipitação da caseína é realizada na indústria por meio da utilização da enzima quimosina, que age degradando a  $\kappa$ -caseína e consequente exposição das frações hidrofóbicas, ocorrendo a precipitação. Além desse processo, a adição de etanol, a exposição a altas temperaturas ( $>120^{\circ}\text{C}$ ) e a acidificação são os principais fatores que afetam a estabilidade

coloidal das micelas da caseína (O'CONNELL et al., 2006).

## 2.2 ESTABILIDADE DO LEITE

A estabilidade do leite consiste da resistência relativa do leite em suportar o tratamento térmico pela indústria, sem sofrer coagulação devido à precipitação das micelas das proteínas. Uma das formas da perda da estabilidade e consequente precipitação ocorre devido à redução de pH pela fermentação da lactose e produção de ácido láctico, causada por micro-organismos (BATTAGLINI et al., 2013), levando à diminuição na força de ligação que mantém as micelas de caseína unidas (OLIVEIRA e TIMM, 2007).

Alterações nas frações caseínicas também podem estar relacionadas à perda da estabilidade do leite, mas resultados encontrados são distintos, necessitando maiores investigações para a compreensão do processo. Barbosa et al. (2012), avaliando restrição alimentar em vacas em lactação avançada, observaram que amostras de leite instáveis ao teste do álcool apresentaram menor concentração de  $\kappa$ -caseína e maiores concentrações de  $\beta$ -caseína e de proteínas totais. Já Reche (2013) avaliando efeito da contagem de bactérias psicrotóxicas em função do tempo de armazenamento do leite, também observou alterações nas frações  $\kappa$  e  $\beta$  da caseína, porém sem ter efeito sobre a estabilidade do leite ao teste do álcool.

Processos inflamatórios na glândula mamária, bem como lactações avançadas aumentam a quantidade de plasmina no sangue, a qual tem relação direta com a degradação da caseína. Fernandes et al. (2008) avaliando a relação entre CCS e as frações da caseína antes e após o processamento UHT (*Ultra High Temperature*) observaram a redução da fração  $\beta$  da caseína em função do aumento da CCS, o que pode ser explicado pela ação da plasmina, e também pela ação das proteases leucocitárias oriundas do processo inflamatório presente na glândula mamária. Leitner et al. (2006) avaliando infecções de quatro principais patógenos associados à mastite

subclínica constataram que a atividade da plasmina aumentou em duas vezes, independente do agente, alterando o tempo de coagulação e diminuição da firmeza do coalho na produção de queijo. Fernandes et al. (2012) observaram correlação significativa entre a contagem de bactérias psicrotróficas no leite pasteurizado e a fração k-caseína no leite UHT no dia 120 de armazenamento, sugerindo que a alteração desta fração ao final do período de validade do produto pode ser atribuída à presença no leite deste grupo de bactérias ou das enzimas produzidas por elas.

O aumento da força iônica ou a ligação de íons específicos a grupos carregados de proteína pode diminuir a repulsão eletrostática e favorecer a precipitação das proteínas. O cálcio desempenha papel importante na estabilidade da caseína, neutralizando a carga negativa da mesma. Somente uma pequena porção do cálcio está na forma ionizada (10%), e por ser um cátion divalente, acaba por neutralizar a carga negativa na superfície da micela de caseína, porém outros cátions também podem estar envolvidos (Na, K e Mg) (LEWIS, 2011). Em trabalhos avaliando a estabilidade do leite, Barros et al. (2000) encontraram 17% maior teor de cálcio iônico ( $0,110 \times 0,094$  g/L) no leite positivo ao teste do álcool, e Marques et al. (2011), teores 18% maiores no leite positivo quando avaliou o efeito de adição de sal iônico à dieta dos animais.

Em trabalho recente, Stumpf et al. (2013) constataram que restrição alimentar de 50% das exigências de energia e proteína, alterou a permeabilidade das junções firmes no interior da glândula mamária, diminuindo a estabilidade do leite ao teste do álcool, aumentando sódio no leite, bem como resultando na passagem de lactose para a corrente sanguínea com consequente diminuição da sua concentração no leite.

### **2.2.1 Leite Instável não ácido (LINA)**

O LINA é caracterizado pela perda da sua estabilidade sem apresentar acidez titulável elevada (ZANELA, 2004). É um problema de origem multifatorial, sendo suas principais causas, o estresse nutricional e o estresse térmico (FISCHER et al., 2012), podendo ainda haver efeitos de origem genética sobre a estabilidade do leite (ZANELA et al., 2006; BOTARO et al., 2009). Essa instabilidade frente ao teste do álcool é observada em outros países além do Brasil, e relatada por diversos pesquisadores, tais como Barros et al. (1999) no Uruguai, Negri (2002) na Argentina, por Barchiesi-Ferrari et al. (2007) no Chile e Ponce e Hernández (2001) em Cuba.

Após a ordenha e o resfriamento do leite em nível de propriedade leiteira, o primeiro teste a ser realizado pela indústria é o teste do álcool alizarol, o qual é exigido na IN 62 (BRASIL, 2011). O teste é realizado nas propriedades rurais antes da coleta pelo transportador e posteriormente na recepção do leite nos laticínios (FISCHER et al., 2012). Consiste na utilização de determinado volume de álcool etílico na concentração que se deseja testar a estabilidade (72%) (BRASIL, 2011), adicionado a igual porção de leite (TRONCO, 2010), agitando-se e observando a formação ou não de precipitações em forma de grumos. Se a precipitação da amostra for positiva e a mesma apresentar acidez titulável normal (entre 14 e 18°D), considera-se como LINA.

Amostras positivas para LINA são normalmente descartadas pela indústria, a qual julga o leite como inapto ao processamento, devido ao risco de coagulação e agregação aos equipamentos durante o tratamento térmico. O problema é agravado quando são utilizadas concentrações de álcool acima do recomendado pela IN 62 (72% v/v), como 76, 78 ou até 80% v/v, na tentativa das indústrias de selecionarem leite de melhor estabilidade térmica devido ao aumento da produção de

leite em pó e UHT. Segundo Fischer et al. (2012), ainda carecem resultados que relacionem a estabilidade do leite (avaliada como concentração de etanol capaz de induzir a coagulação) às medidas práticas, como tempo de operação do equipamento industrial, necessidade de limpeza, sedimentação e outras.

Apesar do LINA ser descartado pela indústria, trabalhos mostram que o mesmo poderia ser utilizado na fabricação de derivados, sem ocorrer prejuízos ao produto final após o seu processamento. Costabel et al. (2009) utilizando amostras de leite instáveis ao álcool 72 e 80% v/v para a produção de queijo, não constataram diferenças significativas entre o rendimento industrial dos mesmos. Ribeiro et al. (2006) comparando amostras positivas e negativas para a estabilidade do leite ao álcool 76% v/v para o processamento de iogurte batido, não encontraram diferenças na viscosidade, no tempo de fermentação e pH do produto final.

### **2.2.2 Nutrição e LINA**

O LINA tem a sua maior ocorrência em épocas de escassez de pastagens, quando os animais são submetidos ao pastejo de gramíneas de baixa qualidade nutricional (ZANELA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011; WERNCKE, 2012; BATTAGLINI et al., 2013). O problema pode ser ainda agravado quando ocorre suplementação com concentrados formulados de forma errônea, contribuindo para o desbalanço entre energia e proteína da dieta, com alterações na estabilidade e composição do leite. Em trabalho recente, Fruscalso et al. (2013) reduziram a estabilidade do leite frente ao teste do álcool (74,22 para 71,76% v/v) através da utilização de dietas com restrição de 50% da quantidade ofertada em relação ao grupo controle.

Em outro trabalho com o mesmo nível de restrição alimentar do anteriormente citado, Stumpf et al. (2013)

utilizando análise fatorial observaram a existência de forte relação entre o nível nutricional e a estabilidade do leite, sendo contrária a concentração de lactose no sangue. Ainda, em uma análise de agrupamento, os mesmos autores observaram a formação de dois grupos, sendo que o grupo com maior estabilidade ao teste do álcool (74,22% v/v) apresentou em média maior atendimento das exigências nutricionais (89,06%) contra 79,4% do grupo com leite instável ao álcool, em média, de 71,7%. Marques et al. (2010), avaliando a recuperação do quadro de LINA induzido através do fornecimento de concentrado com baixos níveis de energia e proteína em pastejo de campo nativo, observaram que animais que receberam o concentrado que supria as exigências de proteína, e de proteína e energia, produziram cerca de 50% mais leite, em relação ao grupo de baixa energia e proteína, respectivamente, 13,16 x 12,97 x 8,66,  $P < 0,05$ , porém a recuperação de LINA só ocorreu quando se supriram ambas as exigências (74,97 x 70,81 x 69,23% v/v,  $P < 0,0042$ ).

Em trabalho avaliando o efeito da adição de sal aniônico a dieta sobre a estabilidade do leite, Marques et al. (2011) observaram que os animais que receberam a dieta com o aditivo, apresentaram menor estabilidade frente ao teste do álcool (77,28% x 74,45%  $P < 0,0175$ ) e maiores níveis de cálcio iônico (0,074 x 0,087 g/L  $P < 0,087$ ). Apesar de não ter sido avaliado o consumo individual, o menor peso corporal final, maior perda de peso diária e tendência de redução do escore de condição corporal das vacas suplementadas com sal aniônico, indicam que uma diminuição do consumo de alimento possa ter ocorrido.

### **2.2.3 Estresse térmico e LINA**

O aumento da temperatura ambiente gerando estresse térmico gera uma série de alterações no comportamento e metabolismo dos animais, como o aumento da frequência

respiratória, vasodilatação periférica, e diminuição da ingestão de alimentos, com conseqüente diminuição da disponibilidade de nutrientes para a síntese do leite (SANTOS e FONSECA, 2007). O problema ainda é agravado quando da privação de sombra aos animais, bem como da influência de outros fatores, tais como ausência de vento e umidade relativa do ar elevada, pois os mesmos têm relação direta nas trocas de calor animal-ambiente.

Em trabalho recente, Fischer et al. (2014) comparando animais com privação de sombra ou acesso livre a ela no verão, observaram importantes diferenças comportamentais (tempo caminhando, pastejando, ruminando), bem como aspectos fisiológicos (temperatura corporal e frequência respiratória), mostrando a necessidade dos produtores em fornecer melhores condições ambientais, melhorando assim o bem estar animal. Animais zebuínos (*Bos indicus*) por terem evoluído em zonas tropicais, são mais tolerantes ao estresse térmico que animais europeus (*Bos taurus*) que provêm de clima temperado, sendo o seu cruzamento uma alternativa interessante, objetivando-se animais mais tolerantes ao calor e com alta produção leiteira.

