

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS CAV
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**EFEITO DO ESTRESSE CALÓRICO E DA INSOLAÇÃO EM VACAS
LEITEIRAS SOBRE O CONSUMO, INDICADORES BIOQUÍMICOS,
PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO E QUALIDADE DO LEITE**

ADRIANA HAUSER

LAGES, SC

AGOSTO, 2021

ADRIANA HAUSER

**EFEITO DO ESTRESSE CALÓRICO E DA INSOLAÇÃO EM VACAS
LEITEIRAS SOBRE O CONSUMO, INDICADORES BIOQUÍMICOS,
PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO E QUALIDADE DO LEITE**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciência Animal no Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. André Thaler Neto

Coorientador: Luiz Cláudio Milette

LAGES, SC

AGOSTO, 2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Hauser, Adriana

Efeito do Estresse Calórico e da Insolação em Vacas Leiteiras Sobre o Consumo, Indicadores Bioquímicos, Proteínas de Choque Térmico e Qualidade do Leite / Adriana Hauser - Lages, 2021.

125p. : il. ; 21 cm

Orientador: André Thaler Neto

Coorientador: Luiz Cláudio Miletto

Inclui bibliografia

Tese (doutorado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2021.

1. calor a. 2. metabolismo b. 3. composição do leite c. 4. estabilidade térmica do leite d. 5. raças e. 6. chaperonas f. I. Hauser, Adriana. II. Thaler Neto, André. III. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título

Ata da banca

Efeito do estresse calórico e da insolação em vacas leiteiras sobre o consumo, indicadores bioquímicos, proteínas de choque térmico e qualidade do leite

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós – Graduação em Ciência Animal na Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal.

Banca Examinadora:

Orientador: _____
Prof. Dr. André Thaler Neto
CAV – UDESC, Lages, SC.

Membro: _____
Prof. Dr. Félix Hilário Diaz Gonzalez
UFRGS, Porto Alegre, RS.

Membro: _____
Dr. Sandro Charopen Machado
UCEFF, Chapecó, SC.

Membro: _____
Prof. Dr. Henrique M. N. Ribeiro Filho
CAV – UDESC, Lages, SC.

Membro: _____
Prof. Dr. Gustavo Felipe da Silva
CAV – UDESC, Lages, SC.

**LAGES, SC,
AGOSTO, 2021**

Belo...
Intenso...
E um dia se foi...
Sem nunca dizer que iria...
Sem nunca dizer adeus...

Por que as flores morrem?

Hoje percebo...
A vida passando...
Os dias terminando...
As lembranças pesando...

Nunca deixe de dizer adeus...

Olhe nos olhos...
Abrace enquanto puder...
Sorria.... com ternura e paixão...
O presente é nosso...
Mas o futuro... o futuro não nos pertence...

Novos ventos...
Novas estações...
Novas flores...
Cheias de cor e surpresas...

Nunca deixe de ter esperança...

Flores não morrem nunca...
Acredite...
Quando menos esperamos... ressurgem cheias de brilho e cor...
Para mudar a vida...

Não... não... nunca diga adeus...
Flores não morrem nunca...

A.H.

A quem me incentivou e apoiou...
E nunca desistir das coisas que nos fazem sorrir...

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela existência...

Aos meus pais e irmãos Elise, Rainer e Caroline, meu filho Henrique, pelo apoio, paciência, ajuda e palavras de ânimo. Sou grata em ter vocês, mesmo distantes, perto.

Aos meus amigos queridos, que mesmo na minha ausência, estavam comigo.

A todos os colegas que me ajudaram nesse trabalho de pesquisa, Angélica, Gabriela, Luiz Flávio, Leonardo, Roberto, Laiz, Bruna e Izabelly. Um agradecimento especial ao meu amigo e colega Marciél França, pelas ideias, discussões e risadas. Muito obrigada a todos!

Ao meu orientador André Thaler Neto, pela amizade e orientação e por me ajudar a fazer esse projeto sair do papel.

Ao meu co-orientador Luiz Claudio Miletti, pela amizade e toda ajuda nas análises laboratoriais.

Agradeço também aos professores do Departamento de Produção Animal e Alimentos, que contribuíram para minha formação acadêmica.

À UDESC por propiciar minha formação acadêmica.

À UCEFF, à Profa. Tatiane Camacho Mendes e ao Prof. Sandro Charopen Machado, pelo apoio nesse projeto.

Muito Obrigada!

RESUMO

HAUSER, ADRIANA. **Efeito do Estresse Térmico Calórico e da Insolação em Vacas Leiteiras Sobre o Consumo, Indicadores Bioquímicos, Proteínas de Choque Térmico e Qualidade do Leite** 2021. 125p. Tese (Doutorado em Ciência Animal – Área: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2021.

A produção de leite tradicionalmente desenvolveu-se em regiões de clima temperado, e vem, nas últimas décadas migrando para regiões de clima subtropical e tropical, mais propensas a ocorrência de temperatura e umidade elevadas, fatores de estresse para vacas de raças leiteiras especializadas. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do estresse calórico e da insolação em vacas das raças Holandesas e Jersey confinadas e o papel das proteínas de choque térmico na adaptação dos animais ao estresse por calor. O trabalho foi desenvolvido em uma propriedade comercial com vacas alojadas em confinamento *Compost Bedded Pack Barn* com ventilação e sistema de aspersão na linha do cocho para resfriamento de vacas. Foram realizados dois experimentos, um com início em fevereiro de 2018 e o segundo, em fevereiro de 2020. No primeiro experimento, 16 vacas foram divididas em dois tratamentos, com 4 vacas Holandesas e 4 Jersey em cada tratamento: VA (ventilação e aspersão) e SVA (sem ventilação e aspersão). O alimento foi fornecido na forma de dieta total. O experimento compreendeu 14 dias de adaptação ao ambiente e manejo similares para os dois tratamentos e 5 dias experimentais, em que as vacas do tratamento VA continuaram com acesso a ventilação e aspersão e as vacas do tratamento SVA ficaram sem acesso a ventilação e aspersão. O consumo individual, indicadores bioquímicos e fisiológicos, produção de leite, composição e propriedades físico-químicas do leite foram avaliadas no último dia do período pré-experimental, considerado o dia 0 (D0) e nos dias 1 (D1), 3 (D3) e 5 (D5) do período experimental. Além disso, amostras de leite foram coletadas no D0 e D5, para a determinação de proteínas de choque térmico. No segundo experimento, 20 vacas foram divididas em dois tratamentos, com 5 vacas Holandês e 5 Jersey em cada: tratamento VA (ventilação e aspersão) e tratamento SVA+I (com 1 h de insolação diária e sem acesso a ventilação e aspersão). O experimento compreendeu 15 dias de adaptação ao ambiente e manejo similares para os dois tratamentos e 7 dias experimentais, em que o tratamento VA continuou com acesso a ventilação e aspersão e o tratamento SVA+I,

foi exposto a uma hora de insolação diariamente e ficou sem acesso a ventilação e aspersão. As avaliações de consumo, fisiológicas, produtivas e bioquímicas foram as mesmas do primeiro experimento. Os experimentos foram conduzidos em arranjo fatorial (Experimento 1: ambiente x dia; Experimento 2: raça x ambiente x dia), sendo os dados submetidos à análise de variância.

Palavras-chaves: Calor, metabolismo, composição do leite, estabilidade térmica do leite, raças, chaperonas.

ABSTRACT

HAUSER, ADRIANA. **Effect of heat stress and heat stroke in dairy cows on consumption, biochemical indicators, heat shock proteins and milk quality**. 2021. p. Thesis (Doctoral Thesis in Animal Science - Area: Animal Production) - State University of Santa Catarina. Postgraduate Study in Animal Science, Lages, 2021.

Milk production has traditionally developed in temperate climate regions, and in recent decades has been migrating to subtropical and tropical regions, more prone to the occurrence of high temperature and humidity, stress factors for cows of specialized dairy breeds. The objective of this work was to evaluate the effect of heat stress and insolation in confined Holstein and Jersey cows and the role of heat shock proteins in the adaptation of animals to heat stress. The work was carried out on a commercial farm with cows housed in a Compost Bedded Pack Barn feedlot with ventilation and a sprinkler system for cow cooling. Two experiments were carried out, one starting in February 2018 and the second in February 2020. In the first experiment, 16 cows were divided into two treatments, with 4 Holstein and 4 Jersey cows in each treatment: cooled (VA) and noncooled treatment (SVA). The experiment comprised 14 days of adaptation to the environment and similar management for the two treatments and 5 experimental days, in which the VA treatment cows continued to have access to cooling and the SVA treatment cows remained without access to cooling. Individual consumption, biochemical and physiological indicators, milk production, composition, and physicochemical characteristics of the milk were evaluated on the last day of the pre-trial period, considering day 0 (D0) and on days 1 (D1), 3 (D3), and 5 (D5) from the experimental period. In addition, milk samples were collected on D0 and D5, for the determination of heat shock proteins. In the second experiment, 20 cows were divided into two treatments, with 5 Holstein and 5 Jersey cows each: cooled (VA) and noncooled treatment (SVA+I, with 1h of daily insolation and no access to cooling). The experiment comprised 14 days of adaptation to the environment and similar management for the two treatments and 7 experimental days, in which the VA treatment continued with access to cooling and the SVA+I treatment, was exposed to one hour of insolation daily and remained without cooling. The consumption, physiological, productive, and biochemical evaluations were the same as in the first experiment. The experiments were carried out in a factorial

arrangement (Trial 1: environment x day; Trial 2: race x environment x day), and the data were subjected to analysis of variance.

Keywords: heat, metabolism, milk composition, thermal milk stability, breed, chaperones.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO III

- Figura 1.** Pontos de medida da temperatura superficial 57
- Figura 2.** Índice de Temperatura e Umidade (ITU) determinado durante o período experimental (PE) nos ambientes dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA (sem ventilação e aspersão) 62
- Figura 3.** (A) Consumo de matéria seca (CMS), (B) produção de leite, (C) teor de gordura e (D) teor de proteína das vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA (sem ventilação e aspersão) em função dos dias de tratamento 64
- Figura 4.** Teor de lactose, sólidos totais, nitrogênio ureico do leite (NUL), e escore de células somáticas (ECS) das vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA (sem ventilação e aspersão) em função dos dias de tratamento 65
- Figura 5.** Propriedades físico-químicas do leite avaliado nas vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA (sem ventilação e aspersão): A) teste do álcool, B) acidez titulável, C) pH; D) crioscopia em função dos dias de tratamento 67
- Figura 6.** Parâmetros fisiológicos avaliado nas vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA (sem ventilação e aspersão) em função dos dias de tratamento: a) Frequência respiratória da manhã (FR manhã), B) Temperatura superficial da manhã (TS manhã), C) Temperatura retal da manhã (TR manhã), d) Movimentos ruminais da manhã (MR manhã) 69
- Figura 7.** Parâmetros fisiológicos avaliados nas vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA (sem ventilação e aspersão) em função dos dias de tratamento: A) Frequência respiratória da tarde (FR tarde), B) Temperatura superficial da tarde (TS tarde), C) Temperatura retal da tarde (TR tarde), D) Movimentos ruminais da tarde (MR tarde) 70
- Figura 8.** Parâmetros bioquímicos avaliados nas vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA (sem ventilação e aspersão) em função dos dias de tratamento: A) Proteína total, B) Albumina, C) Globulina, D) Creatinina 72
- Figura 9.** Parâmetros bioquímicos avaliados nas vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA (sem ventilação e aspersão) em função dos dias de tratamento: A) Ureia, B) Glicose, C) Beta-hidroxibutirato 73

CAPÍTULO IV

Figura 1. Índice de temperatura e umidade (ITU) durante o período experimental (PE) nos ambientes dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA (sem ventilação e aspersão) 86

Figura 2. Representação esquemática do Western blot de amostras de leite do D0: M (marcador molecular, marcador Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder); 2 (vaca J do tratamento VA); 8 (vaca J do tratamento SVA) 86

CAPÍTULO V

Figura 1. Pontos de medida da temperatura superficial 95

Figura 2. Índice de temperatura e umidade (ITU) durante o período experimental (PE) nos ambientes dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA+I (com insolação e sem ventilação e aspersão) 99

Figura 3. Índice de carga térmica (ICT) durante o período experimental (PE) nos ambientes dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA+I (com insolação e sem ventilação e aspersão) 100

Figura 4. Consumo de matéria seca (CMS) e produção de leite das vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA+I (com insolação e sem ventilação e aspersão) em função dos dias de tratamento: A) CMS, B) consumo de matéria seca como % de peso vivo (CMS como % de PV), C) produção de leite, D) produção de leite corrigido a 3,5% de gordura 103

Figura 5. Eficiência e composição do leite das vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA+I (com insolação e sem ventilação e aspersão) em função dos dias de tratamento: A) eficiência alimentar, B) eficiência alimentar corrigida para 3,5% de gordura, C) teor de gordura, D) teor de proteína 104

Figura 6. Composição do leite das vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA+I (com insolação e sem ventilação e aspersão) em função dos dias de tratamento: A) teor de lactose, B) teor de sólidos totais, C) concentração de nitrogênio ureico do leite, D) escore de célula somáticas 105

Figura 7. Propriedades físico-químicas do leite produzido das vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA+I (com insolação e sem ventilação e aspersão) em função dos dias de tratamento: A) Teste do álcool, B) acidez titulável, C) pH e D) crioscopia 108

Figura 8. Parâmetros fisiológicos das vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA+I (com insolação e sem ventilação e aspersão) em função dos dias de tratamento: A) Frequência respiratória da manhã, B) Frequência cardíaca da manhã, C) Temperatura retal da manhã, D) Frequência respiratória da tarde..... 111

Figura 9. Parâmetros fisiológicos das vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA+I (com insolação e sem ventilação e aspersão) em função dos dias de tratamento: A) Temperatura superficial da tarde, B) temperatura retal da tarde, C) movimentos ruminais da tarde em função dos dias de tratamento112

Figura 10. Parâmetros bioquímicos avaliados nas vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA+I (com insolação e sem ventilação e aspersão) em função dos dias de tratamento: A) glicose; B) beta-hidroxibutirato em função dos dias de tratamento 114

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

Tabela 1. Composição e constituição bromatológica da dieta com base na matéria seca (MS) fornecida às vacas	59
Tabela 2. Média dos quadrados mínimos, erro padrão da média (SEM) e valor de P para escore de condição corporal (ECC), consumo de matéria seca (CMS), produção, composição do leite e escore de células somáticas (ECS) avaliado nas vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA (sem ventilação e aspersão)	63
Tabela 3. Média dos quadrados mínimos, erro padrão da média (SEM) e valor de P para as propriedades físico-químicas do leite avaliado nas vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA (sem ventilação e aspersão)	66
Tabela 4. Média dos quadrados mínimos, erro padrão da média (SEM) e valor de P para os parâmetros fisiológicos avaliado nas vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA (sem ventilação e aspersão)	68
Tabela 5. Média dos quadrados mínimos, erro padrão da média (SEM) e valor de P para os parâmetros bioquímicos avaliado nas vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA (sem ventilação e aspersão)	71

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Composição e constituição bromatológica da dieta com base na matéria seca (MS) fornecida às vacas	83
Tabela 2. Amostras de leite com presença da proteína de choque térmico 70 (HSP70) .87	

CAPÍTULO V

Tabela 1. Composição e constituição bromatológica da dieta com base na matéria seca (MS) fornecida às vacas	96
Tabela 2. Média dos quadrados mínimos, erro padrão da média (SEM) e valor de P para consumo de matéria seca (CMS), produção de leite, composição do leite, nitrogênio ureico do leite (NUL) e escore de células somáticas (ECS) das vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA+I (com insolação e sem ventilação e aspersão)	101
Tabela 3. Efeito da ventilação e aspersão (VA) ou ausência delas com insolação (SVA+I) sobre o consumo de matéria seca em kg/dia e em porcentagem do peso vivo de vacas Holandesas ou Jersey	102
Tabela 4. Média dos quadrados mínimos, erro padrão da média (SEM) e valor de P para as propriedades físico-químicas do leite produzido das vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA+I (com insolação e sem ventilação e aspersão)	107
Tabela 5. Média dos quadrados mínimos, erro padrão da média (SEM) e valor de P para os parâmetros fisiológicos avaliados nas vacas do experimento das vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA+I (com insolação e sem ventilação e aspersão)	110
Tabela 6. Média dos quadrados mínimos, erro padrão da média (SEM) e valor de P para os parâmetros bioquímicos avaliados nas vacas do experimento das vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA+I (com insolação e sem ventilação e aspersão)	113