Stumpf (2014) avaliando animais cruzados Girolando ( $G^{1/2}$  e  $G^{3/4}$ ) e puros Holandês observou que os animais puros são menos tolerantes ao calor e apresentam menor estabilidade (Holandês - 72,55%,  $G^{1/2}$  - 82,45% e  $G^{3/4}$  85,78%,  $P < 0,0001$ ) do leite ao teste do álcool sob condições de privação de sombra. Smith et al. (2013), avaliando o estresse térmico entre vacas Jersey e Holandês, observaram a diminuição (35,6 para 34,2kg) na produção de leite nas vacas Holandês e pequeno aumento (25,9 para 26,5kg) nas vacas Jersey, o que nos leva a acreditar que pode haver diferenças entre as duas raças quanto à tolerância ao estresse térmico. Abreu et al. (2011) avaliando estresse térmico em animais em pastejo com privação de sombra durante estação quente observaram diminuição da produção leiteira (20,3 para 12,75 litros) e diminuição da estabilidade do leite frente ao teste do álcool (76,41 para

70,83%) e tempo de coagulação em tanque (185,3 para 106,7s) após o quinto dia consecutivo de privação de sombra.

## 2.3 RESTRIÇÃO ALIMENTAR

A restrição de alimentos leva uma série de processos metabólicos nos animais, como as alterações nos hormônios ligados à gliconeogênese e metabolização de gordura. Em trabalho avaliando o efeito da restrição alimentar de 50% da dieta total sobre os metabólitos do plasma, Laeger et al. (2012) observaram tendência em diminuir níveis de Ácidos Graxos Voláteis (AGV), não alterando o nível de glicose e aumentando os níveis de beta-hidroxibutírico devido a metabolização lipídica. Chelikani et al. (2004) avaliando o efeito da restrição alimentar de 48 horas em vacas no começo de lactação, encontraram importantes diferenças nos metabólitos e hormônios relacionados ao controle do consumo de alimentos. Houve declínio nos níveis de leptina (hormônio da saciedade), insulina e *insulin-like growth factor 1* (IGF-1) (ambos responsáveis pela glicogênese, processo pelo qual o organismo atua armazenando a glicose que está em altas concentrações na corrente sanguínea, nos tecidos sob a forma de glicogênio e gordura) e ainda, nos níveis de glicose sanguínea.

Em outro experimento avaliando a restrição alimentar, Ferraretto et al. (2014) também observaram diminuição nos níveis de glicose e insulina circulantes, além da severa diminuição na produção de leite (40,8L/dia x 24,4L/dia  $P < 0,001$ ), devido à substituição de 50% da ração totalmente misturada por palha de arroz. Em relação à produção de leite, a diminuição da ingestão da matéria seca diminui o débito cardíaco e conseqüente fluxo de sangue e nutrientes para a glândula mamária (GUINARD-FLAMENT et al., 2006; GUINARD-FLAMENT et al., 2007). A diminuição da densidade energética na dieta pode diminuir a proliferação do epitélio mamário (NØRGAARD et al., 2005). Ocorre ainda,

diminuição na expressão de genes transportadores de glicose bem como menor suprimento da mesma para a glândula mamária (BOUTINAUD et al., 2008). Como a glicose é a principal precursora para a síntese de lactose, e sendo esta a maior responsável pelo potencial osmótico na glândula mamária, ocorre diminuição na produção de leite.

### **2.3.1 Desbalanço entre energia e proteína na dieta**

O desbalanço entre o fornecimento de energia e proteína é mais frequente em rebanhos pouco tecnificados, que por falta de conhecimento e/ou falta de instrução de profissional da área acaba por não fornecer as condições alimentares para que se possa explorar o máximo da produção e consequentemente, qualidade do leite das vacas do rebanho. Tal desbalanço, é responsável por alterações metabólicas e ruminais que acabam por alterar a composição do leite (AGENÄS et al., 2003) e também tem efeitos negativos sob a reprodução desses animais, especialmente quando de dietas com alto uso de proteína (TAMMINGA, 2006).

O fornecimento de energia em excesso, em especial os de rápida fermentação, aliada a uma deficiência de fibras na dieta, reduz o pH ruminal, gerando uma série de mudanças metabólicas, resultando em um quadro de acidose subclínica ou clínica. Krause e Oetzel (2005), avaliando a indução de vacas à acidose subclínica por meio de mudanças na alimentação, observaram diminuição na produção de leite (35,2 x 31,7kg,  $P < 0,01$ ) e aumento no teor percentual de gordura (3,73 x 4,29  $P < 0,04$ ), não retornando aos níveis basais anteriores à indução.

Em experimento avaliando o efeito do fornecimento desbalanceado com diferentes níveis de energia e proteína para vacas em pastejo, Whelan et al. (2012) observaram alterações significativas em glicose, níveis de betahidroxibutirato e ácidos graxos não esterificados entre os tratamentos, também observando alterações na composição e quantidade de leite

produzido. Gozho et al. (2005) e Gozho et al. (2007) após experimentos com indução à acidose subclínica, encontraram aumento de lipopolissacarídeos no rúmen e também nas proteínas de fase aguda sanguíneas, haptoglobina e amilóide AA.

Altos níveis de polissacarídeos como as endotoxinas, podem estar ligados ao mecanismo de indução de laminites após acidose clínica (LEAN et al., 2013), a qual foi reproduzida parcialmente através da injeção intravenosa de endotoxinas (BOOSMAN et al., 1991). Tal fato ocasionou lesões patológicas características, porém sem levar o animal ao quadro clínico e manifestação em forma de claudicação, o que sugere que novos estudos em relação a dose/efeito e tipo de endotoxina utilizada devem ser realizados. Em outro trabalho, Liu et al. (2013) observaram que os polissacarídeos têm capacidade de alterar permeabilidade epitelial, o que ocasionou mudanças nas junções firmes do rúmen de cabras. Portanto, estudos relacionando o desbalanço entre energia e proteína com a produção de lipopolissacarídeos e fatores de inflamação podem ser realizados com objetivo de encontrar possíveis causas sobre a alteração da permeabilidade do epitélio da glândula mamária, visto que Stumpf et al. (2013) após restrição alimentar de 50%, encontraram alterações nas junções firmes, acarretando em aumento do sódio e diminuição da lactose no leite, com conseqüente perda da estabilidade do leite ao teste do álcool.

## REFERÊNCIAS

ABREU, A.S.; FISCHER, V.; KOLLING, G.J. Estresse calórico induzido por privação de acesso à sombra em vacas holandesas reduz a produção leiteira e a estabilidade térmica do leite. **CONFERÊNCIA INTERNACIONAL DE LECHE INESTABLE**. Colonia del Sacramento 2011.

AGENÄS, S.; DAHLBORN, K.; HOLTENIUS, K. Changes in metabolism and milk production during and after feed deprivation in primiparous cows selected for different milk fat content. **Livestock Production Science**, v. 83, p.153-164, 2003.

AGUILAR, M.; HANIGAN, M.D.; TUCKER, H.A.; JONES, B.L.; GARBADE, S.K.; MCGILLIARD, M.L.; STALLINGS, C.C.; KNOWLTON, K.F.; JAMES, R.E. Cow and herd variation in milk urea nitrogen concentrations in lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p.7261-8, 2012.

ALESSIO, D.R.M. **Estudo meta-analítico e análise de banco de dados do teor de lactose no leite bovino**. Produção Animal, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2013. 90 p.

AMENU, B.; COWAN, R.T.; DEETH, H.C.; MOSS, R. Impacts of feeding system and season on milk composition and Cheddar cheese yield in a sub-tropical environment. **25th Biennial Conference of the Australian Society of Animal Production. The New Realities - Animal Production in Australia**. Australia, Victoria, Melbourne 2004.

ARNOULD, V.M.R.; REDING, R.; BORMANN, J.; GENGLER, N.; SOYEURT, H. Review: milk composition as management tool of sustainability. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v. 17, p.613-621, 2013.

BARBOSA, R.S.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M.E.R.; ZANELA, M.B.; STUMPF, M.T.; KOLLING, G.J.; SCHAFFHÄUSER JÚNIOR, J.; BARROS, L.E.; EGITO, A.S.D. Caracterização eletroforética de proteínas e estabilidade do leite em vacas submetidas à restrição alimentar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p.621-628, 2012.

BARCHIESI-FERRARI, C.G.; WILLIAMS-SALINAS, P.A.; SALVO-GARRIDO, S.I. Inestabilidad de la leche asociada a componentes lácteos y estacionalidad en vacas a pastoreo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p.1785-1791, 2007.

BARROS, L.; DENIS, N.; GONZALEZ, A. Prueba del alcohol en leche y relación con calcio iónico. **Revista Prácticas Veterinarias**, v. 9, p.315-318, 1999.

BARROS, L.; DENIS, N.; NÚÑEZ, A.; GALAIN, C.; DE TORRES, E.; GONZÁLEZ, P. Variaciones de la leche y prueba del alcohol. **XXI World Buiatrics Congress**. Punta del Este, Uruguay: 577 p. 2000.

BATTAGLINI, A.P.P.; BELOTI, V.; FAGNANI, R.; TAMANINI, R.; DUNGA, K.S. Caracterização físico-química e microbiológica do leite bovino instável não ácido em função das estações do ano. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 35, p.26-32, 2013.

BIJL, E.; VAN VALENBERG, H.J.F.; HUPPERTZ, T.; VAN HOOIJDONK, A.C.M. Protein, casein, and micellar salts in milk: Current content and historical perspectives. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p.5455-5464, 2013.

BISWAJIT, R.; BRAHMA, B.; GHOSH, S.; PANKAJ, P.K.; MANDAL, G. Evaluation of Milk Urea Concentration as Useful Indicator for Dairy Herd Management: A Review. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 6, p.1-19, 2011.

BOOSMAN, R.; MUTSAERS, C.W.A.A.M.; KLARENBECK, A. The role of endotoxin in the pathogenesis of acute bovine laminitis. **Veterinary Quarterly**, v. 13, p.155-162, 1991.

BOTARO, B.G.; LIMA, Y.V.R.D.; CORTINHAS, C.S.; SILVA, L.F.P.E.; RENNÓ, F.P.; SANTOS, M.V.D. Effect of the kappa-casein gene polymorphism, breed and seasonality on physicochemical characteristics, composition and stability of bovine milk. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p.2447-2454, 2009.

BOUTINAUD, M.; BEN CHEDLY, M.H.; DELAMAIRE, E.; GUINARD-FLAMENT, J. Milking and Feed Restriction Regulate Transcripts of Mammary Epithelial Cells Purified from Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p.988-998, 2008.

BRASIL. Instrução Normativa N 62. Brasil: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento MAPA 2011.

BRODERICK, G.A.; CLAYTON, M.K. A Statistical Evaluation of Animal and Nutritional Factors Influencing Concentrations of Milk Urea Nitrogen. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p.2964-2971, 1997.

CAO, Z.; HUANG, W.; WANG, T.; WANG, Y.; WEN, W.; MA, M.; LI, S. Effects of Parity, Days in Milk, Milk Production and Milk Components on Milk Urea Nitrogen in Chinese Holstein. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, p.688-695, 2010.

CHELIKANI, P.K.; AMBROSE, J.D.; KEISLER, D.H.; KENNELLY, J.J. Effect of short-term fasting on plasma concentrations of leptin and other hormones and metabolites in dairy cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 26, p.33-48, 2004.

COSTABEL, L.C.; PAEZ, R.B.; CUATRIN, A.; TAVERNA, M.A.; WALTER, E.G.; CAMPOS, S. Estudio de la relación entre aptitud a la coagulación por cuajo y prueba de alcohol en muestras de leche de vacas individuales. **CONFERÊNCIA INTERNACIONAL DO LEITE INSTÁVEL**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. 1 2009.

CUNHA, R.P.L.; MOLINA, L.R.; CARVALHO, A.U.; FACURY FILHO, E.J.; FERREIRA, P.M.; GENTILINI, M.B. Mastite subclínica e relação da contagem de células somáticas com número de lactações, produção e composição química do leite em vacas da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, p.19-24, 2008.

CZERNIEWICZ, M.; KIELCZEWSKA, K.; KRUK, K. Comparison of some physicochemical properties of milk from Holstein-Friesian and Jersey cows. **Polish Journal of Food And Nutrition Sciences**, v. 15/56, p.61-64, 2006.

FERNANDES, A.M.; BOVO, F.; MORETTI, T.S.; ROSIM, R.E.; LIMA, C.G.D.; OLIVEIRA, C.A.F.D. Casein fractions of ultra high temperature milk with different somatic cell counts. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p.149-152, 2008.

FERNANDES, A.M.; BOVOA, F.; MORETTI, T.S.; PELUQUEA, E.; ROSIMA, R.E.; OLIVEIRA, C.A.F.D. Relação Entre Psicotróficos e Frações de Caseína do Leite Longa Vida Durante o Armazenamento. **Revista Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, p.227-230, 2012.

FERRARETTO, L.F.; GENCOGLU, H.; HACKBART, K.S.; NASCIMENTO, A.B.; DALLA COSTA, F.; BENDER, R.W.; GUENTHER, J.N.; SHAVER, R.D.; WILTBANK, M.C. Effect of feed restriction on reproductive and metabolic hormones in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p.754-763, 2014.

FISCHER, V.; RIBEIRO, M.E.R.; ZANELA, M.B.; MARQUES, L.T.; ABREU, A.S.D.; MACHADO, S.C.; FRUSCALSO, V.; BARBOSA, R.S.; STUMPF, M.T. Leite instável não ácido: um problema solucionável? **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, p.838-849, 2012.

FISCHER, V.; VIZZOTTO, E.F.; ABREU, A.S.; THALER NETO, A.; STUMPF, M.T.; WERNCKE, D.; SCHMIDT, F.A. Behavior of lactating dairy cows under mild and severe heat stress with free access or not to shadow. **Joint Annual Meeting of American Dairy Science Association**. Kansas City, Missouri: Conference Information & Scientific Program of JAM 2014. 1: 160 p. 2014.

FOX, P.F. Milk: an overview. **Milk proteins; from expression to food**. THOMPSON, A.; BOLAND, M.; SINGH, H. Amsterdam: Elsevier: 2-54 p. 2009.

FRUSCALSO, V.; STUMPF, M.T.; MCMANUS, C.M.; FISCHER, V. Feeding restriction impairs milk yield and physicochemical properties rendering it less suitable for sale. **Scientia Agricola**, v. 70, p.237-241, 2013.

GOZHO, G.N.; KRAUSE, D.O.; PLAIZIER, J.C. Ruminant Lipopolysaccharide Concentration and Inflammatory Response During Grain-Induced Subacute Ruminant Acidosis in Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p.856-866, 2007.

GOZHO, G.N.; PLAIZIER, J.C.; KRAUSE, D.O.; KENNEDY, A.D.; WITTENBERG, K.M. Subacute Ruminant Acidosis Induces Ruminant Lipopolysaccharide Endotoxin Release and Triggers an Inflammatory Response. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p.1399-1403, 2005.

GUINARD-FLAMENT, J.; DELAMAIRE, E.; LAMBERTON, P.; PEYRAUD, J.L. Adaptations of Mammary Uptake and Nutrient Use to Once-Daily Milking and Feed Restriction in Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p.5062-5072, 2007.

GUINARD-FLAMENT, J.; DELAMAIRE, E.; LEMOSQUET, S.; BOUTINAUD, M.; DAVID, Y. Changes in mammary uptake and metabolic fate of glucose with once-daily milking and feed restriction in dairy cows. **Reprod Nutr Dev**, v. 46, p.589-98, 2006.

HOF, G.; VERVOORN, M.D.; LENAERS, P.J.; TAMMINGA, S. Milk Urea Nitrogen as a Tool to Monitor the Protein Nutrition of Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p.3333-3340, 1997.

JENKINS, T.C.; MCGUIRE, M.A. Major Advances in Nutrition: Impact on Milk Composition. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p.1302-1310, 2006.

JOKSIMOVIC-TODOROVIC, M.; DAVIDOVIC, V.; HRISTOV, S.; STANKOVIC, B. Effect of heat stress on milk production in dairy cows. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 27, p.1017-1023, 2011.

KADZERE, C.T.; MURPHY, M.R.; SILANIKOVE, N.; MALTZ, E. Heat stress in lactating dairy cows: a review. **Livestock Production Science**, v. 77, p.59-91, 2002.

KRAUSE, K.M.; OETZEL, G.R. Inducing Subacute Ruminal Acidosis in Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p.3633-3639, 2005.

LAEGER, T.; GÖRS, S.; METGES, C.C.; KUHLA, B. Effect of feed restriction on metabolites in cerebrospinal fluid and plasma of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p.1198-1208, 2012.

LEAN, I.J.; WESTWOOD, C.T.; GOLDBERGER, H.M.; VERMUNT, J.J. Impact of nutrition on lameness and claw health in cattle. **Livestock Science**, v. 156, p.71-87, 2013.

LEITNER, G.; KRIFUCKS, O.; MERIN, U.; LAVI, Y.; SILANIKOVE, N. Interactions between bacteria type, proteolysis of casein and physico-chemical properties of bovine milk. **International Dairy Journal**, v. 16, p.648-654, 2006.

LEWIS, M.J. The measurement and significance of ionic calcium in milk – A review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, p.1-13, 2011.

LIU, J.H.; XU, T.T.; LIU, Y.J.; ZHU, W.Y.; MAO, S.Y. A high-grain diet causes massive disruption of ruminal epithelial tight junctions in goats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 305, p.R232-41, 2013.

MALEK DOS REIS, C.B.; BARREIRO, J.R.; MESTIERI, L.; PORCIONATO, M.A.D.F.; DOS SANTOS, M.V. Effect of somatic cell count and mastitis pathogens on milk composition in Gyr cows. **BMC Veterinary Research**, v. 9, p.67, 2013.

MARQUES, L.T.; FISCHER, V.; ZANELA, M.B.; RIBEIRO, M.E.R.; STUMPF JUNIOR, W.; MANZKE, N. Fornecimento de suplementos com diferentes níveis de energia e proteína para vacas Jersey e seus efeitos sobre a instabilidade do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p.2724-2730, 2010.

MARQUES, L.T.; FISCHER, V.; ZANELA, M.B.; RIBEIRO, M.E.R.; STUMPF JUNIOR, W.; RODRIGUES, C.M. Produção leiteira, composição do leite e perfil bioquímico sanguíneo de vacas lactantes sob suplementação com sal aniônico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p.1088-1094, 2011.

NEGRI, L.M.R. **Estudio de los factores físicos-químicos de la leche cruda que inciden sobre la estabilidad térmica**. Faculdade de Ingeniería Química, Universidade Nacional del Litoral, Santa Fé - Argentina, 2002. 180 p.

NØRGAARD, J.; SØRENSEN, A.; SØRENSEN, M.T.; ANDERSEN, J.B.; SEJRSEN, K. Mammary Cell Turnover and Enzyme Activity in Dairy Cows: Effects of Milking Frequency and Diet Energy Density. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p.975-982, 2005.

NOUSIAINEN, J.; SHINGFIELD, K.J.; HUHTANEN, P. Evaluation of Milk Urea Nitrogen as a Diagnostic of Protein Feeding. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p.386-398, 2004.

**NRC. Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Seventh Revised Edition, 2001:** The National Academies Press. 2001

O'CONNELL, J.E.; SARACINO, P.; HUPPERTZ, T.; UNIAKE, T.; DE KRUIF, C.G.; KELLY, A.L.; FOX, P.F. Influence of ethanol on the rennet-induced coagulation of milk. **Journal of Dairy Research**, v. 73, p.312-7, 2006.

OLIVEIRA, C.A.F.D.; LOPES, L.C.; FRANCO, R.C.; CORASSIN, C.H. Composição e características físico-químicas do leite instável não ácido recebido em laticínio do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12, p.508-515, 2011.

OLIVEIRA, D.S.; TIMM, C.D. Instabilidade da caseína em leite sem acidez adquirida. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, p.17-22, 2007.

PÉREZ, P.L.; ANRIQUE G, R.; GONZÁLEZ V, H. Factores no Genéticos que Afectan la Producción y Composición de la Leche en un Rebaño de Pariciones de la Décima Región de los Lagos, Chile. **Agricultura Técnica**, v. 67, p.39-48, 2007.

PINTO, C.L.D.O. **Qualidade microbiológica do leite cru.** Viçosa, MG: EPAMIG Zona da Mata. 2013. 272 p.

PONCE, P.C.; HERNÁNDEZ, R. Propriedades físico-químicas do leite e sua associação com transtornos metabólicos e alterações na glândula mamária. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; DÜRR, J. W.; FONTANELI, R. S. (Ed.). **Uso do leite para monitorar a nutrição e metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre, RS: UFRGS. 2001. p.61-72

RECHE, N.L.M. **Influência do armazenamento do leite em refrigerador por expansão direta sobre a contagem de microorganismos e estabilidade da caseína**. Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, 2013. 91 p.

RIBEIRO, M.E.R.; KROLOW, A.C.R.; BARBOSA, R.S.; BORGES, C.D.; ZANELA, M.B.; FISCHER, V.; HAUSEN, L.J.V. Ensaio preliminares sobre o efeito de leite instável não ácido na industrialização do iogurte batido. **CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE**. Goiânia, GO 2006.

RICO, D.E.; YING, Y.; CLARKE, A.R.; HARVATINE, K.J. The effect of rumen digesta inoculation on the time course of recovery from classical diet-induced milk fat depression in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p.3752-3760, 2014.

SANTOS, M.V.D.; FONSECA, L.F.L.D. **Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria da Qualidade do Leite**, v.1. 2007

SMITH, D.L.; SMITH, T.; RUDE, B.J.; WARD, S.H. Short communication: Comparison of the effects of heat stress on milk and component yields and somatic cell score in Holstein and Jersey cows. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p.3028-3033, 2013.