LISTA DE ABREVIATURAS

AT	Acidez titulável
BHB	Beta-hidroxibutirato
CCP	Fosfato de cálcio coloidal
CMS	Consumo de matéria seca
CNF	Carboidratos não fibrosos
EA	Eficiência alimentar
ECS	Escore de células somáticas
EDTA	Tetra-acetato de etilenodiamino
EE	Extrato etéreo
EPM	Erro padrão da média
FC	Frequência cardíaca
FDA	Fibra de detergente ácido
FDN	Fibra de detergente neutro
FR	Frequência respiratória
ITU	Índice de temperatura e umidade
ICT	Índice de carga térmica
LINA	Leite instável não ácido
MM	Matéria mineral
mov./min	Movimentos por minuto
MR	Movimentos ruminais
MS	Matéria seca
NUL	Nitrogênio ureico do leite
PP	Período de pré-experimental
PB	Proteína bruta
PE	Período experimental
PV	Peso vivo
TGN	Temperatura de globo negro
TMR	Dieta total
TR	Temperatura retal
TS	Temperatura superficial
UR	Umidade relativa
SVA	Grupo de vacas sem acesso a ventilação e aspersão
SVA+I	Grupo de vacas sem acesso a ventilação e aspersão, mas com 1h de insolação
VA	Grupo de vacas com acesso a ventilação e aspersão

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	30
CAPÍTULO I.....	33
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	33
1.1 ESTRESSE CALÓRICO EM VACAS LEITEIRAS.....	33
1.1.1 Alteração em parâmetros fisiológicos e comportamentais no estresse calórico.....	34
1.1.2 Consumo de alimentos e produção de leite no estresse calórico.....	35
1.1.3 Metabolismo afetado pelo estresse calórico.....	36
1.1.4 Equilíbrio ácido-básico no estresse calórico.....	38
1.1.4 Termotolerância.....	38
1.2 ESTRESSE CALÓRICO E QUALIDADE DO LEITE.....	39
1.2.1 COMPOSIÇÃO DO LEITE.....	39
1.2.1.1 Gordura.....	40
1.2.1.2 Proteína.....	40
1.2.1.3 Lactose.....	41
1.2.1.4 Minerais.....	42
1.2.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE.....	42
1.2.2.1 Acidez titulável e pH.....	42
1.2.2.2 Crioscopia do leite.....	43
1.2.2.2 Estabilidade do leite ao teste do álcool.....	44
1.2.3 CARACTERÍSTICAS HIGIÊNICO-SANITÁRIAS.....	45
1.2.3.1 Contagem de células somáticas.....	45
1.2.3.2 Contagem bacteriana total.....	46
CAPÍTULO II.....	47
2 ESTRESSE CALÓRICO E PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO EM VACAS LEITEIRAS: uma revisão.....	47
2.1 RESUMO.....	47
2.2 ABSTRACT.....	47
2.3 INTRODUÇÃO.....	48
2.3.1 Resposta ao choque térmico.....	48
2.3.2 Proteínas de choque térmico.....	49

2.3.3 HSP e termotolerância.....	49
2.3.4 Alfa-caseínas como chaperonas moleculares	50
2.4 Conclusão.....	51
2.5 Agradecimentos	51
CAPÍTULO III	52
2 EFEITO DO ESTRESSE CALÓRICO SOBRE O CONSUMO, INDICADORES BIOQUÍMICOS, PRODUÇÃO E QUALIDADE DO LEITE DE VACAS DA RAÇA HOLANDESA E JERSEY	52
3.1 RESUMO.....	52
3.2 ABSTRACT.....	53
3.3 INTRODUÇÃO	54
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	55
3.4.1 Animais e alojamento.....	56
3.4.2 Condições ambientais do confinamento.....	56
3.4.3 Peso vivo, escore de condição corporal	57
3.4.4 Frequência respiratória, temperatura superficial, temperatura retal e movimentos ruminais	57
3.4.5 Consumo de matéria seca e coleta de amostras de alimentos	58
3.4.6 Coleta e análise de amostras de leite.....	59
3.4.7 Coleta e análise de amostras de sangue.....	60
3.4.8 Delineamento experimental.....	61
3.5 RESULTADOS	62
3.6 DISCUSSÃO	74
3.7 Conclusão.....	76
3.8 Agradecimentos	76
CAPÍTULO IV	77
4 LEITE DE VACAS SOB ESTRESSE CALÓRICO CONTÉM PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 70	77
4.1 RESUMO.....	77
4.2 ABSTRACT.....	77
4.3 INTRODUÇÃO	78
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	80
4.4.1 Animais e alojamento.....	81
4.4.2 Condições ambientais do confinamento.....	81

4.4.3 Consumo de matéria seca e coleta de amostras de alimentos	82
4.4.4 Coleta e análise de amostras de leite	83
4.4.5 Determinação da proteína e eletroforese	83
4.4.6 Western Blot.....	84
4.4.7 Delineamento experimental.....	85
4.5 RESULTADOS	85
4.6 DISCUSSÃO	87
4.7 CONCLUSÃO	88
4.8 AGRADECIMENTOS	88
CAPÍTULO V	89
5 EFEITO DO ESTRESSE CALÓRICO E DA INSOLAÇÃO SOBRE O CONSUMO, INDICADORES BIOQUÍMICOS, PRODUÇÃO E QUALIDADE DO LEITE DE VACAS HOLANDÊS E JERSEY	89
5.1 RESUMO.....	89
5.2 ABSTRACT.....	90
5.3 INTRODUÇÃO	92
5.4 MATERIAL E MÉTODOS	93
5.4.1 Animais e alojamento.....	93
5.4.2 Dados climáticos	94
5.4.3 Peso vivo, escore de condição corporal	94
5.4.4 Frequência respiratória, temperatura superficial, temperatura retal e movimentos ruminais	95
5.4.5 Consumo de matéria seca e coleta de amostras de alimentos	95
5.4.6 Coleta e análise de amostras de leite.....	96
5.4.7 Coleta e análise de amostras de sangue.....	97
5.4.8 Análise de dados.....	98
5.5 RESULTADOS	98
5.6 DISCUSSÃO	115
5.7 CONCLUSÃO	117
5.8 AGRADECIMENTOS	117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

INTRODUÇÃO

O Estado de Santa Catarina ocupa a quarta posição na produção de leite no Brasil e é uma atividade de grande relevância econômica e social, sendo predominantemente desenvolvida por pequenos produtores rurais (DEBONA, 2017). Os problemas gerados pelo calor intenso atingem anualmente o estado, bem como, outras regiões do país e do mundo, causando enormes prejuízos. São muito comuns no verão, alterações no leite que levam a sua condenação, alterações essas comumente confundidas com fraudes, as quais impactam no mercado e podem gerar perda de confiança na cadeia produtiva do leite (SRIKANDAKUMAR; JOHNSON, 2004a; FAGNANI, 2016).

O melhoramento genético para desempenho produtivo aumentou as exigências nutricionais de vacas leiteiras e a susceptibilidade destas a fatores estressantes, com destaque para o estresse térmico, em função do incremento calórico a partir da maior ingestão de alimentos (DIKMEN et al., 2012; WILLIAMSON, 2014). Deste modo, as deficiências ou desequilíbrios nutricionais e o estresse térmico calórico, de modo isolado ou em conjunto, exercem papel preponderante no desencadeamento de casos de não conformidades do leite em condições de campo (THALER NETO et al., 2017a).

Uma das não conformidades mais citadas tem sido a ocorrência de leite que precipita ao teste do álcool, teste utilizado para mimetizar o efeito do calor sobre as proteínas do leite. Este teste, quando positivo, resulta coagulação/precipitação da fração proteica do leite. No passado, a ocorrência de leite reativo ao teste do álcool era associada a ocorrência de leite com elevada acidez, fruto de práticas de ordenha inadequadas e/ou resfriamento deficiente. No entanto, há casos em que ocorre a precipitação sem a existência de acidez, sendo esse leite denominado, Leite Instável Não Ácido (LINA). São frequentes os relatos de LINA no verão e diversos trabalhos têm demonstrado o aumento do aparecimento de quadros de LINA em épocas de menor oferta de alimentos, em especial, no outono, assim como em propriedades menos estruturadas (WERNCKE et al., 2016), sob condições de restrição alimentar (GABBI et al., 2016) e no verão, em vacas sob estresse calórico (ABREU, 2015; WERNCKE et al., 2016).

O estresse calórico afeta consideravelmente o teor de lactose no leite. Wheelock et al. (2010) observaram redução de 200 a 400 g diárias na produção de lactose em vacas leiteiras sob estresse calórico. Em situações de estresse calórico, há um aumento da glicólise e da respiração anaeróbia para manter o equilíbrio energético (TIAN et al.,

2015), sendo que a diminuição da glicemia pode parcialmente explicar a redução do teor de lactose secretado no leite (SCHWARTZ *et al.*, 2009).

A proteína do leite sofre influência racial e do nível de produção de leite, porém menos marcante que a gordura (CSIRO, 2007), sendo o melhoramento genético fundamental para manutenção de bons teores de proteína no leite a longo prazo. Além disso, o tipo de dieta é também um fator determinante no teor de proteína do leite. Vacas alimentadas com dietas ricas em carboidratos não fibrosos produzem leite com mais proteína (ISHLER *et al.*, 1996). O estresse calórico também pode determinar redução no teor de proteína do leite, visto que o catabolismo muscular aumenta durante o estresse calórico, ocorrendo maior concentração no nitrogênio ureico plasmático, favorecendo uma maior redistribuição do nitrogênio proteico para ureia (WHEELLOCK *et al.*, 2010) e diminuindo a capacidade da síntese proteica das células mamárias, reduzindo-se o teor de caseína (BERNABUCCI *et al.*, 2002). Essas alterações, distintas de animal para animal, mostram que há diferenças no efeito de uma mesma condição climática para diferentes animais. Além disso, cada animal tem uma maior ou menor capacidade de adaptar-se frente a um desafio estressor. Essas diferenças permitem que ao longo do tempo, não só os animais mais produtivos sejam selecionados, mas também, animais mais adaptados ao calor, como a seleção para animais com menor temperatura retal (TR) (DIKMEN *et al.*, 2012).

A seleção genética de animais com base na sua tolerância térmica, é uma possibilidade no intuito de reduzir o impacto do estresse calórico na produção de leite. Diferenças de termotolerância, a nível celular, são mediadas por uma família de proteínas de choque térmico (HSP). A proteína de choque térmico 70 kDa (HSP70) é uma família de chaperonas moleculares que protegem as células contra danos térmicos e apoptose. Estas proteínas, estão envolvidas na manutenção da homeostase celular, controlando o processo de dobramento de proteínas (DEB; SAJJANAR; PAVANI, 2015). Essa resposta celular ao estresse calórico, interfere no metabolismo geral de vacas leiteiras, por ser um mecanismo de adaptação a uma situação extrema. Também interfere na homeostase do organismo e consome precursores para a síntese de proteínas, interferindo no perfil proteico sintetizado pela glândula mamária. Assim, perdas de qualidade do leite e estabilidade térmica podem ocorrer.

Poucos são os trabalhos envolvendo HSP e estresse calórico em vacas leiteiras. Em geral, são trabalhos *in vitro*, em que diferentes tipos celulares são incubados em altas temperaturas (COLLIER *et al.*, 2008; HU *et al.*, 2016), o que muitas vezes, não reflete o

que acontece no cotidiano com vacas leiteiras. Poucos são os trabalhos *in vivo* (CORAZZIN et al., 2020), em condições reais, em que diversos elementos climáticos podem variar, dia a dia. Entender quais mecanismos atuam na adaptação ao estresse calórico, permite que medidas possam ser tomadas a curto prazo e que a longo prazo possa ser explorado na seleção genética. Os efeitos na produção, composição e parâmetros físico-químicos do leite merecem atenção pelo viés econômico que causam, com a perda de volume de leite e sólidos produzidos, bem como os desafios ao processamento que este leite apresenta. Aliado a isso, existem intervalos de cada parâmetro que são admitidos como legais e fora destes, o leite passa a ser condensado, gerando um prejuízo não só pela menor produção das vacas, mas também aquilo que foi produzido, não é aproveitado. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar o efeito do estresse calórico sobre o consumo, a produção e qualidade do leite, características físico-químicas do leite, proteínas de choque térmico e indicadores bioquímicos de vacas Holandês e Jersey.

CAPÍTULO I

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 ESTRESSE CALÓRICO EM VACAS LEITEIRAS

A produção sustentável de leite continua a ser um grande desafio em condições climáticas de calor intenso considerando as mudanças globais no clima em curso (BERTOCCHI et al., 2014). O Brasil possui cerca de dois terços do seu território situados na faixa tropical do planeta, onde predominam altas temperaturas do ar, em virtude da elevada radiação solar incidente. A temperatura média do ar situa-se acima dos 20°C e a temperatura máxima se encontra acima dos 30°C em grande parte do ano, atingindo, muitas vezes, valores entre 35°C e 38°C (AZEVEDO; ALVES, 2009). Essas condições climáticas representam um grande desafio para a produção animal, causando alterações fisiológicas e comportamentais em decorrência do calor. Além disso, a queda na produtividade e os danos causados sobre a saúde animal, causam elevados prejuízos econômicos anualmente.

A zona termoneutra de vacas leiteiras de origem europeia varia de 16°C a 25°C (DAS et al., 2016). Klein (2014), considera que vacas leiteiras de alta produção produzem tanto calor metabólico que sua zona de termoneutralidade é surpreendentemente mais baixa: 4°C a 15°C. Para Das et al. (2016), nessa faixa de temperatura, vacas leiteiras mantêm uma temperatura corporal fisiológica de 38,4 - 39,1°C. Temperaturas ambientais acima de 20-25°C em clima temperado e 25-37°C em clima tropical, aumentam o ganho de calor além do que é perdido pelo corpo e induzem o estresse calórico, com elevação da temperatura superficial (TS), frequência respiratória (FR), frequência cardíaca (FC) e temperatura retal (TR).

O estresse é uma reação reflexa dos animais a ambientes hostis e causa consequências desfavoráveis que vão desde desconforto até a morte (DAS et al., 2016). Em animais homeotérmicos, o estresse térmico pode ser definido como uma condição na qual a temperatura corporal central excede à apropriada para esta espécie para a realização das atividades fisiológicas e isto resulta numa carga térmica total superior à capacidade de dissipação de calor, levando a respostas fisiológicas e comportamentais para dissipar calor (BERNABUCCI et al., 2010).

Um animal homeotérmico ao ser exposto a quantidades exacerbadas de calor, reage inicialmente, promovendo uma vasodilatação periférica, aumentando o fluxo

sanguíneo para a pele e os membros. Esta elevação no fluxo sanguíneo eleva a temperatura superficial, aumentando o gradiente térmico entre pele, membros e ambiente, resultando em maior perda de calor (ROBINSON; JUAREZ, 2001).

Animais podem dissipar calor para o ambiente por irradiação da superfície do corpo para um objeto mais frio; por convecção, à medida que o corpo aquece o ar ou a água ao seu redor; por evaporação de secreções respiratórias, suor ou saliva; e por condução para superfícies mais frias com as quais o animal esteja em contato. Uma pequena parte de calor também é perdida pela urina e as fezes (KLEIN, 2014)

Dependendo da duração e intensidade do estresse calórico, a ingestão de alimentos também pode ser afetada, além de ocorrer redução na taxa de crescimento e desempenho, redução na produção e na qualidade do leite, redução do desempenho reprodutivo e aumento de distúrbios metabólicos (DAS et al., 2016; WHEELLOCK et al., 2010).

1.1.1 Alteração em parâmetros fisiológicos e comportamentais no estresse calórico

A temperatura retal é um indicador do balanço térmico em vacas leiteiras e pode ser usado como indicador da severidade do efeito do estresse calórico sobre o crescimento, a produção de leite, e a reprodução (KADZERE et al.; 2002). Srikandakumar e Johnson, (2004), comparando vacas Holandês e Jersey, verificaram que o estresse calórico afetou a temperatura retal, sendo maior nas vacas Holandês que nas vacas Jersey ($H=39,65^{\circ}\text{C}$ versus $J=39,43^{\circ}\text{C}$; $P < 0,01$).