STUMPF, M.T. **Respostas biológicas de bovinos das raças Holandesa e Girolando sob estresse térmico**. Faculdade de Agronomia - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 2014. 69 p.

STUMPF, M.T.; FISCHER, V.; MCMANUS, C.M.; KOLLING, G.J.; ZANELA, M.B.; SANTOS, C.S.; ABREU, A.S.; MONTAGNER, P. Severe feed restriction increases permeability of mammary gland cell tight junctions and reduces ethanol stability of milk. **Animal**, v. 7, p.1137-1142, 2013.

SUTTON, J.D. Altering Milk Composition by Feeding. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p.2801-2814, 1989.

TAMMINGA, S. The effect of the supply of rumen degradable protein and metabolisable protein on negative energy balance and fertility in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 96, p.227-239, 2006.

TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria, RS. 2010. 195 p.

WATTIAUX, M.A. Lactation and Milking. Dairy Essentials. In: (Ed.). **The Babcock Institute Publications**. University of Wisconsin-Madison. 1995

WERNCKE, D. **Perfil das Propriedades e Ocorrência de Leite Instável não ácido na região do Vale do Braço do Norte, Sul do Estado de Santa Catarina**. Produção Animal, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages - SC, 2012. 61 p.

WHELAN, S.J.; PIERCE, K.M.; FLYNN, B.; MULLIGAN, F.J. Effect of supplemental concentrate type on milk production and metabolic status in early-lactation dairy cows grazing perennial ryegrass-based pasture. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p.4541-4549, 2012.

ZANELA, M.B. **Caracterização do leite produzido no Rio Grande do Sul, ocorrência e indução experimental do Leite Instável Não Ácido (LINA)**. Doutorado em Zootecnia - Produção Animal, UFPEL, Pelotas/RS, 2004. 170 p.

ZANELA, M.B.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M.E.R.; BARBOSA, R.S.; MARQUES, L.T.; STUMPF JUNIOR, W.; ZANELA, C. Leite instável não-ácido e composição do leite de vacas Jersey sob restrição alimentar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p.835-840, 2006.

ZANELA, M.B.; RIBEIRO, M.E.R.; FISCHER, V.; GOMES, J.F.; STUMPF JR., W. Ocorrência do leite instável não ácido no noroeste do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p.1009-1013, 2009.

## **4 EFEITO DO SUPRIMENTO DAS EXIGÊNCIAS DE ENERGIA E/OU PROTEÍNA NA RECUPERAÇÃO DA INSTABILIDADE DO LEITE AO TESTE DO ÁLCOOL**

### **EFFECT OF SUPPLYING THE ENERGY REQUIREMENT, PROTEIN OR BOTH TO RECOVERY OF THE INSTABILITY OF MILK TO THE ALCOHOL TEST**

F. A. Schmidt <sup>1</sup>, et al.,

<sup>1</sup> *Departamento Produção Animal e Alimentos, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Avenida Luís de Camões, 2090, 88520-050, Lages, Santa Catarina, Brazil.*

Corresponding author: Fernando André Schmidt. Email: schmidtfernandoandre@gmail.com

\* Artigo em formato para ser enviado para *Animal*

Título curto: Efeito do suprimento das exigências de energia e/ou proteína na recuperação da instabilidade do leite ao teste do álcool em vacas

#### Resumo

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a recuperação da instabilidade do leite ao teste do álcool, através do suprimento das exigências de energia e/ou proteína, assim como seu efeito sobre a produção e composição do leite, consumo de alimentos, peso vivo e escore de condição corporal. Foi desenvolvido em quadrado-latino 3x3, com três tratamentos e três períodos experimentais. Cada período experimental teve duração de 24 dias, sendo composto por três fases: adaptação (dias 1 a 13), indução da instabilidade do leite ao teste do álcool (dias 13 a dia 17) e recuperação da instabilidade do leite ao teste do álcool (dias 17 a 24). Doze vacas leiteiras Holandês e mestiças

Holandês x Jersey foram divididas em três grupos homogêneos sendo alimentados somente no cocho, com dietas formuladas segundo o NRC (2001), sendo pesadas antes do fornecimento, bem como eventuais sobras, avaliando o consumo de matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e nutrientes digestíveis totais (NDT). A produção de leite foi registrada durante todas as ordenhas e amostras de leite foram coletadas para avaliar a estabilidade do leite ao teste do álcool, análise dos teores de gordura, proteína, lactose, nitrogênio uréico e contagem de células somáticas (CCS). Os dados da fase de recuperação da instabilidade do leite foram submetidos à análise de variância e regressão linear, utilizando-se os procedimentos MIXED e REG do pacote estatístico SAS. A recuperação da instabilidade do leite ao teste do álcool foi afetada pelos tratamentos, sendo que os animais só atingiram recuperação (concentração de álcool >72% v/v) com a utilização de dietas que atendem ambas as exigências, com alguma recuperação em dietas que atenderam as exigências de energia. A produção de leite também foi maior com a utilização de dietas que atenderam as exigências de energia e proteína, intermediária com dietas que atenderam somente a exigência de energia e menores com o fornecimento de dietas que atenderam somente as exigências de proteína. Os consumos de MS, PB e NDT foram afetados pelas dietas de recuperação da instabilidade, sendo que o consumo de MS, PB e NDT foi maior no tratamento com dietas que atendem ambas as exigências. As análises de composição foram afetadas pelos tratamentos, assim como o peso vivo e o escore de condição corporal. A recuperação da instabilidade somente é possível com níveis adequados de energia e proteína na dieta.

Palavras-chave: vacas, estabilidade do leite, dietas balanceadas, restrição alimentar

## 4.1 IMPLICAÇÕES

Amostras de leite consideradas instáveis ao teste do álcool são julgadas como inaptas ao processamento, sendo descartadas pela indústria. Desbalanço no fornecimento de energia e proteína é apontada como uma das principais causas, sendo comum em países subdesenvolvidos devido ao baixo grau de instrução dos produtores de leite, que não fornecem dietas adequadas, especialmente em épocas de escassez de pastagem, o que está diretamente ligado à instabilidade do leite. Portanto, entender as suas causas bem como a recuperação dos animais que apresentam leite instável, pode diminuir as perdas econômicas de toda a cadeia produtiva, bem como reduzir o impacto ambiental.

## 4.2 INTRODUÇÃO

Em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, como é o caso do Brasil, a maioria dos produtores de leite conta com baixo grau de instrução educacional (IBGE, 2009), não usando tecnologias agrícolas básicas no manejo de suas propriedades que consequentemente impactam na produção, tais como preparação e adubação do solo, irrigação de pastagens e conservação de alimentos em forma de feno ou silagem. A falta destas, aliada a uma diminuição natural no crescimento da pastagem devido às diferenças climáticas nas estações do ano, faz com que os animais não recebam oferta de alimentos de qualidade para suprir suas exigências de energia e proteína ao longo do ano, acarretando em diferenças na produção e composição do leite.

A restrição de alimentos faz com que os animais produzam menores quantidades de leite e com alterações nos seus componentes (gordura, proteína, lactose) (Whelan *et al.*, 2012, Ferraretto *et al.*, 2014), além de apresentar menor estabilidade ao teste do álcool (Marques *et al.*, 2010, Stumpf *et*

*al.*, 2013), o que pode diminuir o preço pago do litro de leite aos produtores ou até mesmo a rejeição do leite pela indústria (Fruscalso *et al.*, 2013). As alterações podem variar de acordo com a magnitude da restrição, na alteração do equilíbrio entre nutrientes, o estágio de lactação dos animais e potencial produtivo (Fischer *et al.*, 2012).

O teste do álcool é um bom indicador de estabilidade do leite para o processamento térmico do leite em processos como o *ultra high temperature* (UHT) (Horne, 2003, Boumpa *et al.*, 2008), sendo realizado no momento do transporte, na propriedade, e na recepção na indústria pela mistura de iguais partes de leite e álcool, sendo necessária a estabilidade em concentrações de no mínimo 72% v/v, no caso do Brasil (BRASIL, 2011). Entretanto, leite de boa qualidade para processamento industrial precisa ser estável a concentrações de álcool mais elevadas (Omoarukhe *et al.*, 2010), sendo o que é adotado por parcela considerável das indústrias. Como a estabilidade do leite diminui à medida em que as concentrações de álcool aumentam, o leite instável ao teste acaba sendo descartado na própria propriedade, o que gera consideráveis perdas econômicas aos produtores de leite.

São escassos os estudos sobre a recuperação da instabilidade do leite ao teste do álcool após restrição alimentar, através do fornecimento de dietas visando regularizar a condição nutricional. Marques *et al.* (2010) obtiveram melhoras significativas na produção e composição do leite, além da recuperação da instabilidade do leite ao teste do álcool com o suprimento das exigências de energia e proteína, sem obter sucesso com a adequação somente dos níveis de proteína. No referido trabalho não foi avaliado o atendimento somente dos níveis de energia.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a recuperação da instabilidade do leite ao teste do álcool com dietas que suprem as exigências de energia e/ou proteína, assim como avaliar seu efeito sobre a produção e composição do

leite, concentração de nitrogênio uréico, consumo de alimentos, peso vivo e escore de condição corporal.

#### 4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

##### *Descrição do local e instalações, animais e períodos experimentais*

O trabalho foi realizado no período de maio a julho de 2013 em Lages, Santa Catarina, Brasil, tendo sido aprovado no Comitê de Ética em Experimentação Animal - CETEA, da Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC, processo 1.29.13. O campo experimental está localizado nas coordenadas 27°47'06.32"S 50°18'16.76'O, com 914 metros de altitude. A região apresenta Clima Cfb, com temperatura média anual de 14,3°C.

Doze vacas Holandês e mestiças Holandês x Jersey foram confinadas em três piquetes a céu aberto, com local de alimentação coberto e livre acesso a água durante todo o experimento. As vacas receberam as dietas exclusivamente no cocho, as quais foram formuladas seguindo as exigências nutricionais do National Research Council - NRC (2001). Os animais foram divididos em três grupos homogêneos quanto à produção de leite ( $18,93 \pm 5,46\text{L/dia}$ ), número de partos ( $2,67 \pm 1,56$ ), dias em lactação ( $146,33 \pm 50,4$ ), escore de condição corporal ( $2,67 \pm 0,32$ ) e peso vivo ( $575,42 \pm 70,57\text{kg}$ ).

##### *Delineamento experimental*

O experimento foi desenvolvido em quadrado-latino 3x3, com três tratamentos e três períodos experimentais. Cada período experimental teve duração de 24 dias, sendo composto por três fases: adaptação (dias 1 a 13), indução da instabilidade do leite ao teste do álcool (dias 13 a dia 17) e recuperação da instabilidade do leite ao teste do álcool (dias 17 a 24). Na fase

adaptação, os animais receberam dieta (Tabela 1) formulada visando suprir 100% das exigências de energia e proteína (dieta 100E+100P), com o objetivo de garantir a estabilidade do leite ao teste do álcool em todas as vacas. Na fase indução, os animais permaneceram em restrição alimentar de 50% do previsto para suas exigências nutricionais de energia e proteína (dieta 50E+50P) durante quatro dias para induzir a perda da estabilidade ao teste do álcool e na fase de recuperação os animais foram submetidos durante sete dias a uma de três dietas experimentais para recuperação da instabilidade do leite ao teste do álcool em cada período experimental: suprimento somente de energia (dieta 100E+50P), somente de proteína (50E+100P) ou de energia e proteína (dieta 100E+100P).

#### *Alimentos e análises bromatológicas*

As dietas foram calculadas de acordo com as exigências previstas no NRC (2001), e os alimentos fornecidos aos animais duas vezes ao dia, após as ordenhas. Amostras dos alimentos oferecidos e amostras de eventuais sobras foram congeladas sob temperatura de -20°C e posteriormente analisadas para Proteína Bruta (PB), a partir da mensuração de Nitrogênio total pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995) e Fibra em Detergente Neutro e Fibra em Detergente Ácido por método proposto por Van Soest et al., (1991), utilizando Fiber Analyzer Ankom®.

#### *Manejo dos animais e coletas de leite*

As vacas foram ordenhas mecanicamente duas vezes ao dia (7h e as 17h), em sala de ordenha disposta em formato espinha de peixe 2 x 4. Os dados de produção de leite foram registrados em todas as ordenhas, através de medidor WAIKATO® Multi Meter aprovado pelo ICAR (*International Committee for Animal Recording*). A correção da produção de

leite para 4% de gordura foi realizada pela equação: Produção de leite  $\times [0,4 + (\% \text{ de gordura} \times 0,15)]$ . Amostras de leite foram coletadas a cada ordenha e enviadas em frascos contendo bronopol para o Laboratório da Universidade do Contestado (CIDASC/UnC), Concórdia/SC, onde foram analisadas para: gordura, proteína, lactose e nitrogênio uréico no leite (NUL) por infravermelho (*Bentley Combisystem, Bentley Instruments®*, Inc., U.S.A ) e Contagem de Células Somáticas (CCS) através de citometria de fluxo (*Delta Combiscope, Advanced Instruments®*, Inc., U.S.A). A contagem de células somáticas foi transformada para ECS (Escore de Células Somáticas) pela seguinte equação : $ECS = \log_2 (CCS/100.000) + 3$ .

Também foram coletadas amostras a cada ordenha para análises físico-químicas, sendo armazenadas em refrigeração 3-8°C e analisadas 12 horas após a coleta. O teste do álcool consistiu da mistura de 2 mL de leite com igual quantidade de álcool em concentrações variando de 56 a 82% v/v., com intervalos de 2%, sendo que as amostras de leite que perderam a estabilidade com álcool  $\leq 72\%$  v/v e apresentaram acidez titulável menor igual a 18°D foram consideradas como instáveis. Acidez titulável foi realizada por titulação com solução de 0,1 N de NaOH e o pH através de potenciometria.

Nos dias 1, 13, 17 e 24 de cada período experimental, após a ordenha matinal e antes do fornecimento de alimento, as vacas foram pesadas e realizada avaliação do escore de condição corporal, utilizando-se metodologia proposta por Ferguson *et al.* (1994), a qual consiste da visualização de sete regiões no animal, utilizando escala de 1 a 5.

### *Análises Estatísticas*

Os dados da fase de recuperação da instabilidade do leite foram submetidos à análise de variância utilizando-se o procedimento MIXED do pacote estatístico SAS (2008)<sup>®</sup>.

Foram analisadas a concentração de álcool necessária para induzir a perda da estabilidade do leite, produção de leite e composição (gordura, proteína, lactose, nitrogênio uréico e contagem de células somáticas), consumo de alimentos, peso vivo e escore de condição corporal. O modelo estatístico foi composto pelas variáveis explanatórias dieta de recuperação da instabilidade, período experimental, vaca e dia aninhado em dieta. Para as variáveis: concentração de álcool necessária para induzir a perda da estabilidade do leite, produção de leite, nitrogênio uréico no leite e consumo foram feitas análise de regressão linear em função dos dias de recuperação da instabilidade, utilizando-se o procedimento REG. A normalidade dos resíduos foi previamente testada, empregando-se o teste de Shapiro Wilks e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5%. Análise conjunta das variáveis estabilidade teste do álcool, produção e composição do leite, consumo de alimentos e dietas fornecidas durante o período de recuperação foram analisadas através de análise multivariada (análise fatorial) utilizando-se os procedimentos STANDARD e FACTOR do pacote estatístico SAS.

#### 4.4 RESULTADOS

##### *Consumo de alimentos*

As dietas para recuperação da instabilidade do leite ao teste do álcool afetaram os consumos de Matéria Seca (MS), Nutrientes Digestíveis Totais (NDT) e Proteína Bruta (PB) ( $P < 0,0001$ ) e Fibra em Detergente Neutro (FDN) ( $P < 0,05$ ) (Tabela 2 e Figura 1). Vacas recebendo dietas que atendem as exigências de energia e proteína (100E+100P) apresentaram os maiores consumos de MS e NDT, seguidas de dietas que suprimiram somente energia (100E+50P) e proteína (50E+100P), respectivamente. Vacas recebendo dietas que atendem as exigências de energia e proteína (100E+100P), também tiveram

maior consumo de PB, seguida da dieta 50E+100P e 100E+50P. Já o consumo de FDN foi maior quando as vacas receberam a dieta que atendia somente as exigências de energia na dieta (100E+50P), seguida do atendimento das exigências de ambas (dieta 100E+100P) e dietas que atenderam a exigência de proteína (50E+100P). Na Figura 1 observa-se que os consumos de MS e nutrientes mantiveram-se estáveis durante o período de recuperação da instabilidade ao álcool, sendo que as equações demonstradas graficamente não foram significativas ( $P>0,05$ ). Durante as fases de adaptação e indução, como as dietas foram as mesmas em todos os tratamentos, os consumos médios são similares para os diferentes tratamentos.

#### *Peso vivo e Escore de Condição Corporal (ECC)*

Peso vivo e o ECC foram influenciados pelas dietas de recuperação da instabilidade ao teste de álcool ( $P<0,0001$  e  $P=0,0002$ , respectivamente) (Tabela 2). Somente vacas submetidas a dietas deficientes em energia (50E+100P) apresentaram redução de peso vivo e de ECC, não havendo alteração quando receberam dietas pobres em proteína (100E+50P), em relação à dieta testemunha (100E+100P).

#### *Análises físico-químicas, composição, nitrogênio uréico no leite (NUL) e escore de células somáticas (ECS)*

A quantidade de álcool necessária para o leite formar coágulos, ou seja, perder a estabilidade ao teste do álcool foi afetada pelos tratamentos ( $P=0,0005$ ), apresentando-se maior na dieta que atende as exigências de energia e proteína (100E+100P), seguida por atendimento da exigência somente de energia (100E+50P) e atendimento da exigência somente de proteína (50E+100P), respectivamente (Tabela 3). Ocorreu ainda aumento nas concentrações de álcool necessárias para

coagular o leite em função dos dias do tratamento nas dietas 100E+100P e 100E+50P, e diminuição na dieta 50E+100P (Figura 2). Os tratamentos não tiveram efeito sobre pH e acidez titulável (Tabela 3).

A composição do leite foi afetada pelos tratamentos ( $P < 0,0001$ ) (Tabela 3). O teor de gordura foi maior no tratamento com dieta que atende somente a exigência de proteína (50E+100P), não tendo diferenças entre os demais tratamentos. O teor de proteína apresentou foi maior no tratamento com dieta que atende ambas exigências (100E+100P), seguida por dieta que atende somente exigência de proteína (50E+100P). O teor de lactose no leite foi maior no tratamento com dietas que atenderam exigência somente de energia (100E+50P), seguida do atendimento de ambas (100E+100P). A concentração de nitrogênio uréico no leite (NUL) foi maior na dieta que atendeu somente as exigências de proteína (50E+100P), seguido por ambas (100E+100P) e níveis mais baixos com dieta que atende somente exigência de energia (50E+100P), sendo que nesta dieta houve uma diminuição linear ( $P = 0,0023$ ) com o avanço dos dias de tratamento (Figura 4). O ECS não diferiu entre os tratamentos ( $P = 0,2195$ ) (Tabela 3).

### *Produção de leite*

A produção de leite foi influenciada pelos tratamentos ( $P < 0,0001$ ) (Tabela 3), sendo que a maior produção foi no tratamento com dietas que atenderam as exigências de energia e proteína (100E+100P), seguido pela dieta que atendeu somente exigência de energia (100E+50P) e por último a dieta que atendeu somente a exigência de proteína (50E+100P). Destaca-se que a dieta 100E+100P possibilitou a recuperação na produção de leite ( $P < 0,0001$ ) ao longo dos dias de tratamento (Figura 3), o que não ocorreu com as demais dietas.

### *Análise multivariada*

A relação entre as dietas ofertadas aos animais com o consumo de alimentos, estabilidade do leite ao teste do álcool, produção e composição do leite pode ser visualizada através da análise multivariada (Figura 5). Observa-se na primeira dimensão na Figura 5-A, que dietas com elevada energia e consequente elevado consumo de MS e NDT estão relacionadas à maior estabilidade do leite ao teste do álcool e a produção de leite, bem como o maior teor de lactose, que por sua vez estão relacionadas negativamente ao teor de gordura e NUL. Na segunda dimensão observa-se que dietas ricas em proteína e consequente maior consumo deste nutriente estão relacionadas à maior teor de proteína no leite e NUL.

Na análise fatorial sem considerar as ofertas de energia e proteína na dieta (Figura 5-B) as relações entre consumo, estabilidade, produção e composição do leite foram semelhantes às da análise anterior.

## 4.5 DISCUSSÃO

Os consumos de MS, PB e NDT durante o período de indução (Tabela 2 e figura 1) são condizentes com o esperado em função das dietas restritivas fornecidas, visando a indução de instabilidade do leite ao teste do álcool. A restrição alimentar com consequente redução do consumo de energia e proteína pelos animais na fase de indução ocasionou a rápida perda da estabilidade do leite ao teste do álcool, bem como também, alterações significativas na produção e composição do leite (Figuras 2, 3 e 4). Este efeito foi estudado anteriormente através da redução do fornecimento de 60% (Zanela *et al.*, 2006), 50% (Fruscalso *et al.*, 2013, Stumpf *et al.*, 2013) e de 40 e 30% (Barbosa *et al.*, 2012) do alimento em comparação ao ofertado aos animais do grupo controle. Nestes trabalhos, respostas diferentes foram encontradas para a produção e

composição do leite, bem como variações no peso vivo e escore de condição corporal, o que pode ser explicado pelas diferenças na severidade e duração da restrição, do potencial de produção de leite, e período de lactação dos animais. O efeito da deficiência nutricional sobre a estabilidade do leite também foi demonstrado, de forma indireta, em trabalhos que demonstraram variação sazonal na estabilidade do leite, sendo que nas épocas do ano em que ocorre diminuição natural da oferta de pastagens aos animais, com aumento da ocorrência de instabilidade no outono (Botaro *et al.*, 2009, Zanela *et al.*, 2009, Battaglini *et al.*, 2013).