Em vacas leiteiras sob estresse calórico, ocorre um aumento na frequência respiratória que apesar de aumentar a dissipação de calor por evaporação, também pode causar um aumento na perda de CO_2 e conseqüentemente, diminuir a capacidade de tamponamento sanguíneo, podendo causar alcalose respiratória (KADZERE et al., 2002; TAO; BERNARD; MONTEIRO, 2011; TARABA, 2016). A frequência respiratória aumentada também aumenta a produção metabólica de calor muscular e a salivação. As perdas de saliva refletem em menores concentrações de bicarbonato no rúmen e afetam o tamponamento ruminal, tornando vacas sob estresse calórico, mais vulneráveis à acidose ruminal (BAUMGARD et al., 2006). Kadzere et al. (2002), em uma revisão sobre estresse calórico, cita os trabalhos de Kibler e Brody de 1954, que verificaram diferenças entre vacas Jersey e Holandês quanto a frequência respiratória. Vacas Jersey apresentam frequências respiratórias mais altas que vacas Holandês e atribuíram isso à melhor capacidade das vacas Jersey em dissipar calor. Já Srikandakumar e Johnson, (2004),

encontraram frequências respiratórias menores para vacas Jersey ($H=85,3$ mov./min versus $J=75,7$ mov./min; $P < 0,01$).

Em vacas sob estresse calórico, também pode ocorrer uma redução das contrações ruminais, levando a uma redução da ruminação e redução da produção total de saliva. A taxa de passagem de ácidos no rúmen também é reduzida devido à contração mais lenta, o que resulta no acúmulo de ácidos no rúmen. Isso torna vacas leiteiras mais propensas ao desenvolvimento de acidose ruminal. Embora o consumo de matéria seca (CMS) seja menor e as refeições maiores e menos frequentes, a preferência por alimento concentrado em detrimento de forragem, afeta negativamente o ambiente ruminal (DAS et al., 2016).

Ocorrem mudanças comportamentais em vacas sob estresse calórico. Em geral, vacas buscam por sombra, locais mais frios, áreas com maior movimento de ar, além de evitar a radiação solar direta. Numa tentativa de dissipar o calor, vacas sob estresse calórico aumentam o tempo em que permanecem de pé (TARABA; BEWLEY, 2016).

1.1.2 Consumo de alimentos e produção de leite no estresse calórico

Temperaturas ambientais elevadas exercem um efeito negativo sobre o centro do apetite do hipotálamo (DAS et al., 2016). Numa estratégia de sobrevivência, animais sob estresse calórico reduzem o consumo de alimento, pois os processos de digestão e o metabolismo de nutrientes, geram grandes quantidades de calor (BAUMGARD; RHOADS, 2013). Vacas leiteiras podem perder peso, escore de condição corporal (ECC) e conseqüentemente, podem entrar em balanço energético negativo (BEN) (DAS et al., 2016).

Tradicionalmente, presume-se que a ingestão reduzida de alimento causada pelo estresse calórico seja o principal fator responsável pela diminuição da produção de leite. No entanto, a redução do consumo de matéria seca (CMS) é responsável por 35 a 50% da diminuição da produção de leite em vacas sob estresse calórico (BAUMGARD; RHOADS, 2013). Para Bauman et al. (2004), alterações endócrinas, redução na absorção de nutrientes, redução da ruminação, além do aumento das exigências nutricionais para manutenção, contribuem significativamente para a baixa eficiência de rebanhos leiteiros no verão (BAUMAN et al., 2004).

A elevada produção torna vacas leiteiras mais suscetíveis ao estresse calórico pela maior geração de calor metabólico (BERNABUCCI et al., 2010; DAS et al., 2016) e a magnitude da redução na produção de leite é determinada pelo estágio de lactação. Para

Tao et al. (2018), a condição metabólica e nutricional das vacas nos diferentes estágios da lactação explicam as diferenças de sensibilidade ao calor.

Tao et al. (2018), comparando vacas com e sem acesso a resfriamento por ventilação, observaram que a produção de leite de vacas no início da lactação, com 15–45 dias em lactação (DEL), foi semelhante até uma semana após o início do tratamento, no entanto, reduzindo posteriormente, em vacas sem acesso a resfriamento. Além disso, verificaram que vacas no meio da lactação, reduzem imediatamente a produção de leite e, portanto, são mais suscetíveis ao estresse calórico que vacas no início e final da lactação. A produção de leite de vacas no início da lactação é suportada principalmente, pela mobilização de reservas de gordura e menos pela ingestão de alimento, ao contrário de vacas no meio da lactação em que a produção de leite é suportada pela ingestão de alimento que atinge nesta fase o seu pico.

1.1.3 Metabolismo afetado pelo estresse calórico

O calor do corpo provém do metabolismo e de fontes externas. Quando ingerida, a energia alimentar produz calor em todos os estágios do processo metabólico e no final, a energia do alimento é convertida em calor, que se dissipa no ambiente e se irradia no espaço. A produção de calor pelo corpo está relacionada à taxa metabólica. A função celular exige manutenção de uma taxa metabólica basal, um índice do metabolismo energético medido sob estresse mínimo, enquanto o animal está em jejum (KLEIN, 2014).

Em animais sob estresse calórico, pode ocorrer um aumento da temperatura corporal, o que implica num aumento da taxa metabólica e por consequência, maior produção de calor. A taxa metabólica basal por quilograma de peso é maior nos mamíferos menores do que nos maiores. Tal necessidade deve-se, em parte, à maior proporção superfície/volume dos animais menores. A área de superfície relativamente maior por quilograma de peso dos animais pequenos fornece uma área bem maior para a perda de calor (KLEIN, 2014).

O metabolismo lipídico é afetado pelo estresse calórico crônico. O estresse calórico reduz a oxidação de gordura em vacas leiteiras (SHWARTZ et al., 2009). Essa redução é independente do reduzido CMS. Além disso, o estresse calórico reduz as atividades das enzimas lipolíticas. A atividade lipolítica atenuada parece ser uma forma de adaptação para limitar a geração de calor (SLIMEN et al., 2016).

Para Wheelock et al. (2010) e Slimen et al. (2016), o estresse calórico crônico aumenta as concentrações de insulina em vacas em lactação (WHEELLOCK et al., 2010; SLIMEN et al., 2016). Além disso, ocorre um aumento do número de receptores de insulina e o uso de glicose pelos tecidos periféricos (SLIMEN et al., 2016). O aumento da concentração de insulina no sangue durante o estresse calórico crônico explica a diminuição da concentração de glicose circulante, a redução da atividade lipolítica e o aumento da lipogênese (SLIMEN et al., 2016; DAS et al., 2016). Além disso, o aumento na sensibilidade à insulina é sugerido como um mecanismo adaptativo para a diminuição da produção de calor (SLIMEN et al., 2016).

Tian et al. (2016), verificaram maiores concentrações de beta-hidroxibutirato (BHB) e acetona em vacas sob estresse calórico em comparação com vacas em condições termoneutras. As concentrações BHB e acetona no leite e no sangue estão correlacionadas e ambos passam inalterados para o leite pelas células epiteliais células mamárias. Assim, concentrações elevadas de BHB e acetona no leite podem indicar níveis aumentados de BHB e acetona no sangue, que são indicadores do estado de energia em vacas leiteiras e refletem a mobilização excessiva de lipídeos e proteínas e o fornecimento insuficiente de glicose.

A duração do estresse calórico parece influenciar de forma diferente o metabolismo proteico de animais sob estresse calórico. Períodos curtos de estresse calórico aumentam o catabolismo de proteínas para a produção de glicose pela via da gliconeogênese. Além disso, períodos curtos de calor reduzem a síntese de proteínas e a retenção de nitrogênio e diminuem as concentrações plasmáticas de aminoácidos como o ácido aspártico, serina, tirosina e cisteína. Já a exposição crônica ao calor, diminui a síntese de proteína muscular, diminui a degradação de proteínas e diminui as concentrações de aminoácidos plasmáticos com enxofre e de cadeia ramificada. As concentrações séricas de aspartato, ácido glutâmico e fenilalanina aumentam no estresse crônico (SLIMEN et al., 2016).

O estresse calórico altera o metabolismo dos carboidratos, aumentando a produção de glicose hepática por glicogenólise e gliconeogênese (HAO et al., 2016). Wheelock et al. (2010), encontraram uma redução de 200 a 400 g de lactose por dia no leite de vacas sob estresse calórico quando comparadas com vacas em condições termoneutras e vacas recebendo alimentação pareada.

1.1.4 Equilíbrio ácido-básico no estresse calórico

O equilíbrio ácido-base dos animais depende da relação entre ânions e cátions no sangue. A concentração de H^+ extracelular é muito regulada. Os limites vitais de variação do pH para mamíferos situam-se entre valores de pH de 7,35 e 7,45. Em condições normais, ácidos e bases são adicionados continuamente aos fluidos corporais, seja como resultado da ingestão ou como resultado de sua produção durante o metabolismo celular. Para combater quaisquer alterações no equilíbrio ácido-básico normal, o corpo utiliza três mecanismos básicos: tampão químico, ajuste respiratório do ácido carbônico sanguíneo e excreção renal de H^+ ou reabsorção de HCO_3^- (SRIKANDAKUMAR; JOHNSON, 2004).

Um dos efeitos do estresse calórico é o aumento da frequência respiratória. Embora a maior frequência respiratória melhore a dissipação de calor por evaporação, também eleva a perda de CO_2 , o que conseqüentemente, diminui a quantidade de bicarbonato no sangue para a manutenção do equilíbrio ácido-básico sanguíneo, gerando uma alcalose respiratória (KADZERE et al., 2002; TAO; BERNARD; MONTEIRO, 2011; TARABA, 2016). Num mecanismo compensatório, a reabsorção renal de bicarbonato aumenta (TAO; BERNARD; MONTEIRO, 2011).

1.1.4 Termotolerância

As respostas ao estresse calórico em vacas leiteiras parecem ser específicas da raça, sendo que *B. indicus* e outras raças tropicais são menos suscetíveis ao estresse calórico do que *B. taurus*. Essas diferenças são atribuídas aos diferentes graus de adaptabilidade a ambientes quentes (KADZERE et al., 2002). Sharma et al. (1983), encontraram que a produção de leite de vacas Jersey foi menos sensível ao clima em comparação com vacas Holandês. Por outro lado, a composição do leite de vacas Jersey foi mais afetada pelo calor.

Características fenotípicas tornam vacas leiteiras mais suscetíveis aos efeitos do calor. Hillman et al. (2001), em um estudo sobre o efeito da coloração do pelo na termorregulação, encontraram que vacas Holandês expostas à luz solar direta, com coloração de pelo predominante negra, apresentaram um aumento de $4,8^{\circ}C$ em sua temperatura superficial e vacas predominantemente brancas, apresentaram um aumento de $0,7^{\circ}C$.

A produção de suor é responsável por cerca de 70-85% da perda de calor por resfriamento evaporativo em vacas leiteiras. A relação área de superfície: massa corporal de um animal, pode limitar a quantidade total de calor perdido. Quanto menor a proporção, mais difícil é perder calor pela superfície da pele. Já, as taxas de sudoração entre as raças de vacas leiteiras diferem. Vacas Jersey, uma raça de pequeno porte, tem uma taxa de suor de 340 g/m²/h e gera 1.400 W de resfriamento para uma vaca de 450 kg (Jersey = 3,1 W/kg de peso corporal), enquanto as vacas Holandês, uma raça de grande porte, produzem suor a uma taxa de 310 g/m²/h, equivalente a 1.460 W de resfriamento para uma vaca de 550 kg (Holandês = 2,65 W/kg de peso corporal) (TARABA; BEWLEY, 2016)

1.2 ESTRESSE CALÓRICO E QUALIDADE DO LEITE

1.2.1 COMPOSIÇÃO DO LEITE

O leite é um fluido secretado pela fêmea de todas as espécies de mamíferos, com a função primária de atender às necessidades nutricionais completas do neonato. Além disso, o leite desempenha várias funções fisiológicas para o recém-nascido. Em sua maioria, as funções não nutricionais do leite são desempenhadas por proteínas e peptídeos, incluindo as imunoglobulinas, enzimas e inibidores enzimáticos, proteínas de ligação ou transportadoras, fatores de crescimento e agentes antibacterianos (FOX et al., 2015).

O leite bovino contém cerca de 3,7% de gordura, 3,4% de proteína, 4,8% de lactose e 0,7% de minerais. Em condições brasileiras, de acordo com Bondan et al. (2018), considerando a composição média de 148604 vacas Holandesas, o leite apresenta um teor de gordura de 3,45% de gordura, 3,23% de proteína, 4,45% de lactose. Além disso, o leite, contém diversos outros componentes, presentes em menor quantidade, como vitaminas, íons metálicos e flavorizantes, mas que tem um grande impacto nas propriedades nutricionais, tecnológicas e sensoriais do leite e produtos lácteos (FOX et al., 2015).

Do ponto de vista físico-químico, o leite é um fluido complexo e seus constituintes ocorrem em três fases: (1) Quantitativamente, a maior parte da massa do leite é uma solução verdadeira de lactose, sais orgânicos e inorgânicos, vitaminas e outras pequenas moléculas na água. (2) As proteínas do soro estão dispersas na solução aquosa, enquanto as caseínas formam grandes agregados coloidais, variando em diâmetro de 50 a 600 nm.

(3) Os lipídeos existem em um estado emulsificado (suspensão), como glóbulos variando em diâmetro de 0,1 a 20 μm (FOX; MCSWEENEY, 1998).

O leite é um sistema dinâmico devido à instabilidade de muitas de suas estruturas, como a membrana do glóbulo de gordura do leite; mudanças na conformação e solubilidade de muitos constituintes com a temperatura e o pH, especialmente dos sais inorgânicos e proteínas; a presença de várias enzimas que podem modificar os constituintes por meio de lipólise, proteólise, oxidação ou redução; o crescimento microbiano pode causar mudanças de pH, potencial redox ou por meio das enzimas que excretam; e a troca de gases com a atmosfera, por exemplo, CO_2 (FOX et al., 2015).

1.2.1.1 Gordura

A gordura é formada por lipídeos presentes no leite na forma de glóbulos microscópicos, formando uma emulsão e constitui uma importante fonte de energia para o neonato. O teor e a composição da gordura do leite podem variar consideravelmente em função da raça, dieta e estágio de lactação (MCSWEENEY; FOX; O'MAHONY, 2020).

O estresse calórico afeta consideravelmente a composição do leite. Bernabucci e Calamari (1998), observaram que vacas no início da lactação reduzem o teor de gordura. Já Shwartz et al. (2009), encontraram teores similares de gordura em vacas em condições termoneutras e em condições de estresse calórico.

1.2.1.2 Proteína

O leite bovino contém 3-4% de proteína e quase 80% da fração de proteína do leite é constituída por quatro caseínas: $\alpha\text{s}1$ -caseína ($\alpha\text{s}1$ -CN), $\alpha\text{s}2$ -caseína ($\alpha\text{s}2$ -CN), β -caseína (β -CN) e κ -caseína (κ -CN) e ocorrem na proporção 4:1:3,5:1,5, respectivamente. A maioria das caseínas no leite está sob a forma de micelas de caseína, coloides altamente hidratados que consistem em milhares de moléculas e sais de caseína individuais. São estáveis ao calor e contêm aproximadamente 3,5 g de água por g de proteína (BIJL, 2014). As caseínas apresentam diferente composição de aminoácidos e uma grande heterogeneidade em suas características, principalmente pelas modificações pós-tradução, a fosforilação e glicosilação (SILVA et al., 2019). A estrutura micelar permite o fornecimento de grandes quantidades de cálcio e fosfato ao recém-nascido, sem risco de calcificação patológica da glândula mamária materna (HOLT; CARVER, 2012) As

micelas de caseína também determinam a funcionalidade do leite durante seu processamento, a exemplo da coagulação do leite para a produção de queijo e a coagulação ácida do leite na obtenção de iogurte (BIJL, 2014). Em produtos, como leite fluido (pasteurizado ou esterilizado), creme de leite, leite condensado e doce de leite, busca-se a estabilidade das micelas de caseína. Em outros derivados lácteos, como leites fermentados e queijos, é a desestabilização controlada das micelas de caseína que permite a fabricação de tais produtos (SILVA et al., 2019).

Bernabucci e Calamari (1998) verificaram que vacas sob estresse calórico produzem leite com menores teores de proteína. No verão, o leite de vacas sob estresse calórico pode apresentar menor quantidade de α -caseína e β -caseína, que em conjunto, representam aproximadamente 90% das caseínas totais. Essas caseínas contêm um elevado número de grupos fosfato e a sua fosforilação necessita da presença do fosfato de ATP. A fosforilação é significativamente prejudicada em condições de déficit de energia, de modo que se supõe que o menor teor de α -caseína e β -caseína no leite de verão pode ser pelo menos parcialmente devido à redução da ingestão de energia e proteína provocada pelo estresse calórico (BERNABUCCI; BASIRICÓ; MORERA, 2013).

1.2.1.3 Lactose

Acredita-se que a produção de leite é determinada pelo número e atividade de células secretoras mamárias. A atividade secretora, avaliada pelo volume do leite, depende da secreção do principal osmorregulador no leite, a lactose (BLECK et al., 2009). A lactose é responsável por cerca de 50% da pressão osmótica do leite. Sua produção provoca o movimento da água do citoplasma das células epiteliais mamárias para as vesículas secretoras e, subsequentemente, para o leite. Esse influxo de água no leite regula o volume de leite produzido e a concentração de caseína no leite. Um baixo teor de lactose resulta na produção de leite que é extremamente viscoso e contém pouca água (FOX; MCSWEENEY, 1998).

O estresse calórico pode afetar consideravelmente o teor de lactose do leite. Bernabucci e Calamari (1998), determinaram que vacas sob estresse calórico produzem leite com menor teor de lactose. Wheelock et al. (2010), observaram uma redução entre 200 à 400 g diárias na produção de lactose em vacas leiteiras sob estresse calórico. Para Tian et al. (2016) e Shwartz et al. (2009), em condições de estresse calórico, há um

aumento da glicólise e da respiração anaeróbia para manter o equilíbrio energético sendo que a diminuição da glicemia pode explicar a redução do teor de lactose.

1.2.1.4 Minerais

A composição de minerais do leite é complexa e depende de fatores genéticos, estágio de lactação, alimentação e saúde dos animais (GAUCHERON, 2005). Entre os principais minerais do leite estão cálcio, magnésio, potássio, sódio, cloretos, citratos e fósforo. Podem ser agrupados em duas frações, a fração solúvel, representada pelos sais e íons presentes na fase contínua ou solúveis no leite e a fração coloidal, que inclui os minerais associados às micelas de caseína. A fração coloidal compreende dois principais tipos de sais: cátions e ânions ligados diretamente aos resíduos de aminoácidos das caseínas, na forma de fosfato de cálcio coloidal (SILVA et al., 2019).

A composição mineral pode ser afetada pelo estresse calórico. Para Bernabucci e Calamari (1998), o leite produzido por vacas sob estresse calórico tem menor teor de cálcio, fósforo, magnésio e cloro.

1.2.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE

1.2.2.1 Acidez titulável e pH

A acidez titulável (AT) e o pH são comumente usados para medir a acidez do leite e de seus derivados. A atividade dos íons hidrônio (H_3O^+) é expressa como um valor de pH, enquanto AT é uma medida da capacidade tampão total entre o pH do leite e o ponto final da fenolftaleína (~ 8,3). As caseínas e o fosfato são os principais componentes do leite que determinam a capacidade tampão. A caseína reage ao NaOH semelhante a uma substância ácida, por meio de seus grupos ionizáveis (por exemplo, resíduos de aminoácidos e CCP) (SADAT; EZZATPANAH; BAKHODA, 2017).

A determinação da acidez titulável deve ser realizada em menos de 90 segundos e pode servir como um indicador da qualidade do leite cru e como uma medida indireta do conteúdo ácido no leite. Todo o leite tem um conteúdo ácido atribuído a proteínas, minerais e gases dissolvidos. No entanto, o teor de ácido lático pode ser aumentado por bactérias que convertem a lactose em ácido lático. Quando isso ocorre, um aumento drástico na acidez titulável é observado. Ao mesmo tempo, o leite tem uma forte

capacidade tamponante, resistindo a mudanças de acidez devido ao seu conteúdo proteico. (SCHMIDT; STUPAR; SHIRLEY, 1996).

A acidez titulável tem sido utilizada há muitos anos para indicar se o leite sofreu degradação bacteriana (produção de ácido láctico), armazenamento em temperatura inadequada ou se está envelhecido. Como o leite é refrigerado após a ordenha e por lei, é exigido o seu resfriamento, a degradação bacteriana e o abuso de temperatura não são mais tão prevalentes como eram no passado. Assim, recentemente o valor da acidez titulável como um indicador da qualidade do leite cru começou a ser questionado. Além disso, um alto teor proteico do leite pode interferir no teste e conferir valores de acidez titulável falsamente altos (SCHMIDT; STUPAR; SHIRLEY, 1996).

O leite produzido no verão tem maior pH do leite e menor acidez titulável. Essas propriedades físico-químicas podem ser explicadas em função da diminuição do teor de α -caseína e β -caseína no leite produzido no verão, frações ricas em grupos fosfato e componentes ácidos da micela de caseína (BERNABUCCI; BASIRICÓ; MORERA, 2013).

1.2.2.2 Crioscopia do leite

Os constituintes solúveis em água presentes no leite como lactose, cloretos, citratos e ácido láctico, determinam 79 a 86% do valor da crioscopia. A variação de outros constituintes solúveis como o sódio, cálcio, potássio, magnésio, fosfatos, caseína e a ureia, também podem afetar a crioscopia (BJERG et al., 2005).

Variações na crioscopia do leite têm sido atribuídas à sazonalidade, alimentação, estágio de lactação, consumo de água, raça, estresse calórico e horário do dia. Esses fatores são frequentemente inter-relacionados, mas têm relativamente pouca influência no ponto de congelamento do leite (FOX; MCSWEENEY, 1998). Bjerg et al. (2005), na Dinamarca, verificaram que a crioscopia do leite coletado de tanques varia ao longo do ano e o valor é mais alto no verão e menor no início do inverno. Para esses autores, o aumento da temperatura ambiente e o número de horas de sol pode causar um aumento da ingestão de água pelas vacas, podendo assim, causar um aumento na crioscopia.

1.2.2.2 Estabilidade do leite ao teste do álcool

Diversos testes são realizados para avaliar a qualidade do leite produzido e um dos mais utilizados é o teste do álcool, realizado na propriedade antes do carregamento do leite, o qual avalia a estabilidade das proteínas lácteas ao serem misturadas com etanol. É um teste usado pela indústria para estimar a estabilidade do leite quando submetido ao tratamento térmico (MARQUES et al., 2007; HORNE, 2016). Constitui um teste de rejeição ou aceitação do leite, sendo, porém, pouco seletivo e específico e por este motivo, seu uso tem sido eliminado na Europa e nos Estados Unidos (HORNE, 2016).

No Brasil, o uso do teste do álcool prevalece e o leite que precipita ao teste do álcool e não apresenta acidez titulável acima de 18°Dornic, é denominado de Leite Instável Não Ácido (LINA) (MARQUES et al., 2007). Uma das principais alterações decorridas deste quadro é a perda da estabilidade da caseína frente à prova do álcool, resultando em sua precipitação sem, entretanto, o leite estar ácido. Esses resultados levam a confusões, pois o leite é erroneamente interpretado como ácido, penalizando o produtor sem que este possa identificar o que acontece no rebanho. Por outro lado, acredita-se que caso esse leite chegue à indústria, não resistiria ao processamento térmico, especialmente ao *Ultra High Temperature* (UHT) (MARQUES et al., 2007).

Muitos processos, incluindo o tratamento UHT, esterilização e produção de leite em pó, em que a geleificação ou sedimentação devem ser evitados, são favorecidos quando o leite tem alta estabilidade. Em outros processos, como produção de queijos e iogurte, em que a coagulação e a geleificação são necessários, menor estabilidade leite seria benéfico dado que ele pode suportar calor suave (TSIOULPAS; LEWIS; GRANDISON, 2007).

A estabilidade coloidal das micelas de caseína, depende de vários fatores como a composição das micelas e sua estrutura, pH do meio, temperatura, força iônica ou balanço de sais, especialmente a concentração de cálcio iônico e fosfatos (MARQUES et al., 2007). Mudanças na forma e tamanho das moléculas de proteína e micelas de caseína, diminuição da solubilidade coloidal, inativação da função bioquímica, aumento de função reativa de alguns grupos funcionais, são algumas modificações que ocorrem com as proteínas do leite quando são desnaturadas (TÖPEL, 2016). As variações que ocorrem com alguns componentes do leite como o balanço mineral, lactose, ureia e cálcio iônico podem estar relacionados com a estabilidade do leite no teste do álcool, além de outras

variáveis, como a acidez microbiológica. Isto pode levar a rejeição desnecessária de leite e ocasionar elevadas perdas (FAGNANI et al., 2014).

Abreu et al. (2020), comparando vacas Holandês com (ITU = $75,4 \pm 3,7$) e sem (ITU = $77,4 \pm 3,5$) acesso à sombra, verificaram que as vacas sem acesso à sombra produziram leite com menor estabilidade ao etanol (sem sombra = 71,9%; com sombra = 76,5%; $P < 0,05$). Relacionaram esses resultados a maior acidez titulável encontrada no leite de vacas sem acesso à sombra, que pode aumentar a concentração de cálcio iônico no leite.

1.2.3 CARACTERÍSTICAS HIGIÊNICO-SANITÁRIAS

1.2.3.1 Contagem de células somáticas

A mastite é uma infamação da glândula mamária que pode ter origem infecciosa ou não infecciosa, sendo caracterizada por alterações físicas, químicas e microbiológicas do leite. As principais causas infecciosas da mastite são bactérias, fungos, leveduras e algas. Infecções intramamárias resultam em perdas econômicas significativas associadas a redução de produção de leite, custo com tratamento e encargos veterinários, descarte de leite durante o período de tratamento, aumento da mão-de-obra e descarte prematuro de animais (TOMAZI; GONÇALVES; DOS SANTOS, 2014).

A contagem de células somáticas (CCS) é um preditor útil de infecções da glândula mamária. As células somáticas protegem o corpo do animal de agentes infecciosos. Os leucócitos (neutrófilos, macrófagos, linfócitos) representam cerca de 75% das células somáticas no leite enquanto que as células epiteliais da glândula mamária representam 25% (SHARMA; SINGH; BHADWAL, 2011).

O principal fator que afeta a CCS do leite é a infecção da glândula mamária (BERTOCCHI et al.; 2014) em que os leucócitos aumentam em resposta à infecção bacteriana, lesão tecidual e estresse. Além disso, uma elevada CCS influencia negativamente a qualidade do leite cru (SHARMA; SINGH; BHADWAL, 2011).

Bertocchi et al. (2014), em um estudo retrospectivo avaliando leite de tanque, verificaram uma correlação positiva entre o escore de células somáticas (ECS) e o índice de temperatura e umidade (ITU). Esses autores verificaram maior ECS no verão quando comparado com as demais estações e relacionaram esses achados ao aumento da prevalência de mastite no verão e consideraram que o estresse calórico deprime a função

imunológica em vacas leiteiras e pode aumentar o número de patógenos no ambiente, tornando vacas leiteiras mais suscetíveis à mastite.

1.2.3.2 Contagem bacteriana total

A contagem total de bactérias (CBT) tem sido o método de referência adotado por órgãos reguladores para garantir a segurança e a qualidade do leite (PANTOJA et al., 2012) e a sua determinação no leite, auxilia principalmente, na avaliação dos procedimentos de limpeza e desinfecção dos equipamentos de ordenha e tanques de refrigeração, higiene de ordenha, ambiente onde o animal está alojado, a temperatura e o tempo de armazenagem do leite. Altas contagens bacterianas podem impactar negativamente o rendimento industrial, a segurança de alimentos e a qualidade do leite e de produtos lácteos (THALER NETO et al., 2017).

Bertocchi et al. (2014), encontraram valores mais elevados de CBT no verão em comparação a outras estações do ano e determinaram uma correlação positiva entre CBT e ITU. Para explicar esses dados, consideraram que as elevadas temperaturas ambientais, podem estimular o crescimento e a proliferação de patógenos ambientais e seus vetores e com isso, elevar a contaminação do úbere e por consequência, elevar a CBT no verão.

CAPÍTULO II

2 ESTRESSE CALÓRICO E PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO EM VACAS LEITEIRAS: uma revisão

Heat stress and heat shock proteins in dairy cows: a review

2.1 RESUMO

O estresse calórico induzido por elevadas temperaturas ambientais, diminui a produtividade animal, levando a elevadas perdas econômicas na agropecuária. Estratégias voltadas para a criação de animais, com melhor termotolerância e resiliência climática são intensamente buscadas. Neste contexto, destaca-se o atual interesse na pesquisa de proteínas de choque térmico (HSP) e seus genes codificantes, pela sua importância na citoproteção, imunomodulação, adaptação e como bioindicadores de estresse calórico. As HSP são consideradas com função anti-inflamatória quando presentes no meio intracelular. No meio extracelular, atuam, desencadeando uma resposta imune. Protegem outras proteínas pela ligação a sequências hidrofóbicas liberadas por desnaturação, impedindo a interação com proteínas vizinhas e evitam da perda da função proteica.

Palavra-Chave: chaperonas, citoproteção, termotolerância

2.2 ABSTRACT

Heat stress-induced by long periods of high environmental temperatures, contributing to reduced animal productivity. Strategies aimed at the production of animals with better thermotolerance and climate resilience are intensely sought. In this context, the current interest in the research of heat shock proteins (HSP) and their coding genes stands out, due to their importance in cytoprotection, immunomodulation, adaptation, and as bioindicators of thermal stress. HSP are considered to have an anti-inflammatory function when present in the intracellular environment. In the extracellular environment, they act, triggering an immune response. They protect other proteins by binding to hydrophobic sequences released by denaturation, preventing interaction with neighboring proteins and preventing loss of protein function.

Keywords: chaperone, cytoprotection, thermotolerance

2.3 INTRODUÇÃO

A zona de termoneutralidade para bovinos de origem europeia é uma faixa de temperatura ambiental de 5 a 20°C (NRC, 2001) e pequenos aumentos em sua temperatura corporal desencadeiam a resposta ao estresse calórico (RICHTER et al., 2010). A resposta ao estresse calórico é uma resposta sistêmica. Um conjunto de genes responde a cargas de calor ambientais acima da zona termoneutra com sinais intra e extracelulares que coordenam o metabolismo celular. A ativação destes mecanismos parece ser iniciada com temperaturas da superfície da pele superiores a 35°C, quando os animais começam a acumular calor e aumentam rapidamente os mecanismos de perda de calor evaporativa (COLLIER et al., 2008). Richter et al. (2010), no entanto, sugerem que o acúmulo deletério de proteínas desdobradas e agregadas seja o sinal para o início da resposta ao choque térmico, que pode ser o resultado de uma variedade de estresses, incluindo o estresse oxidativo, a isquemia, metais pesados, etanol e outras substâncias tóxicas. O objetivo desta revisão é descrever os mecanismos envolvidos no desencadeamento da resposta ao choque térmico e a expressão e síntese de proteínas de choque térmico durante o estresse calórico em vacas leiteiras. Esses mecanismos são críticos para a produtividade da atividade leiteira e determinam inclusive, a sobrevivência animal.

2.3.1 Resposta ao choque térmico

Em nível celular, as alterações de expressão de genes que se iniciam em resposta ao choque térmico incluem a ativação do fator de transcrição de choque térmico 1 (HSF1), aumento da expressão de HSP, diminuição da expressão e síntese de outras proteínas, aumento da oxidação de glicose e aminoácidos, metabolismo reduzido de ácidos graxos, ativação do sistema endócrino de resposta ao estresse e ativação e modulação do sistema imunológico através da secreção extracelular de HSP (eHSP) (COLLIER, 2008; BALDISSERA et al., 2018). Se o estresse persiste, essas mudanças levam a um estado fisiológico alterado, conhecido como aclimação, em que o metabolismo é ajustado para minimizar os efeitos prejudiciais do aumento da carga de calor (COLLIER, 2008). Dependendo da duração e da intensidade do estresse calórico, o acúmulo de proteínas

desdobradas e agregadas pode resultar na morte celular. Se o estresse calórico não é letal, pode ocorrer o desenvolvimento de tolerância e as concentrações aumentadas de HSP sintetizadas, são a base para essa resistência (COLLIER et al., 2008).