No período de recuperação desta instabilidade, com a dieta que atende as exigências de energia e proteína (100E+100P), os consumos de MS, PB e NDT retornaram rapidamente aos níveis apresentados durante o período de adaptação, resultando na rápida recuperação da instabilidade do leite ao teste do álcool, bem como em maior produção de leite e concentrações de lactose, o que deve estar relacionado ao maior aporte nutricional às vacas com estas dietas. Estes resultados corroboram com o trabalho de Marques *et al.* (2010), no qual a recuperação da instabilidade do leite ao teste do álcool só foi possível com o fornecimento de níveis adequados de energia e proteína.

A dieta utilizada para avaliar a possibilidade de recuperação da instabilidade somente através da adequação dos níveis de proteína, proporcionou o menor consumo de MS e NDT (Tabela 2 e Figura 1), devido à restrição na oferta de alimentos nesse tratamento. Tal fato ocasionou a diminuição severa na produção de leite (Tabela 3 e Figura 3), o que pode ter ocorrido pela diminuição na expressão de genes transportadores de glicose bem como menor suprimento da mesma para a glândula mamária (Boutinaud *et al.*, 2008), pelo menor fornecimento de nutrientes para a glândula mamária devido a diminuição do débito cardíaco (Guinard-Flament *et al.*, 2006, Guinard-Flament *et al.*, 2007), ou ainda pela

diminuição na proliferação do epitélio mamário (Nørgaard *et al.*, 2005). Ocorreu também a diminuição do teor de lactose no leite, que pode ser consequência de alterações na permeabilidade das junções firmes da glândula mamária, fazendo com que a lactose passe para a corrente sanguínea e diminua-a no leite, efeito observado por Stelwagen *et al.* (2000) em vacas induzidas a estresse, bem como por Stumpf *et al.* (2013), após restrição alimentar de 50%.

Animais em balanço energético negativo induzido pela menor fornecimento energético perdem peso e condição corporal (Gross *et al.*, 2011, Laeger *et al.*, 2012) devido à metabolização das reservas para a produção de glicose e consequente utilização na produção de leite, o que acarretou em grande perda de peso e consequentemente, diminuição no escore de condição corporal na recuperação, associada a maior teor de gordura no leite (Tabela 2). O maior teor de gordura nesta dieta, em relação às demais está de acordo com os resultados obtidos por Marques *et al.* (2010), quando as menores concentrações de gordura no leite estão associadas às maiores perdas de peso vivo e no escore corporal. Outro fator que pode estar relacionado com o maior teor de gordura no leite é a diminuição na produção de leite neste período. Nesta dieta ainda foi observado a maior concentração de NUL, a qual segundo Aguilar *et al.* (2012), está associada a ração desbalanceada, o que também pode ser observada no presente trabalho.

Na recuperação da instabilidade do leite com dietas que atendem somente as exigências de energia (dieta 100E+50P), observou-se alguma melhora na estabilidade do leite ao passar dos dias, porém sem atingir concentrações de álcool necessárias para perder a estabilidade acima de 72% v/v. Houve redução no consumo da MS em relação ao grupo controle (dieta 100E+100P), fato este que possivelmente está relacionado a baixa oferta de proteína na dieta, o que ocasionou os menores teores de NUL dentre os tratamentos. Em

trabalhando avaliando a restrição ou adição de proteína a dieta, Law *et al.* (2009) observaram que vacas com melhor atendimento de proteína aumentam a ingestão de matéria seca e consequentemente, a produção de leite.

A análise multivariada indica uma relação mais próxima dos níveis de energia na dieta de recuperação com maior consumo de alimentos, maior estabilidade do leite ao teste do álcool, produção de leite e o teor de lactose (Figura 5), o que se deve ao fato de que além da dieta com alta energia e proteína apresentar maior consumo de alimentos, com consequente produção e estabilidade do leite, as dietas em que somente a energia foi corrigida, apresentaram valores intermediários para estas variáveis (Tabela 3), em relação à dieta em que somente a proteína foi corrigida. Por outro lado, dietas com elevada oferta de proteína proporcionaram, além do aumento de consumo deste nutriente, teores mais elevados de NUL e proteína no leite.

#### 4.6 CONCLUSÃO

A recuperação da instabilidade do leite ao teste do álcool em vacas que sofreram restrição de energia e proteína ocorre somente com o fornecimento de dietas que atendem as exigências de ambos os nutrientes. Dietas que atendem somente as exigências de energia apresentam alguma melhora na recuperação da instabilidade do leite, porém dietas que atendem somente as exigências de proteína agravam a instabilidade do leite ao longo do tempo e levam à diminuição do peso vivo e escore corporal.

#### 4.7 AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo a Pesquisa e a Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pelo suporte financeiro para a execução da pesquisa.

## REFERÊNCIAS

AGUILAR, M.; HANIGAN, M.D.; TUCKER, H.A.; JONES, B.L.; GARBADE, S.K.; MCGILLIARD, M.L.; STALLINGS, C.C.; KNOWLTON, K.F.; JAMES, R.E. Cow and herd variation in milk urea nitrogen concentrations in lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p.7261-8, 2012.

BARBOSA, R.S.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M.E.R.; ZANELA, M.B.; STUMPF, M.T.; KOLLING, G.J.; SCHAFHÄUSER JÚNIOR, J.; BARROS, L.E.; EGITO, A.S.D. Caracterização eletroforética de proteínas e estabilidade do leite em vacas submetidas à restrição alimentar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p.621-628, 2012.

BATTAGLINI, A.P.P.; BELOTI, V.; FAGNANI, R.; TAMANINI, R.; DUNGA, K.S. Caracterização físico-química e microbiológica do leite bovino instável não ácido em função das estações do ano. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 35, p.26-32, 2013.

BOTARO, B.G.; LIMA, Y.V.R.D.; CORTINHAS, C.S.; SILVA, L.F.P.E.; RENNÓ, F.P.; SANTOS, M.V.D. Effect of the kappa-casein gene polymorphism, breed and seasonality on physicochemical characteristics, composition and stability of bovine milk. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p.2447-2454, 2009.

BOUMPA, T.; TSILOULPAS, A.; GRANDISON, A.S.; LEWIS, M.J. Effects of phosphates and citrates on sediment formation in UHT goats' milk. **Journal of Dairy Research**, v. 75, p.160-166, 2008.

BOUTINAUD, M.; BEN CHEDLY, M.H.; DELAMAIRE, E.; GUINARD-FLAMENT, J. Milking and Feed Restriction Regulate Transcripts of Mammary Epithelial Cells Purified from Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p.988-998, 2008.

BRASIL. Instrução Normativa N 62. Brasil: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento MAPA 2011.

FERGUSON, J.D.; GALLIGAN, D.T.; THOMSEN, N. Principal Descriptors of Body Condition Score in Holstein Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p.2695-2703, 1994.

FERRARETTO, L.F.; GENCOGLU, H.; HACKBART, K.S.; NASCIMENTO, A.B.; DALLA COSTA, F.; BENDER, R.W.; GUENTHER, J.N.; SHAVER, R.D.; WILTBANK, M.C. Effect of feed restriction on reproductive and metabolic hormones in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p.754-763, 2014.

FISCHER, V.; RIBEIRO, M.E.R.; ZANELA, M.B.; MARQUES, L.T.; ABREU, A.S.D.; MACHADO, S.C.; FRUSCALSO, V.; BARBOSA, R.S.; STUMPF, M.T. Leite instável não ácido: um problema solucionável? **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, p.838-849, 2012.

FRUSCALSO, V.; STUMPF, M.T.; MCMANUS, C.M.; FISCHER, V. Feeding restriction impairs milk yield and physicochemical properties rendering it less suitable for sale. **Scientia Agricola**, v. 70, p.237-241, 2013.

GROSS, J.; VAN DORLAND, H.A.; BRUCKMAIER, R.M.; SCHWARZ, F.J. Performance and metabolic profile of dairy cows during a lactational and deliberately induced negative energy balance with subsequent realimentation. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p.1820-1830, 2011.

GUINARD-FLAMENT, J.; DELAMAIRE, E.; LAMBERTON, P.; PEYRAUD, J.L. Adaptations of Mammary Uptake and Nutrient Use to Once-Daily Milking and Feed Restriction in Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p.5062-5072, 2007.

GUINARD-FLAMENT, J.; DELAMAIRE, E.; LEMOSQUET, S.; BOUTINAUD, M.; DAVID, Y. Changes in mammary uptake and metabolic fate of glucose with once-daily milking and feed restriction in dairy cows. **Reproduction Nutrition Development**, v. 46, p.589-98, 2006.

HORNE, D. Ethanol stability. In: FOX, P. F. M., P.L.H. (Ed.). **Advanced dairy chemistry: proteins**. New York: Kluwer Academic. 2003. p.975-1000

LAEGER, T.; GÖRS, S.; METGES, C.C.; KUHLA, B. Effect of feed restriction on metabolites in cerebrospinal fluid and plasma of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p.1198-1208, 2012.

LAW, R.A.; YOUNG, F.J.; PATTERSON, D.C.; KILPATRICK, D.J.; WYLIE, A.R.G.; MAYNE, C.S. Effect of dietary protein content on animal production and blood metabolites of dairy cows during lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p.1001-1012, 2009.

MARQUES, L.T.; FISCHER, V.; ZANELA, M.B.; RIBEIRO, M.E.R.; STUMPF JUNIOR, W.; MANZKE, N. Fornecimento de suplementos com diferentes níveis de energia e proteína para vacas Jersey e seus efeitos sobre a instabilidade do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p.2724-2730, 2010.

NØRGAARD, J.; SØRENSEN, A.; SØRENSEN, M.T.; ANDERSEN, J.B.; SEJRSEN, K. Mammary Cell Turnover and Enzyme Activity in Dairy Cows: Effects of Milking Frequency and Diet Energy Density. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p.975-982, 2005.

**NRC. Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Seventh Revised Edition, 2001:** The National Academies Press. 2001

OMOARUKHE, E.D.; ON-NOM, N.; GRANDISON, A.S.; LEWIS, M.J. Effects of different calcium salts on properties of milk related to heat stability. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, p.504-511, 2010.