Em vacas sob estresse calórico, ocorre uma diminuição do fluxo sanguíneo esplâncnico, resultado da ativação do sistema nervoso simpático. Com isso o fluxo sanguíneo aumentado na pele, auxilia nas trocas de calor com o ambiente. A disponibilidade de oxigênio no intestino é afetada (RENQUIST, 2019) e a hipóxia nestes tecidos pode ser a origem do aumento da concentração de proteínas de choque térmico extracelulares (eHSP) (GAUGHAN et al., 2013). Os danos intestinais podem levar a um aumento da permeabilidade intestinal, permitindo a entrada de substâncias estranhas no organismo e estimulando uma resposta imune (GAUGHAN et al., 2013; RENQUIST, 2019).

2.3.2 Proteínas de choque térmico

Embora a síntese proteica seja perturbada sob o estresse calórico, isso não se aplica às HSP. As proteínas de choque térmico são chaperonas moleculares e diferem de peso molecular e função biológica. Podem ser classificadas em famílias em HSP110 (110kDa), HSP100 (100kDa), HSP90 (90kDa), HSP70 (70kDa), HSP60 (60kDa), HSP40 (40kDa), HSP10 (10kDa) e pequenas famílias HSP. A função das chaperonas está relacionada ao dobramento e desdobramento de proteínas nascentes ou desnaturadas por estresse. Se ligam a sequências de proteínas hidrofóbicas liberadas por desnaturação e assim, impedem a interação com proteínas vizinhas e conseqüentemente, evitam a perda da função proteica (SLIMEN et al., 2016).

2.3.3 HSP e termotolerância

A tolerância ao calor pode ser definida como a capacidade dos animais de manter a expressão de seu potencial genético mesmo quando criados em condições de calor. Uma grande área de pele em relação ao peso vivo, pele e pálpebras pigmentadas, olhos protegidos e uma cobertura corporal de cor clara ou branca contribuem fisiologicamente para o aumento da tolerância ao calor (SLIMEN et al., 2016)

A expressão e síntese da HSP70 induzida pelo calor é rápida e massiva (KRISTENSEN et al., 2004). As HSP70 e HSP90 tem sido correlacionadas com o

desenvolvimento de termotolerância e o aumento de suas concentrações durante o estresse calórico, possivelmente está relacionado ao aumento de proteínas danificadas já que as HSP são induzidas como um mecanismo de defesa e reparação celular (SLIMEN et al., 2016). No entanto, Kristensen et al. (2004), verificaram a presença de HSP72 no plasma de vacas e novilhas Holandês sadias, sem fator estressor aparente e relacionaram esses achados à extrema seleção para alta produção de leite, endogamia, correlações genéticas negativas entre produção e suscetibilidade a doenças. Para estes mesmos autores, o ambiente ou a constituição genética de um organismo muitas vezes podem ser sub ótimos gerando um certo grau de estresse intrínseco. Min et al. (2015) encontraram concentrações séricas do Fator de Transcrição de Choque Térmico (HSF), HSP27, HSP70 e HSP90, maiores em vacas sob estresse calórico quando comparadas com vacas sob condições termoneutras. Gaughan et al. (2013) encontraram elevada relação entre a concentração de HSP70 sérica e temperatura ambiental ($r^2 = 0,86$; $P < 0,0001$), fotoperíodo ($r^2 = 0,94$; $P < 0,0001$), moderada relação com variação da temperatura corporal acima de $38,6^\circ\text{C}$ ($r^2 = 0,54$; $P < 0,0001$) e nenhuma relação com temperatura corporal ($r^2 = 0,06$; $P < 0,0001$) em touros de corte da raça Angus.

A expressão e síntese de HSP, um mecanismo celular de citoproteção, pode explicar parcialmente a maior tolerância ao calor de raças tropicais de bovinos em comparação com raças europeias (DEB et al., 2014; COLLIER et al., 2008), abrindo possibilidade para seleção de animais termorresistentes, de forma a melhorar a produtividade de bovinos criados em regiões com altas temperaturas ambientais (ARCHANA et al., 2017). Além disso, Min et al. (2015) e Gaughan et al. (2013), sugerem que a concentração sérica de HSP70 pode servir como biomarcador para identificar o estresse calórico em vacas leiteiras.

2.3.4 Alfa-caseínas como chaperonas moleculares

A caseína representa cerca de 70-80% do total de proteína do leite bovino e compreende quatro frações: α_{S1} -caseína, α_{S2} -caseína, β -caseína e k-caseína (MORGAN et al., 2005). A α_{S1} -caseína e a α_{S2} -caseína são descritas como tendo atividade de chaperonas moleculares. Atuam estabilizando uma grande variedade de proteínas contra a agregação e precipitação em condições de calor (MORGAN et al., 2005; TREWEEK, 2012), estabilizando proteínas alvo, parcialmente desdobradas. Cada fração de caseína

tem um alto grau de hidrofobicidade por conter aproximadamente 35-45% de aminoácidos apolares (valina, leucina, fenilalanina, tirosina e prolina) e são essas regiões de elevada hidrofobicidade que conferem a atividade de chaperona molecular a α_{S1} -caseína e a α_{S2} -caseína (TREWEEK, 2012).

O mecanismo pelo qual as α_S -caseínas estabilizam e evitam a precipitação de outras proteínas do leite é de interesse para as indústrias lácteas, pois pode fornecer um método alternativo para o tratamento de leite longa vida (TREWEEK, 2012) representando novas possibilidades de emprego de caseínas e caseinatos (MORGAN et al., 2005).

2.4 Conclusão

Elevadas temperaturas ambientais desencadeiam em vacas leiteiras a resposta ao choque térmico, induzindo a expressão e síntese de proteínas de choque térmico. As proteínas de choque térmico, tem função citoprotetora, imunomoduladora e conferem termotolerância a vacas leiteiras.

2.5 Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado.

CAPÍTULO III

3 EFEITO DO ESTRESSE CALÓRICO SOBRE O CONSUMO, INDICADORES BIOQUÍMICOS, PRODUÇÃO E QUALIDADE DO LEITE DE VACAS DA RAÇA HOLANDESA E JERSEY

3.1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar e comparar o consumo de matéria seca, a produção e composição do leite, e parâmetros fisiológicos e bioquímicos em vacas Holandês e Jersey em condições de estresse calórico. Vacas Holandês (n = 8) e Jersey (n = 8) foram divididas em dois grupos homogêneos e alojadas em um confinamento em sistema *Compost Bedded Pack*: tratamento com ventilação por toda a área de alojamento e aspersão na linha do cocho (VA) e tratamento sem ventilação e aspersão (SVA). Os tratamentos foram constituídos por 4 vacas Holandês e 4 vacas Jersey cada e agrupadas de acordo com o peso vivo, número de lactações, dias em lactação, escore de condição corporal e produção de leite. O experimento teve 14 dias de período pré-experimental (PP) ao local e às condições do experimento e 5 dias de período experimental (PE). No período PP, todas as vacas foram resfriadas com auxílio de ventiladores em toda a área de alojamento e aspersores na linha do cocho e o último dia foi considerado dia 0 (D0). A avaliação do consumo de matéria seca e produção de leite foi realizada diariamente. No dia 0 do período PP e nos dias 1, 3 e 5 do período PE, coletou-se amostras de leite para análise de composição, análises físico-químicas do leite e células somáticas. Nestes mesmos dias, coletou-se amostras de sangue para análise de proteínas totais, albumina, ureia, creatinina, glicose, beta-hidroxibutirato e avaliou-se, a frequência respiratória, a temperatura superficial, a temperatura retal e os movimentos ruminais. O delineamento experimental foi um fatorial 2 x 3, com dois tratamentos (VA, com ventilação e aspersão; SVA, sem ventilação e aspersão) e três dias (dia 1, dia 3 e dia 5). Os dados do D0 foram considerados covariáveis no modelo estatístico. Os dados foram submetidos a análise de variância e testados para normalidade de resíduos pelo Teste Shapiro-Wilk. Para o CMS, houve interação entre tratamento e dia (P = 0,0001). A produção de leite foi similar entre tratamentos (P = 0,873). A composição do leite entre os tratamentos VA e SVA foi similar, diferindo apenas no teor de proteína, maior no tratamento VA (P = 0,001). A média dos resultados do teste do álcool do leite foi maior no tratamento SVA (P = 0,005). Houve interação entre tratamento e dia para acidez titulável (P = 0,003). A crioscopia foi mais elevada no tratamento VA (P = 0,006). As vacas do tratamento SVA apresentaram

maiores valores de MR manhã ($P = 0,032$). Houve interação entre tratamento e dia para TR manhã ($P=0,0002$), FR tarde ($P<0,0001$), TS tarde ($P<0,0001$) e TR tarde ($P<0,0001$). A concentração de beta-hidroxibutirato foi maior no tratamento VA ($P < 0,0001$). Um curto período de estresse calórico não afeta imediatamente a produção de leite, mas afeta a composição e as propriedades físico-químicas do leite. O resfriamento ativo de vacas com ventilação e aspersão, influencia na quantidade de calor produzido e retido, afetando parâmetros fisiológicos, metabólitos sanguíneos, componentes e propriedades físico-químicas do leite.

Palavras-chave - calor, termotolerância, propriedades físico-químicas do leite

3.2 ABSTRACT

The objective of this work was to determine and compare dry matter intake, milk production, and composition, and physiological and biochemical parameters in Holstein and Jersey cows under heat stress conditions. Holstein ($n = 8$) and Jersey ($n = 8$) cows were divided into two homogeneous groups and housed in a confinement in a Compost Bedded Pack system: treatment with cooling (VA) and treatment without cooling (SVA). The treatments consisted of 4 Holstein cows and 4 Jersey cows each and grouped according to live weight, number of lactations, days in lactation, body condition score, and milk production. The experiment had 14 days of pre-trial period (PP) to the place and conditions of the experiment and 5 days of the experimental period (PE). In the PP period, all cows were cooled with the fans and sprinklers and the last day was considered day 0 (D0). In the PE period, only VA cows were cooled. The evaluation of dry matter intake and milk production was performed daily. On day 0 of the PP period and days 1, 3, and 5 of the PE period, milk samples were collected for composition analysis, physicochemical analysis of milk and somatic cells. On these same days, blood samples were collected for analysis of total protein, albumin, urea, creatinine, glucose, beta-hydroxybutyrate, and respiratory rate, surface temperature, rectal temperature, and ruminal movements were evaluated. The experimental design was a 2 x 3 factorial, with two treatments (VA, cooled cows; SVA, not cooled cows), and three days (day 1, day 3, and day 5). Data from D0 were considered covariates in the statistical model. Data were subjected to analysis of variance and tested for normality of residuals by the Shapiro-Wilk Test. For dry matter intake, there was an interaction between treatment and day ($P = 0.0001$). Milk production

was similar between treatments ($P = 0.873$). Milk composition between VA and SVA treatments was similar, differing only in protein content, which was higher in VA treatment ($P = 0.001$). Mean milk alcohol test results were higher in the SVA treatment ($P = 0.005$). There was an interaction between treatment and day for titratable acidity ($P = 0.003$). Cryoscopy was higher in the VA treatment ($P = 0.006$). The SVA treatment cows had higher morning ruminal movements values ($P = 0.032$). There was an interaction between treatment and day for morning rectal temperature ($P=0.0002$), afternoon respiratory frequency ($P<0.0001$), afternoon superficial temperature ($P<0.0001$) and afternoon rectal temperature ($P<0.0001$). The beta-hydroxybutyrate concentration was higher in the VA treatment ($P < 0.0001$). A short period of heat stress does not immediately affect milk production but does affect the composition and physicochemical properties of milk. Active cooling of cows with ventilation and sprinkler influences the amount of heat produced and retained, affecting physiological parameters, blood metabolites, components, and physicochemical properties of milk.

Keywords – heat, thermotolerance, physicochemical properties of milk

3.3 INTRODUÇÃO

As elevadas temperaturas ambientais afetam a produtividade e o bem-estar animal, causando consideráveis prejuízos econômicos na pecuária global. O estresse calórico pode ser definido como uma condição fisiológica em que a temperatura corporal central de uma determinada espécie excede sua faixa termoneutra, ocasionando um acúmulo de calor, que pode ser proveniente do próprio organismo ou oriundo do ambiente (BERNABUCCI et al., 2010). O equilíbrio térmico pode ser afetado por diferentes elementos climáticos (temperatura ambiente, umidade relativa, radiação solar, movimento do ar e precipitações), fatores animais (taxa metabólica, taxa de sudorese) e mecanismos termorregulatórios dos animais (COLLIER et al., 2008).

Em vacas leiteiras sob estresse calórico, pode ocorrer uma redução no consumo de matéria seca (CMS), mudanças fisiológicas e comportamentais para dissipar o calor (COLLIER et al., 1982). Além disso, a seleção genética, com ênfase para características produtivas, aliada a depressão endogâmica, resultado do pequeno tamanho populacional observado nas raças leiteiras, trouxe consequências negativas e efeitos deletérios sobre a

reprodução, imunidade e o balanço homeostático e conseqüentemente, tornou vacas leiteiras de alta produção, mais susceptíveis ao estresse calórico (HU et al., 2016; KRISTENSEN et al., 2004).

Para Collier et al. (2008), a resposta ao choque térmico se inicia quando a temperatura superficial dos animais for maior que 35⁰C, ativando um conjunto de genes, com sinais intra e extracelulares que coordenam o metabolismo celular. Richter et al. (2010), sugerem que o acúmulo deletério de proteínas desdobradas e agregadas, devido a pequenos aumentos na temperatura corporal, seja o sinal para o início da resposta ao choque térmico. Em nível celular, a resposta ao choque térmico inicia com a ativação do fator de transcrição de choque térmico 1 (HSF1), aumento da expressão de proteínas de choque térmico (HSP), diminuição da expressão e síntese de outras proteínas, aumento da oxidação de glicose e aminoácidos, metabolismo reduzido de ácidos graxos e ativação do sistema imunológico através da secreção extracelular de HSP (COLLIER, 2008). Deb et al. (2014), sugerem que a diferença na expressão de HSP sob estresse calórico pode parcialmente explicar a maior tolerância ao estresse calórico de raças tropicais de bovinos em comparação com raças europeias (DEB et al., 2014).

Apesar dos grandes avanços em ambiência e sistemas de resfriamento, o clima quente ainda representa um grande desafio para a produção leiteira. Considerando que existem diferenças de termotolerância entre raças e indivíduos, identificar animais e formas mais eficazes de mitigação de calor e selecionar indivíduos produtivos e mais resistentes a condições adversas, melhora a renda da atividade leiteira. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar o efeito do estresse calórico sobre o consumo, a produção e qualidade do leite e indicadores bioquímicos e fisiológicos de vacas Holandês e Jersey.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em uma propriedade rural no município de Itapiranga, SC, Brasil (latitude 27° 7'2.12"S, longitude 53°47'42.57"O) e de acordo com Dubreuil et al. (2018), a região apresenta um clima do tipo Cfa (subtropical úmido), de acordo com a classificação de Köppen-Geiger. Todos os procedimentos envolvendo as vacas do experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina com número de protocolo 6172220518.

3.4.1 Animais e alojamento

Dezesseis vacas, (n = 8) Holandês e (n = 8) Jersey foram alojadas e divididas em dois grupos em um galpão de confinamento, com sistema *Compost Bedded Pack Barn*: grupo com ventilação por toda a área de alojamento e aspersão na linha do cocho (VA) e grupo sem ventilação e aspersão (SVA). O galpão de confinamento de dimensões 40 m x 9 m, proporcionava uma área de 11,62 m² de área por animal. As vacas foram divididas em grupos homogêneos quanto ao peso vivo, paridade, dias em lactação (DEL), escore de condição corporal (ECC) e produção de leite. Cada grupo foi constituído por 4 vacas Holandês e 4 vacas Jersey: grupo VA (PV= 473,8 ± 86,4 kg; paridade = 2,43 ± 1,3; DEL = 130,9 ± 94; ECC = 3,02 ± 0,2 e leite = 22 ± 6 kg/dia); grupo SVA (PV= 477,7 ± 65,7 kg; paridade = 2,37 ± 1,3; DEL = 123,8 ± 83,4; ECC = 3,00 ± 0,3 e leite = 21,7 ± 4,5 kg/dia).