SAS, I.I., CARY, NC. **Statistical Analysis Systems Institute (SAS)**. 2008

STELWAGEN, K.; HOPSTER, H.; VAN DER WERF, J.T.N.; BLOKHUIS, H.J. Short Communication: Effects of Isolation Stress on Mammary Tight Junctions in Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p.48-51, 2000.

STUMPF, M.T.; FISCHER, V.; MCMANUS, C.M.; KOLLING, G.J.; ZANELA, M.B.; SANTOS, C.S.; ABREU, A.S.; MONTAGNER, P. Severe feed restriction increases permeability of mammary gland cell tight junctions and reduces ethanol stability of milk. **Animal**, v. 7, p.1137-1142, 2013.

WHELAN, S.J.; PIERCE, K.M.; FLYNN, B.; MULLIGAN, F.J. Effect of supplemental concentrate type on milk production and metabolic status in early-lactation dairy cows grazing perennial ryegrass-based pasture. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p.4541-4549, 2012.

ZANELA, M.B.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M.E.R.; BARBOSA, R.S.; MARQUES, L.T.; STUMPF JUNIOR, W.; ZANELA, C. Leite instável não-ácido e composição do leite de vacas Jersey sob restrição alimentar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p.835-840, 2006.

ZANELA, M.B.; RIBEIRO, M.E.R.; FISCHER, V.; GOMES, J.F.; STUMPF JR., W. Ocorrência do leite instável não ácido no noroeste do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p.1009-1013, 2009.

**Tabela 1-** Quantidade e composição dos alimentos fornecidos nas diferentes fases experimentais, com dietas visando suprir 50 ou 100% das exigências de energia (E) e proteína (P).

---

<b>Alimentos</b>	<b>Composição</b>	<b>Dietas Experimentais<sup>2</sup></b>
------------------	-------------------	---

---

Fornecidos	Bromatológica <sup>1</sup>				(kg/vaca/dia)			
	MS (%)	PB (%)	FD (%)	NDT (%)	Indução		Recuperação	
					50E+50P	100E +100P <sup>3</sup>	100E+ 50P	50E +100P
Silagem de Milho	29	6	52,9	65,83	10	32	32	-
Pré-secado de Tifton	72,2	9,9	72,9	54	10	4	6	12
Farelo de Soja	87,2	53,9	15,1	84,9	1,2	4	-	0,5
Soja Tostada	91	43	22,1	98,75	-	-	-	2,7
Milho moído	88,1	9,4	9,5	84,98	-	3,4	4,4	-
Núcleo Mineral <sup>4</sup>	-	-	-	-	0,3	0,4	0,4	0,4
Sal comum	-	-	-	-	0,05	-	-	-
Bicarbonato de Sódio	-	-	-	-	-	0,16	0,16	-

<sup>1</sup>MS = Matéria Seca, PB = Proteína Bruta, FDN = Fibra em Detergente Neutro, NDT = Nutrientes Digestíveis Totais

<sup>2</sup>E= Energia, P= Proteína; <sup>3</sup>Dieta também utilizada na fase de adaptação;

<sup>4</sup>Núcleo Mineral: em g/kg min Ca 190, P 60, S 20, Mg 20, K 35, Na 70, em mg/kg Co 15, Cu 700, Cr 10, Fe 700, I 40, Mn 1600, Se 19, Zn 2500, UI/kg vit A 200000, Vit D3 50000, Vit E 1500, F(max) 600 mg/kg.

Fonte: Próprio autor.

**Tabela 2** – Médias e erro-padrão das médias (EPM) do peso vivo, escore de condição corporal e consumo de alimentos, de acordo com as dietas visando suprir as exigências de energia (100E+50P), proteína (50E+100P) ou ambas (100E+100P), no período de recuperação da instabilidade do leite.

Variáveis <sup>1</sup>	Dieta			EPM <sub>2</sub>	P
	100E+100 P	100E+50 P	50E+100 P		
ECC	2,63 <sup>a</sup>	2,72 <sup>a</sup>	2,37 <sup>b</sup>	0,05	=0,000 2
Peso vivo (kg)	524,75 <sup>a</sup>	521,17 <sup>a</sup>	470,83 <sup>b</sup>	6,88	<0,000 1
Consumo MS (kg)	18,18 <sup>a</sup>	17,22 <sup>b</sup>	11,96 <sup>c</sup>	0,14	<0,000 1
Consumo PB (kg)	2,88 <sup>a</sup>	1,28 <sup>c</sup>	2,15 <sup>b</sup>	0,01	<0,000 1
Consumo NDT (kg)	12,6 <sup>a</sup>	11,29 <sup>b</sup>	7,48 <sup>c</sup>	0,08	<0,000 1
Consumo FDN (kg)	7,19 <sup>b</sup>	7,92 <sup>a</sup>	6,92 <sup>c</sup>	0,09	=0,019 0

<sup>1</sup>ECC= Escore de Condição Corporal, MS= Matéria Seca, PB= Proteína Bruta, NDT= Nutrientes Digestíveis Totais, FDN= Fibra em Detergente Neutro; <sup>2</sup>Erro-padrão das médias

<sup>a,b,c</sup>Médias com letras diferentes na linha diferem pelo teste de Tukey (P < 0,05)

Fonte: Próprio autor.

**Tabela 3** - Médias e erro-padrão das médias (EPM) da estabilidade ao teste do álcool, produção e composição do leite de acordo com de acordo com as dietas visando suprir as exigências de energia (100E+50P), proteína (50E+100P) ou ambas (100E+100P), no período de recuperação da instabilidade do leite.

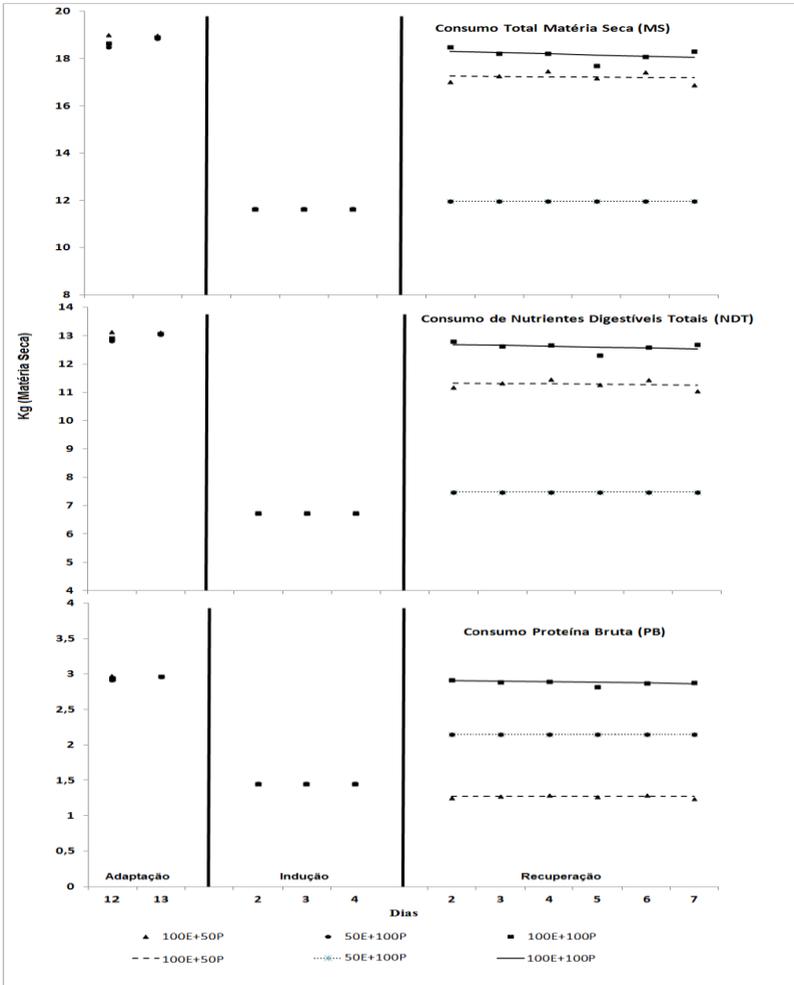
Variáveis <sup>1</sup>	Dieta			EPM <sup>2</sup>	P
	100E+100P	100E+50P	50E+100P		
ECC	2,63 <sup>a</sup>	2,72 <sup>a</sup>	2,37 <sup>b</sup>	0,05	=0,0002
Peso vivo (kg)	524,75 <sup>a</sup>	521,17 <sup>a</sup>	470,83 <sup>b</sup>	6,88	<0,0001
Consumo MS (kg)	18,18 <sup>a</sup>	17,22 <sup>b</sup>	11,96 <sup>c</sup>	0,14	<0,0001
Consumo PB (kg)	2,88 <sup>a</sup>	1,28 <sup>c</sup>	2,15 <sup>b</sup>	0,01	<0,0001
Consumo NDT (kg)	12,6 <sup>a</sup>	11,29 <sup>b</sup>	7,48 <sup>c</sup>	0,08	<0,0001
Consumo FDN (kg)	7,19 <sup>b</sup>	7,92 <sup>a</sup>	6,92 <sup>c</sup>	0,09	=0,0190

<sup>1</sup>Erro-padrão das médias

<sup>a,b,c</sup>Médias com letras diferentes na linha diferem pelo teste de Tukey (P < 0,05)

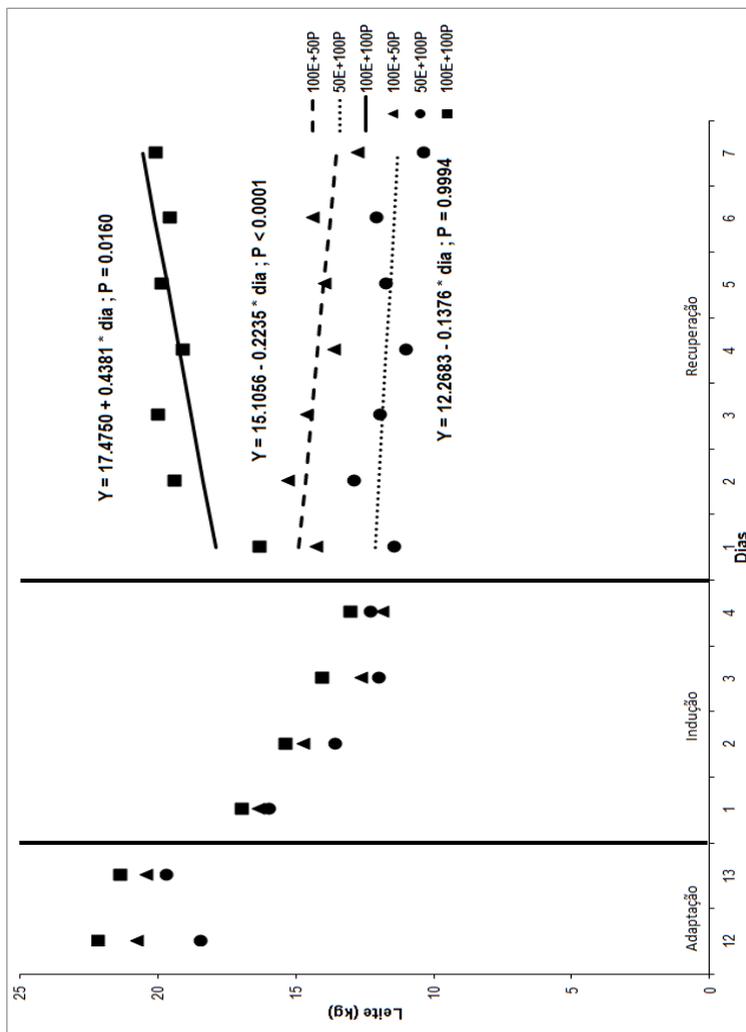
Fonte: Próprio autor.