O experimento teve a duração de 19 dias: período pré-experimental (PP) de 14 dias e período experimental de 5 dias (PE) para avaliar os efeitos do estresse calórico. No período PP, as vacas foram adaptadas ao manejo e aos lotes e todos os animais foram resfriados com auxílio de ventiladores em toda a área de alojamento e aspersores na linha do cocho. O sistema de resfriamento das vacas incluía ventiladores (diâmetro = 2 m) que proporcionaram uma velocidade média de vento de 3,72 m/s no local de alojamento das vacas. A aspersão, instalada acima da linha do cocho, com bicos de aspersão a cada 0,9 m, proporcionava o resfriamento com água para cada vaca durante os horários de alimentação. A ventilação e aspersão eram controladas automaticamente, com acionamento quando a temperatura ambiental era igual ou superior a 24°C. A ventilação era contínua e a aspersão funcionava em ciclos intermitentes de 2 minutos de aspersão e 15 minutos com o sistema desligado. O último dia do período PP foi considerado como dia 0 (D0) e todas as vacas tinham acesso a ventilação e aspersão. Do dia 1 ao dia 5, apenas as vacas do grupo VA continuaram com acesso a ventilação e a aspersão. A coleta de dados, amostras sanguíneas e de leite foram realizadas no D0, D1, D3 e D5. Os dois grupos de vacas do experimento foram separados entre si e do restante dos animais no galpão de confinamento através de cercas elétricas.

3.4.2 Condições ambientais do confinamento

As condições de temperatura e umidade dentro do galpão de alojamento foram determinadas com auxílio de um *datalogger* e mensuradas em intervalos de 15 minutos. A partir dos dados de temperatura e umidade foi calculado o índice de temperatura e umidade (ITU) de acordo com a fórmula: $ITU = (1,8 \times T + 32) - [(0,55 - 0,0055 \times UR) \times (1,8 \times T - 26)]$, onde: T = temperatura do ar (°C) e UR = umidade relativa do ar (%) (MADER; DAVIS; BROWN-BRANDL, 2006).

3.4.3 Peso vivo, escore de condição corporal

O peso vivo foi determinado no início do período de adaptação com auxílio de uma balança digital Filizola (Filizola Balanças Industriais, São Paulo, Brasil). O ECC foi determinado no início do período de adaptação de acordo com a metodologia de Ferguson et al. (1994).

3.4.4 Frequência respiratória, temperatura superficial, temperatura retal e movimentos ruminais

A FR foi aferida pela contagem dos movimentos do flanco, durante 15 segundos, sendo este valor, multiplicado por quatro para se obter a frequência por minuto (PILATTI, 2017). A temperatura superficial das vacas foi determinada com um termômetro de infravermelho a 1 m de distância do animal. A mensuração foi realizada em 5 pontos do corpo do animal e posteriormente foi calculado a média aritmética dos 5 pontos, conforme a metodologia descrita por Pilatti (2017) e mostrado na Figura 1.

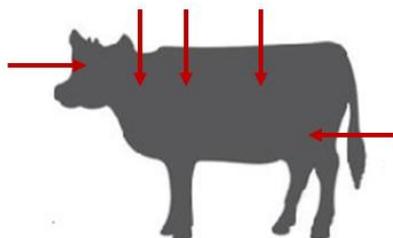


Figura 1. Pontos de medida da temperatura superficial

A FR, a TS, a TR e os MR das vacas foram determinados duas vezes ao dia no PE, as 10 h e as 19 h, nos D0, D1, D3 e D5.

3.4.5 Consumo de matéria seca e coleta de amostras de alimentos

A dieta das vacas foi formulada para atender 100% das exigências nutricionais, de acordo com o NRC (2001) (Tabela 1), sendo fornecida na forma de dieta total (TMR). O alimento foi fornecido em cochos individuais para cada vaca em quatro horários: 08:00, 12:00, 16:00 e 19:00. A duração de acesso das vacas ao alimento em cada horário foi de 1 h e 30 min. Comida fresca foi ofertada em dois horários: às 08:00 e às 16:00. A quantidade de alimento ofertada para cada animal era ajustada diariamente a fim de proporcionar sobras entre cinco e dez por cento. As sobras eram recolhidas para pesagem diariamente após o último período de fornecimento de alimento. Amostras das sobras e dos alimentos foram coletadas no D0, D1 e D5. Para a realização das análises bromatológicas, foram coletadas amostras individuais das sobras de cada vaca, de silagem de milho, feno de tifton, concentrado comercial e farelo de soja. As amostras foram submetidas a secagem em estufa com ventilação forçada (Solab SL-31, Piracicaba, Brasil) a 60°C durante 72 horas e posteriormente moídas em peneira de 1 mm. Para determinar o teor de matéria seca (MS), as amostras moídas foram submetidas a secagem em estufa a 105°C por 24 horas. As amostras de cada alimento e sobras coletadas, foram agrupadas para posterior análise química. A matéria mineral foi determinada por queima em forno mufla a 550°C durante 4 horas. O teor de fibra em detergente neutro (FDN) foi determinado conforme proposto por (MERTENS et al., 2002). O teor de nitrogênio total foi determinado em um equipamento Leco (Saint Joseph, MI, USA) e teor de extrato etéreo (EE) foi determinado em um extrator Soxhlet, com éter etílico por 4 horas. Os carboidratos não fibrosos (CNF) foram obtidos pelo cálculo por diferença através da fórmula: $CNF = 100 - (\%FDN + \%PB + \%EE + \%MM)$, onde, FDN: fibra em detergente neutro, PB: proteína bruta, EE: extrato etéreo e MM: matéria mineral (NRC, 2001).

Tabela 1. Composição e constituição bromatológica da dieta com base na matéria seca (MS) fornecida às vacas

Itens (% da MS)	Dieta Total
Silagem de milho	48,63
Feno de Tifton-85	11,89
Concentrado comercial ¹	30,25
Farelo de soja	7,78
Suplemento mineral ²	1,45
PB	18,21
FDN	31,13
FDA	21,84
EE	3,79
MM	8,28
CNF	39,73
Energia líquida de lactação (Mcal/ kg de MS)	1,55

¹Puro Milk Bypass 26 PB (Puro Trato). Níveis de garantia, FDN=18%, FDA=9%, cinzas 9%, extrato etéreo= 5%, umidade= 13% Ca=12,5%, P=0,6%, S=0,13%, Mg=0,3%, K=0,002%, Co=0,92 mg/kg, Cu=27,37 mg/kg, Zn= 146 mg/kg, Fe= 40 mg/kg, Mn = 96 mg/kg, I = 2,12 mg/kg, Se = 1 mg/kg, vitamina A= 11.800 UI/kg, vitamina D= 2.800 UI/kg, vitamina E 50 UI/kg, biotina 6 mg/kg e monensina sódica 40 mg/kg.

² Mistura mineral contendo 45% de bicarbonato de sódio e 55% de núcleo mineral (Miner A1 Pro Biotina), Ca=23%, P=6%, S=2%, Mg=1,2%, K=0,35%, Na=4,7%, Cl= 7%, Co=95 mg/kg, Cu=950 mg/kg, Zn=6.000 mg/kg, Fe= 700 mg/kg, Mn = 3.000 mg/kg, I = 80 mg/kg, Se = 30 mg/kg, vitamina A= 600.000 UI/kg, vitamina D= 12.0000 UI/kg, vitamina E 2.500 UI/kg, niacina 2.500 mg/kg, biotina 150 mg/kg.

3.4.6 Coleta e análise de amostras de leite

As vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia, às 07:00 e às 17:30. A produção de leite foi medida diariamente durante o período de adaptação e do período de coletas, utilizando-se medidores de leite WAIKATO Multi Meter. Nos dias D0, D1, D3 e D5, coletou-se amostras de leite de cada vaca, compostas por uma alíquota da produção de leite da tarde e da manhã. As amostras foram acondicionadas em recipientes com bronopol como conservante e enviadas ao Laboratório da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH) em Curitiba, PR, para realização das análises dos teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e nitrogênio ureico do leite (NUL), pelo método de infravermelho (Bentley Combisystem, Bentley Instruments Inc., USA). A contagem de células somáticas foi determinada por citometria de fluxo (Delta Combiscope, Advanced Instruments Inc., USA). O escore de células somáticas (ECS) foi calculado pela fórmula: $ECS = \log_2(CCS/100) + 3$.

Nos dias D0, D1, D3 e D5, coletou-se outra amostra de leite de cada vaca, compostas por uma alíquota da produção de leite da tarde e da manhã, as quais foram

acondicionadas em recipientes sem conservante e mantidas refrigeradas por 12 h entre 3 e 8°C, para a realização do teste do álcool, acidez Dornic e crioscopia. O pH do leite foi mensurado utilizando-se um pHmetro Kasvi K39 (Kasvi, São José dos Pinhais, PR). Foi realizado o teste do álcool, misturando-se 2 mL de leite e 2 mL de etanol em uma placa de Petri sob um fundo preto. As soluções de etanol utilizadas variavam entre 56 e 80% (v/v) e foram preparadas com concentrações de etanol variando em intervalos de 2%. A amostras de leite analisadas pelo teste do álcool eram consideradas instáveis quando ocorria a formação de grumos e a concentração da solução de etanol registrada. A acidez titulável foi determinada em graus Dornic (°D) conforme a metodologia descrita na IN 68 (BRASIL, 2006) em que, a uma amostra de 10 mL de leite, adicionava-se 4 a 5 gotas da solução de fenoftaleína a 1%. A solução resultante era titulada com uma solução de NaOH 0,1 mol/L até aparecimento de coloração rósea persistente por aproximadamente 30 segundos.

3.4.7 Coleta e análise de amostras de sangue

Nos dias D0, D1, D3 e D5, após o fornecimento de alimento, coletou-se amostras de sangue da veia coccígea com auxílio de agulha 21 G. Coletou-se uma quantidade de sangue para preencher dois tubos vacutainer de 10 mL com heparina lítica (BD, New Jersey, USA), dois tubos vacutainer de 4 mL, com K₂EDTA (tetra-acetato de etilenodiamino de potássio) (BD, New Jersey, USA) e dois tubos de 10 mL com ativador de coágulo para coleta de soro (BD, New Jersey, USA). Após a coleta, o sangue foi centrifugado a 1.328 g durante 10 minutos. As amostras de plasma e soro resultantes foram acondicionadas em tubos de plástico de 2 mL e congeladas até a realização das análises.

As concentrações de proteína total e albumina foram determinadas em soro e as concentrações de ureia e creatinina foram determinadas em plasma, usando um espectrofotômetro semi-automático (Bio2000 da Bioplus, Baueri, SP, Brasil), por espectroscopia UV-visível, usando-se kits comerciais (Analisa Gold, Belo Horizonte, MG, Brasil), de acordo com as respectivas instruções de uso. A concentração de globulinas foi obtida pelo cálculo entre a diferença de concentração das proteínas totais e da albumina. As concentrações de beta-hidroxibutirato (BHB) e glicose foram determinadas imediatamente após a coleta, no sangue acondicionado em tubos vacutainer contendo EDTA sódico. As análises foram realizadas utilizando-se um analisador portátil

Optium Xceed (Abbott, Chicago, Illinois, USA). Foram utilizadas tiras para determinação de glicose e beta-hidroxibutirato (Abbott, Chicago, Illinois, USA).

3.4.8 Análise de dados

Os dados foram submetidos à análise de variância e previamente testados para normalidade de resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk, utilizando o pacote estatístico SAS (SAS, 2017). O último dia do período pré-experimental foi considerado como dia 0 (D0) e os dados coletados foram utilizados como covariáveis no modelo estatístico. Foram incluídos no modelo estatístico os efeitos do tratamento, dos dias de tratamento, da interação tratamento e dia e do valor observado para cada variável dependente no D0, como covariável. As médias foram consideradas diferentes se $P \leq 0,05$.

3.5 RESULTADOS

Os valores relativos ao índice de temperatura e umidade (ITU) são mostrados na Figura 2.

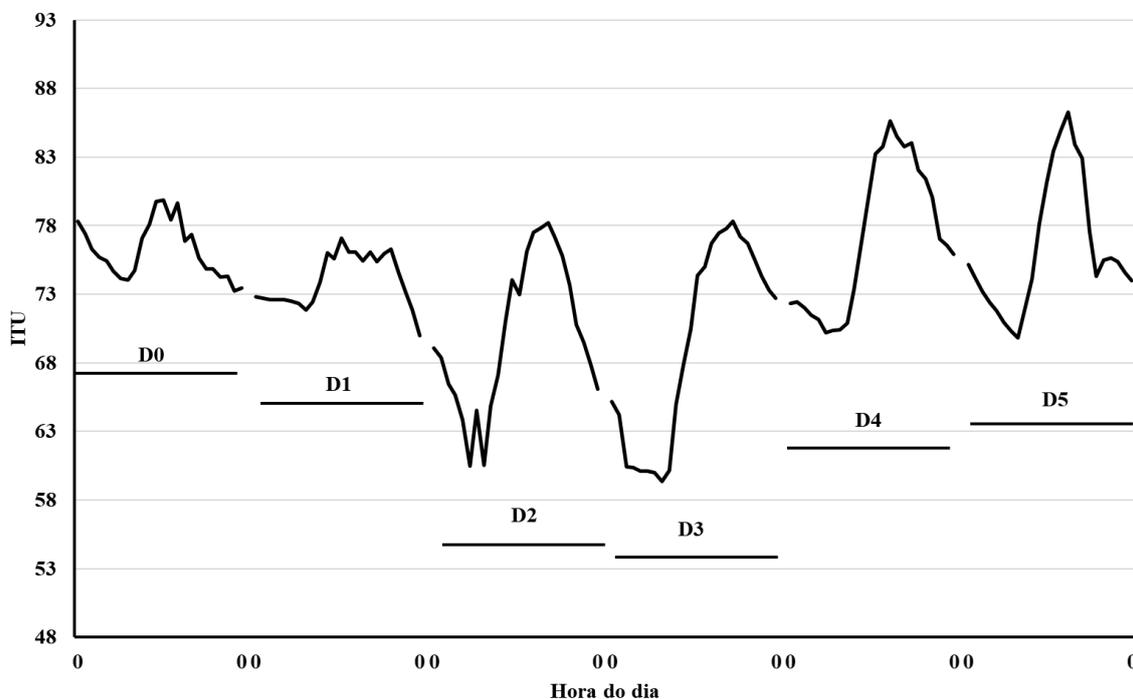


Figura 2. Índice de Temperatura e Umidade (ITU) determinado durante o período experimental (PE) nos ambientes dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA (sem ventilação e aspersão)

Para o CMS, houve interação entre tratamento e dia ($P = 0,0001$). A produção de leite foi similar entre tratamentos ($P = 0,873$), havendo, efeito de dia ($P = 0,017$). A composição do leite entre os tratamentos VA e SVA foi similar, diferindo apenas no teor de proteína, maior no tratamento VA ($P = 0,001$). Houve efeito de dia para ECS ($P = 0,015$). Os resultados completos são mostrados na Tabela 2, Figura 3 (A, B, C e D) e Figura 4 (A, B, C e D).

Tabela 2. Média dos quadrados mínimos, erro padrão da média (SEM) e valor de P para consumo de matéria seca (CMS), produção, composição do leite, escore de células somáticas (ECS) e nitrogênio ureico do leite (NUL) avaliado nas vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA (sem ventilação e aspersão)

Variáveis	Tratamento		SEM	P-value			
	VA	SVA		Trat.	Dia	Trat. x Dia	Cov.
CMS (kg/dia)	16,70	16,32	0,820	0,742	<0,0001	0,0001	0,264
Leite (kg/dia)	21,01	21,05	0,159	0,873	0,017	0,899	<0,0001
Gordura (%)	3,92	3,76	0,113	0,314	0,108	0,234	<0,0001
Proteína (%)	3,42	3,38	0,014	0,046	0,001	0,415	<0,0001
Lactose (%)	4,39	4,45	0,026	0,092	0,947	0,302	<0,0001
Sólidos totais (%)	12,75	12,63	0,127	0,509	0,513	0,458	<0,0001
NUL (mg/dL)	14,81	13,02	0,952	0,236	0,056	0,406	0,005
ECS	4,41	4,29	0,144	0,540	0,015	0,537	<0,0001

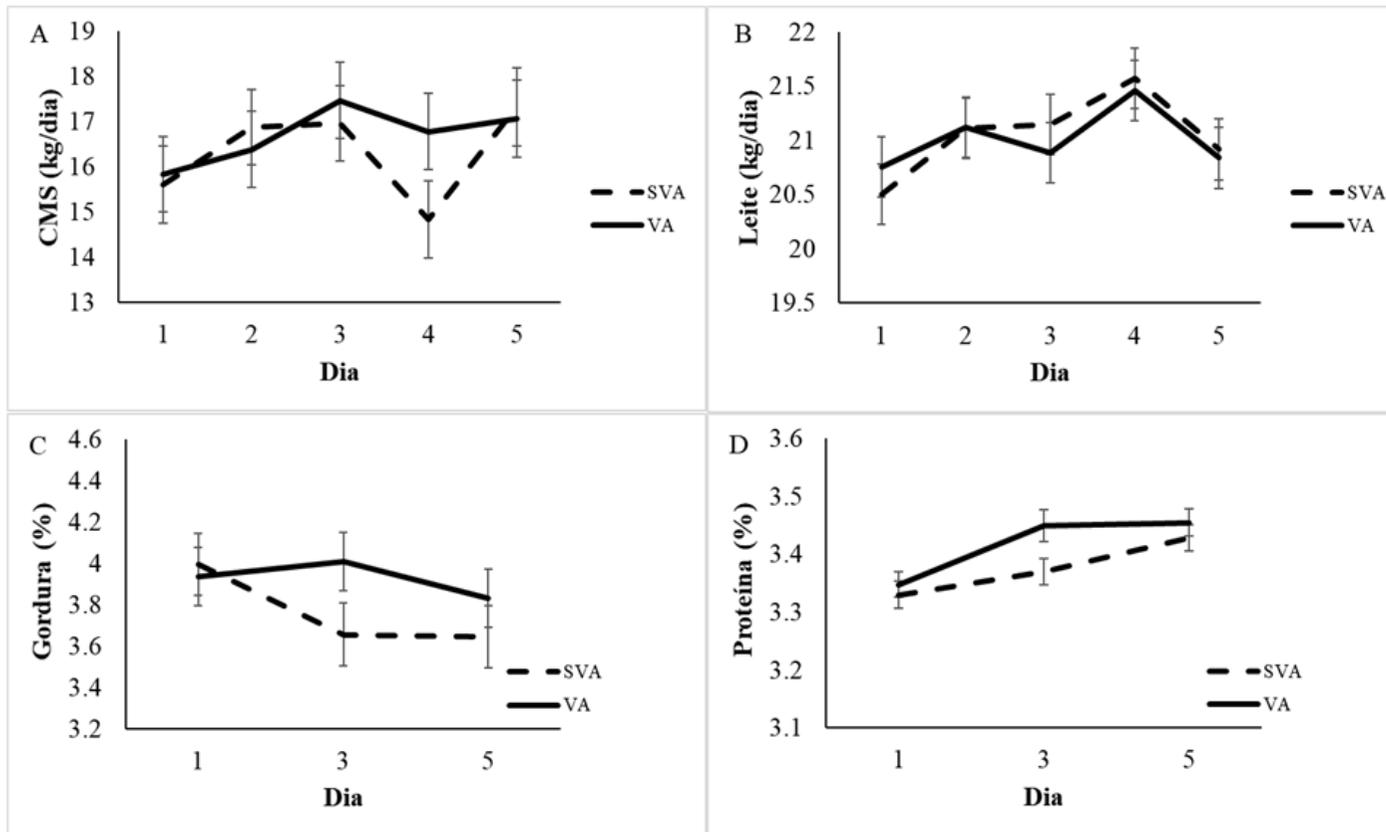


Figura 3. (A) Consumo de matéria seca (CMS), (B) produção de leite, (C) teor de gordura e (D) teor de proteína das vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA (sem ventilação e aspersão) em função dos dias de tratamento

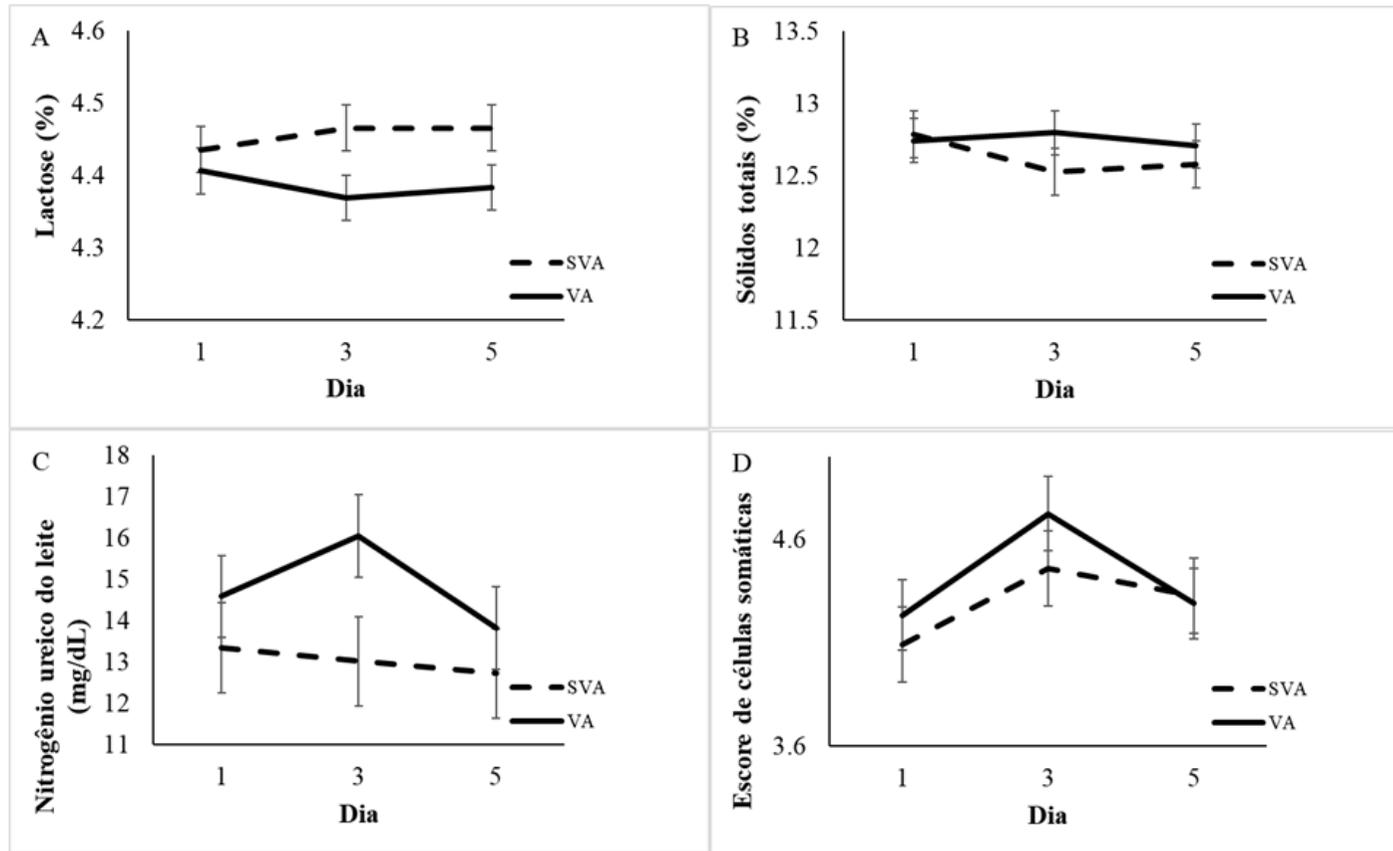


Figura 4. Teor de lactose, sólidos totais, nitrogênio ureico do leite (NUL), e escore de células somáticas (ECS) das vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA (sem ventilação e aspersão) em função dos dias de tratamento

A média dos resultados do teste do álcool do leite foi maior no tratamento SVA ($P = 0,005$). Houve interação entre tratamento e dia para acidez titulável ($P = 0,003$). Houve apenas efeito de dia para pH ($P < 0,0001$). A crioscopia foi mais elevada no tratamento VA ($P = 0,006$), além do efeito de dia ($< 0,0001$). Os resultados detalhados são mostrados na Tabela 3 e Figura 5 (A, B, C e D).

Tabela 3. Média dos quadrados mínimos, erro padrão da média (SEM) e valor de P para as propriedades físico-químicas do leite avaliado nas vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA (sem ventilação e aspersão)

Variáveis	Tratamento		SEM	P-value			
	VA	SVA		Trat.	Dia	Trat. x Dia	Cov.
Teste do Etanol (%)	77,14	79,01	0,431	0,005	0,560	0,134	<0,0001
Acidez Dornic ($^{\circ}$ D)	15,90	15,46	0,205	0,148	<0,0001	0,003	<0,0001
pH	6,83	6,81	0,025	0,579	<0,0001	0,516	0,003
Crioscopia ($^{\circ}$ H)	-0,5455	-0,5493	0,001	0,006	<0,0001	0,189	0,007

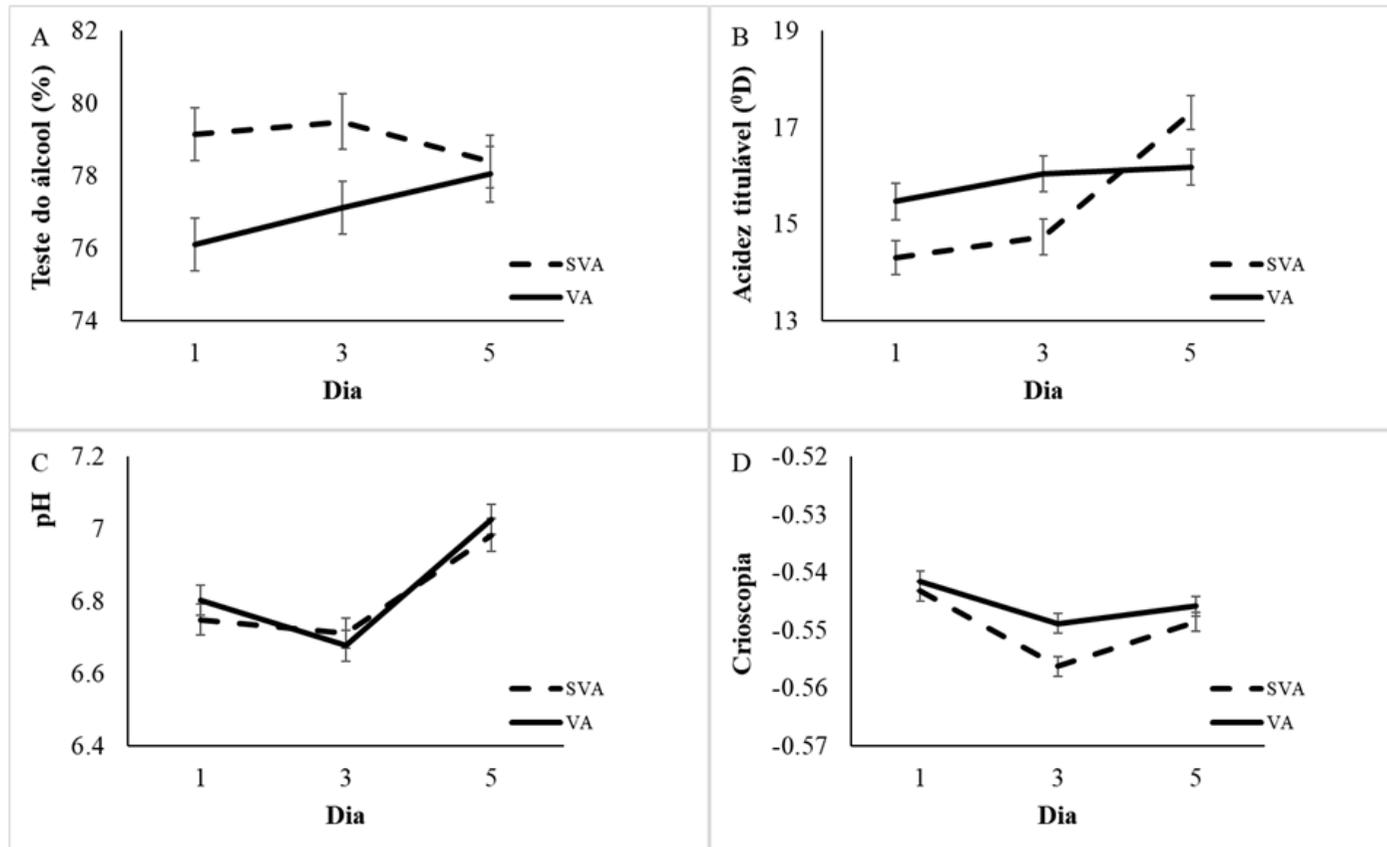


Figura 5. Propriedades físico-químicas do leite avaliado nas vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA (sem ventilação e aspersão) em função dos dias de tratamento: A) teste do álcool, B) acidez titulável, C) pH, D) crioscopia

Houve efeito de dia para FR manhã ($P < 0,0001$), TS manhã tarde ($P < 0,0001$) e MR tarde ($P = 0,042$). O tratamento SVA apresentou valores maiores de MR manhã ($P = 0,032$). Houve interação entre tratamento e dia para TR manhã ($P = 0,0002$), FR tarde ($P < 0,0001$), TS tarde ($P < 0,0001$) e TR tarde ($P < 0,0001$). Os resultados detalhados são mostrados na Tabela 4, Figura 6 (A, B, C e D) e Figura 7 (A, B, C e D).

Tabela 4. Média dos quadrados mínimos, erro padrão da média (SEM) e valor de P para os parâmetros fisiológicos avaliado nas vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA (sem ventilação e aspersão)

Variáveis	Tratamento		SEM	P-value			
	VA	SVA		Trat.	Dia	Trat. x Dia	Cov.
FR (resp./min) manhã	71,29	66,44	2,817	0,254	<0,0001	0,142	0,003
TS ($^{\circ}$ C) manhã	37,05	37,17	0,117	0,515	<0,0001	0,080	0,906
TR ($^{\circ}$ C) manhã	38,98	39,07	0,060	0,288	<0,0001	0,0002	0,006
MR (mov./2 min) manhã	3,17	3,85	0,213	0,032	0,110	0,364	0,060
FR (resp./min) tarde	64,94	65,06	2,530	0,975	<0,0001	0,0001	0,563
TS ($^{\circ}$ C) tarde	36,40	36,72	0,069	0,005	0,139	<0,0001	0,0002
TR ($^{\circ}$ C) tarde	38,92	39,06	0,085	0,255	<0,0001	<0,0001	<0,0001
MR (mov./2 min) tarde	3,95	4,34	0,260	0,345	0,042	0,221	0,691

FR: frequência respiratória; TS: temperatura superficial; TR: temperatura retal; MR: movimentos ruminais

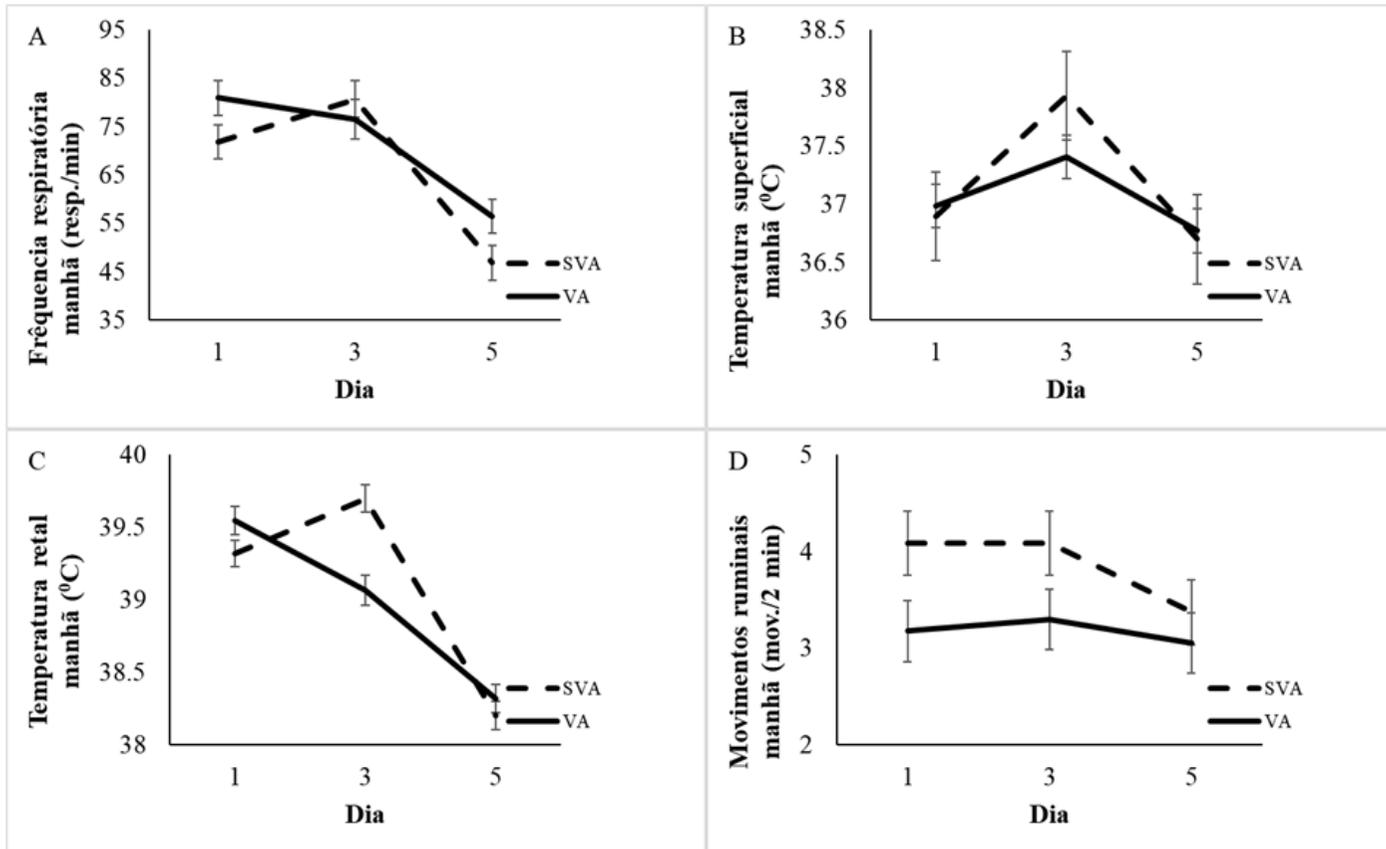


Figura 6. Parâmetros fisiológicos avaliados nas vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA (sem ventilação e aspersão) em função dos dias de tratamento: a) Frequência respiratória da manhã (FR manhã), B) Temperatura superficial da manhã (TS manhã), C) Temperatura retal da manhã (TR manhã), d) Movimentos ruminais da manhã (MR manhã)