**Figura 1** - Valores médios e regressões para consumo diário de Matéria Seca (MS), Proteína Bruta (PB) e Nutrientes Digestíveis Totais (NDT) nos últimos dias de adaptação e no período de indução a perda da estabilidade do leite e, regressão linear em função dos dias de tratamento, para dietas visando suprir as exigências de energia (100E+50P), proteína (50E+100P) ou ambas (100E+100P).



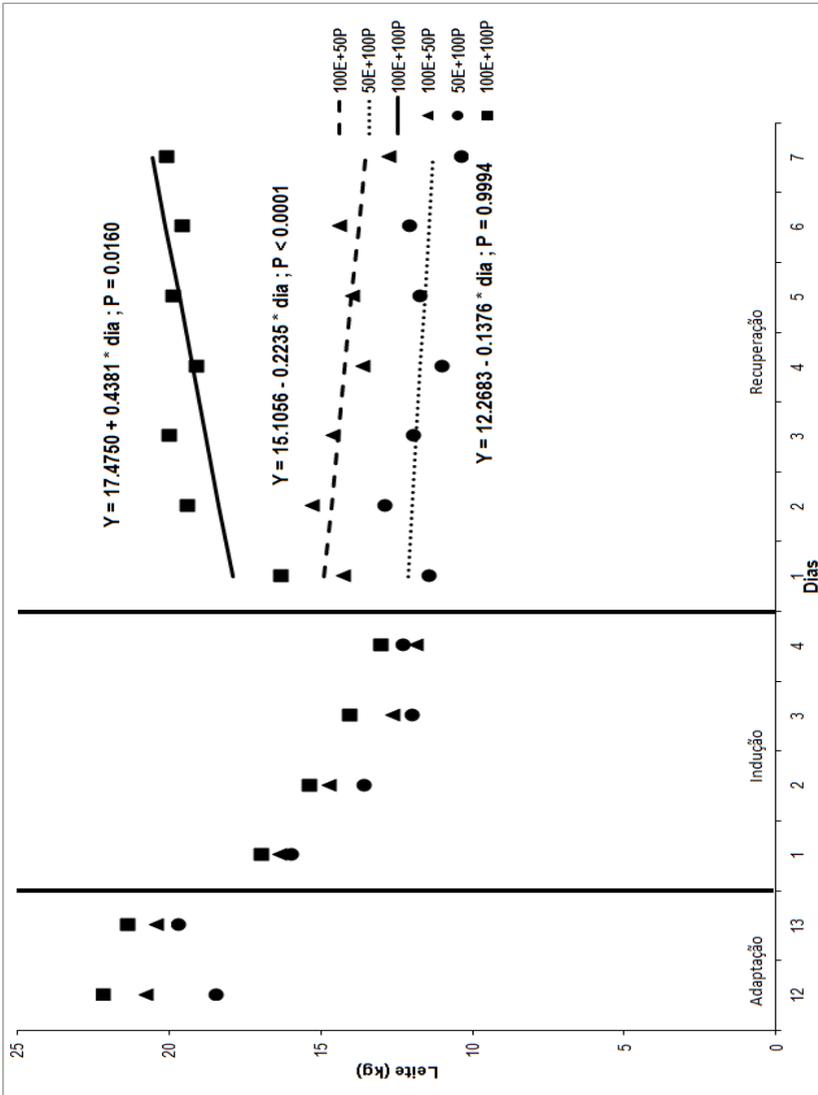
Fonte: Próprio autor.

**Figura 2** - Concentração média de álcool em que ocorreu a coagulação do leite nos últimos dias de adaptação e no período de indução a perda da estabilidade do leite e, regressão linear da concentração de álcool em função dos dias de tratamento, para dietas visando suprir as exigências de energia (100E+50P), proteína (50E+100P) ou ambas (100E+100P).



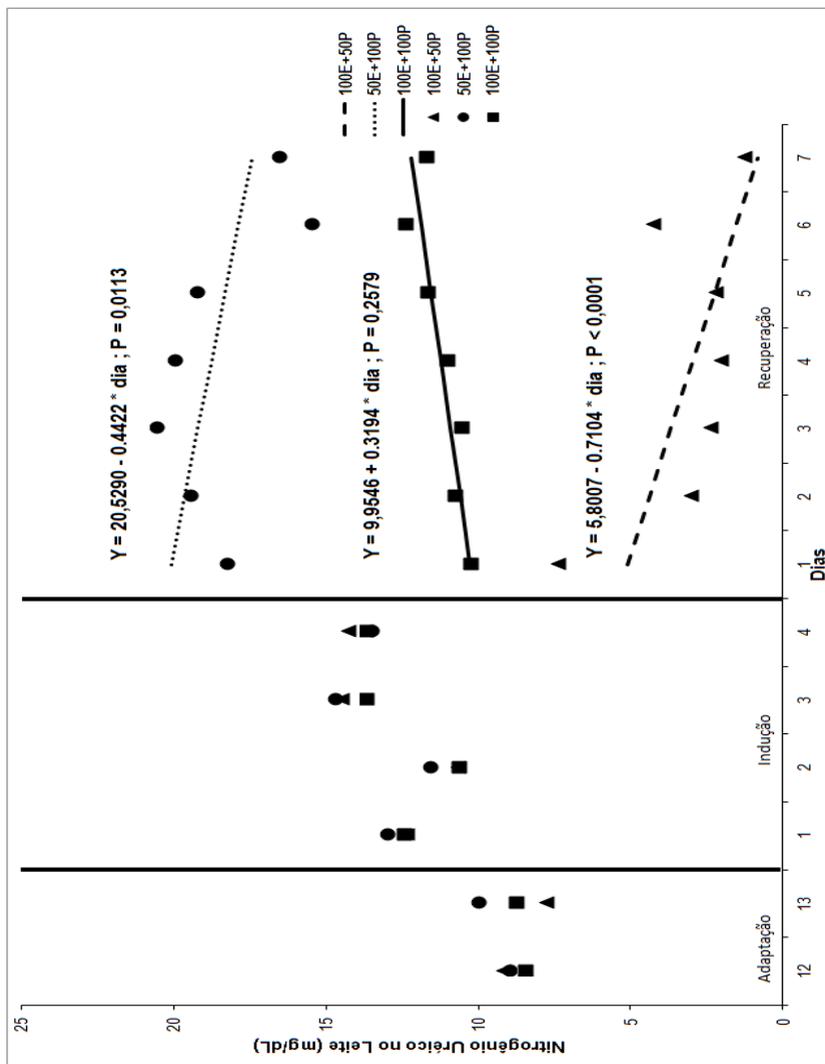
Fonte: Próprio autor.

**Figura 3** - Produção média de leite nos últimos dias de adaptação e no período de indução a perda da estabilidade do leite e, regressão linear da concentração de álcool em função dos dias de recuperação, para dietas visando suprir as exigências de energia (100E+50P), proteína (50E+100P) ou ambas (100E+100P).



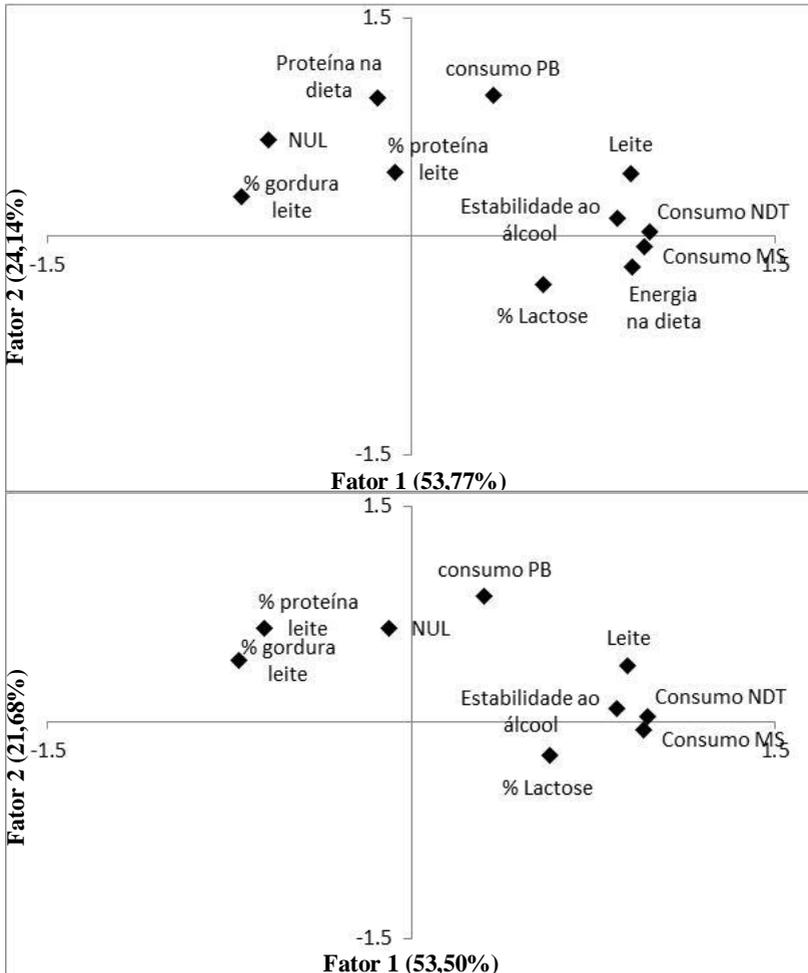
Fonte: Próprio autor.

**Figura 4** - Teor Médio de Nitrogênio Uréico no leite (NUL) nos últimos dias de adaptação e no período de indução a perda da estabilidade do leite e, regressão linear da concentração de álcool em função dos dias de recuperação, para dietas visando suprir as exigências de energia (100E+50P), proteína (50E+100P) ou ambas (100E+100P).



Fonte: Próprio autor.

**Figura 5** - Análise multivariada das variáveis consumo de alimentos, estabilidade do leite ao teste do álcool, produção e composição do leite avaliadas juntamente com a oferta de energia e proteína nas dietas (A) ou na ausência destas variáveis (B).



Fonte: Próprio autor.