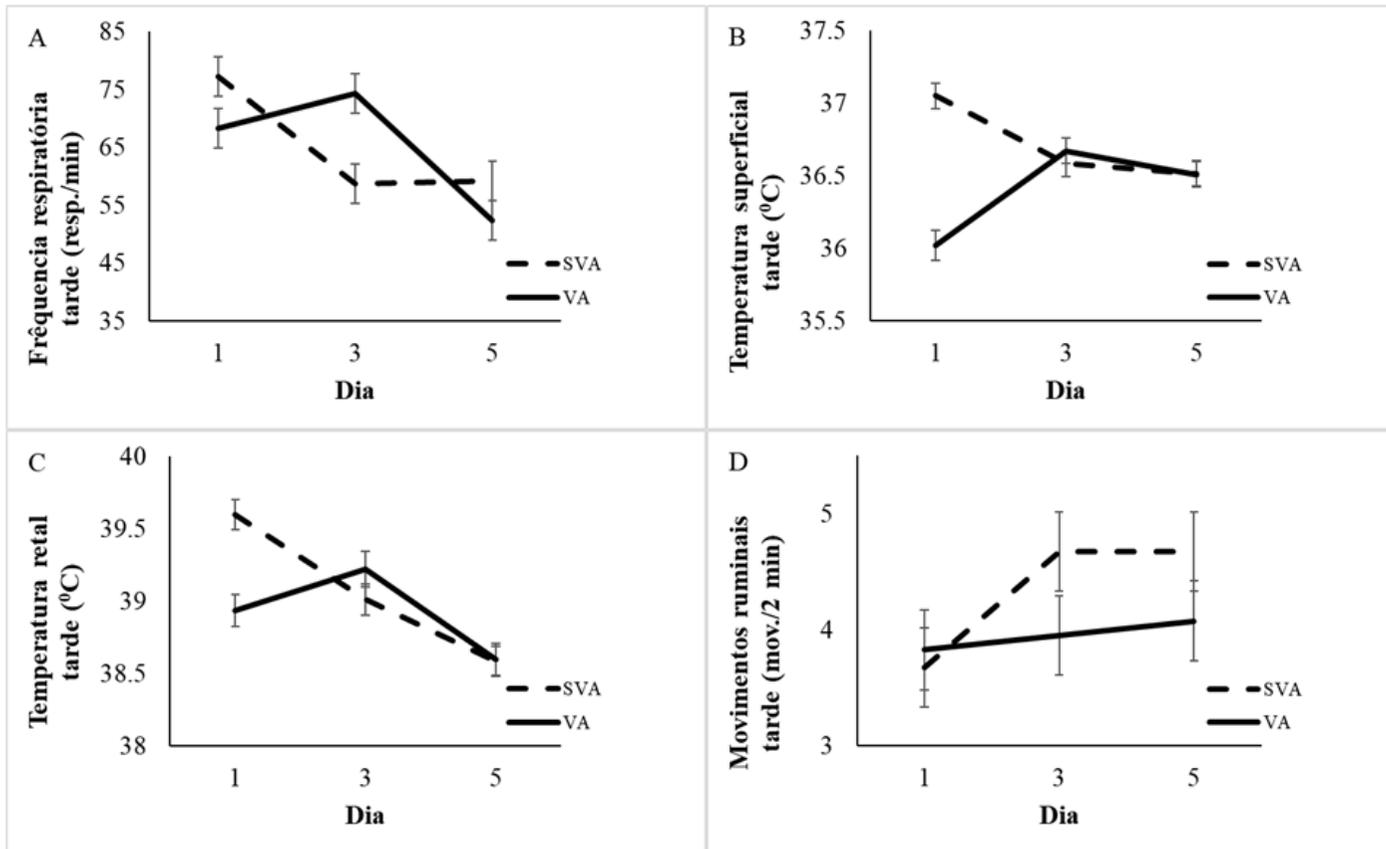


Figura 7. Parâmetros fisiológicos avaliados nas vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA (sem ventilação e aspersão) em função dos dias de tratamento: A) Frequência respiratória da tarde (FR tarde), B) Temperatura superficial da tarde (TS tarde), C) Temperatura retal da tarde (TR tarde), D) Movimentos ruminais da tarde (MR tarde)

Nos parâmetros bioquímicos avaliados, os tratamentos diferiram na concentração de beta-hidroxibutirato, maior no grupo VA ($P < 0,0001$). Houve efeito de dia para proteína total ($P = 0,0004$), globulinas ($P = 0,028$), ureia ($P < 0,0001$), creatinina ($P < 0,0001$) e BHB ($P < 0,0001$). Os resultados detalhados são mostrados na Tabela 5 e na Figura 8 (A, B, C e D) e Figura 9 (A, B e C).

Tabela 5. Média dos quadrados mínimos, erro padrão da média (SEM) e valor de P para os parâmetros bioquímicos avaliados nas vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA (sem ventilação e aspersão)

Variável	Tratamento		SEM	P-value			
	VA	SVA		Trat.	Dia	Trat. x Dia	Cov.
Proteína total (g/L)	0,05	0,05	0,003	0,952	0,0004	0,923	0,693
Albumina (g/L)	0,03	0,03	0,002	0,682	0,763	0,365	0,172
Globulinas (g/L)	0,03	0,03	0,005	0,669	0,028	0,549	0,773
Ureia (mg/dL)	33,82	28,82	3,410	0,358	<0,0001	0,313	0,821
Creatinina (mg/dL)	0,94	0,99	0,057	0,515	<0,0001	0,175	0,615
Glicose (mg/dL)	53,02	51,11	2,607	0,610	0,169	0,459	0,431
Beta-hidroxibutirato (mmol/L)	1,77	1,20	0,087	<0,0001	<0,0001	0,070	0,001

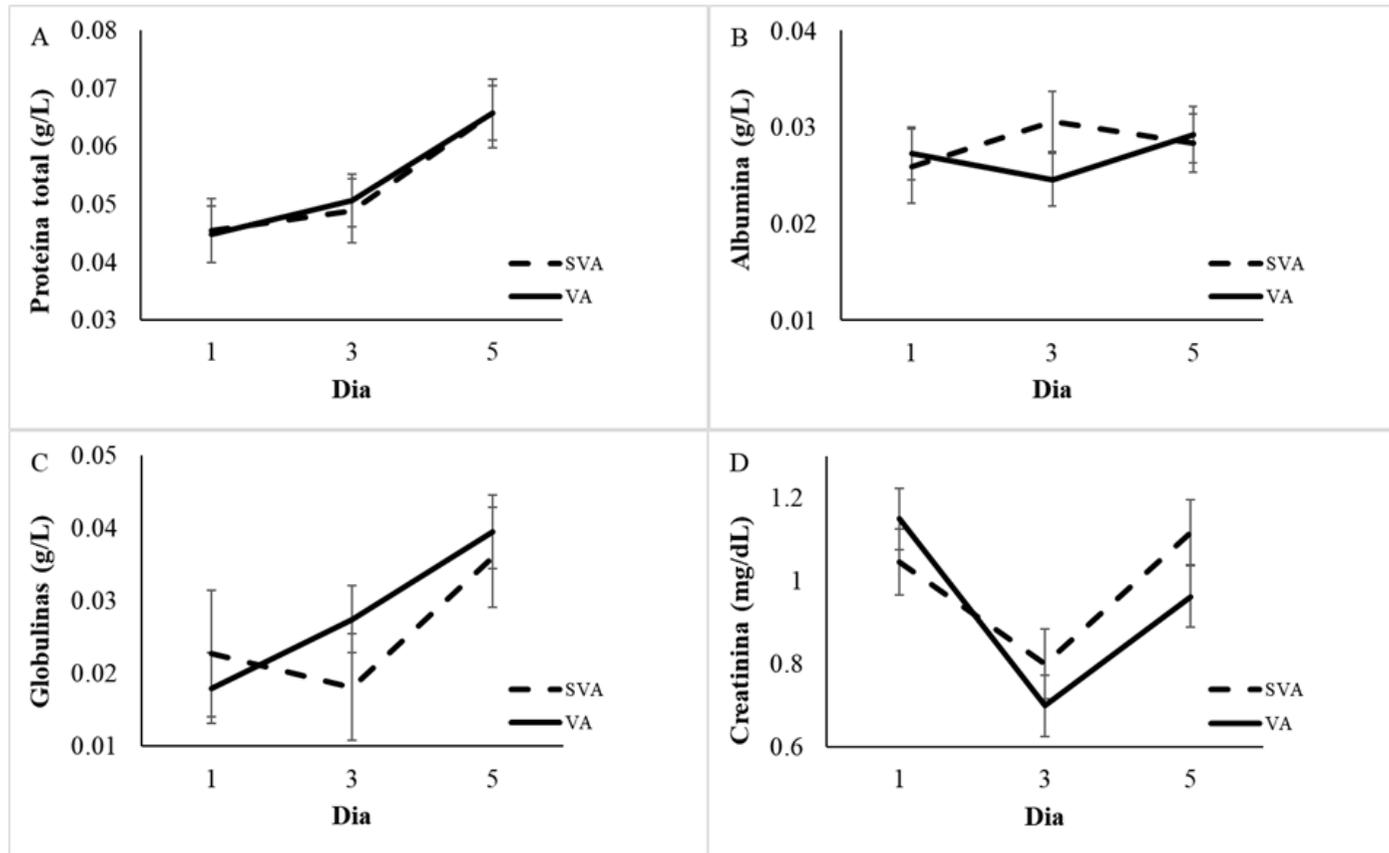


Figura 8. Parâmetros bioquímicos avaliados nas vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA (sem ventilação e aspersão) em função dos dias de tratamento: A) Proteína total, B) Albumina, C) Globulina, D) Creatinina

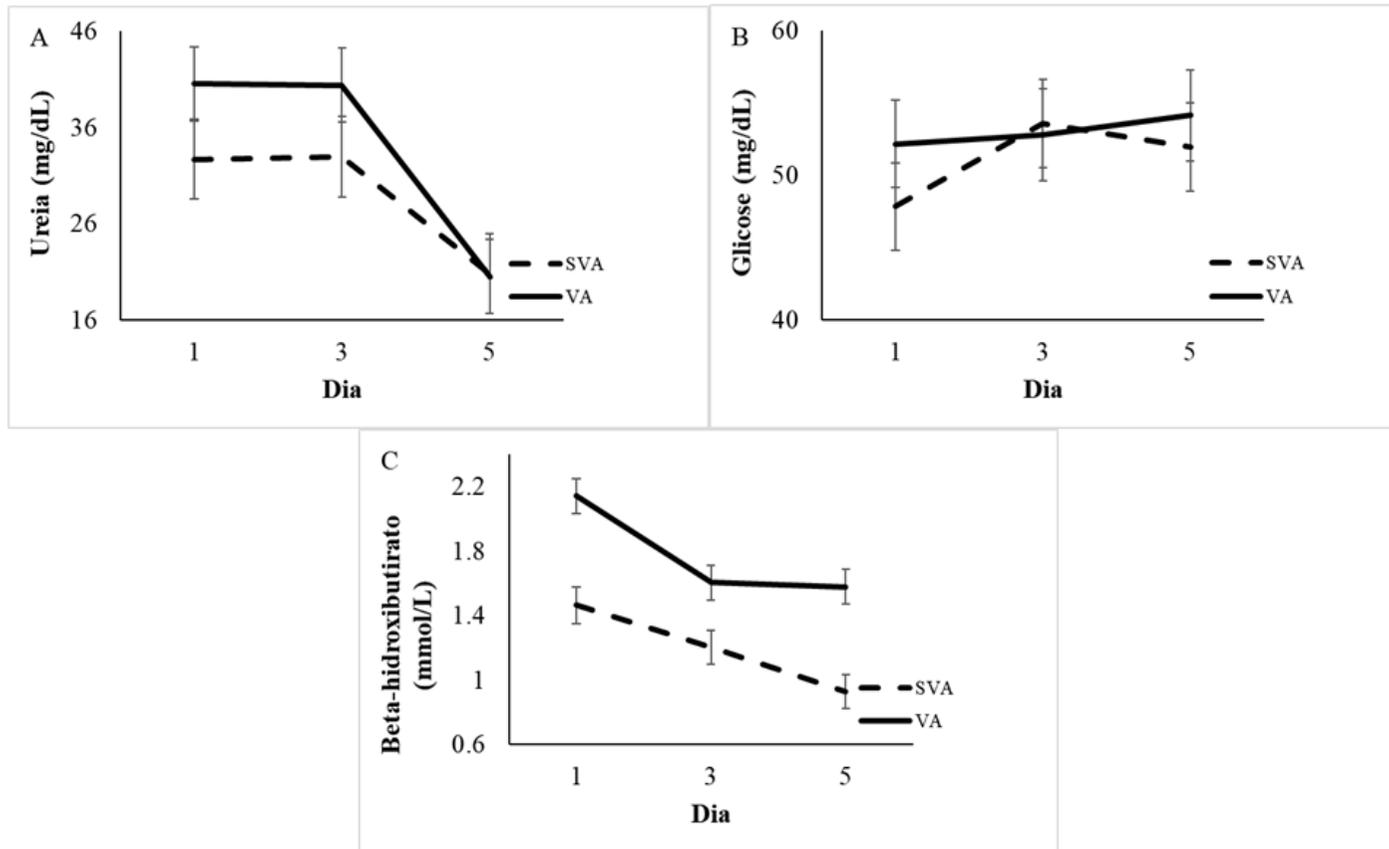


Figura 9. Parâmetros bioquímicos avaliados nas vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA (sem ventilação e aspersão) em função dos dias de tratamento: A) Ureia, B) Glicose, C) Beta-hidroxibutirato

36 DISCUSSÃO

O ITU é usado para estimar as necessidades de resfriamento em vacas leiteiras. Zimbelman et al. (2009), com base em dados fisiológicos e produtivos, determinaram que o limiar para condições termoneutras e de estresse calórico em vacas leiteiras de alta produção é um ITU de 68. O ITU, determinado nos dias do experimento, mostra condições fora da zona termoneutra para vacas leiteiras (Figura 2).

O efeito mais reconhecido da elevação da temperatura corporal é a depressão adaptativa da taxa metabólica associada à redução do apetite (SILANIKOVE, 2000; RENQUIST, 2019). O estresse calórico causa uma diminuição do CMS, da produção de leite e de componentes do leite (WHEELLOCK et al., 2010; RHOADS et al., 2009). Tao et al. (2018), observaram que vacas resfriadas em comparação com vacas não resfriadas no estágio inicial da lactação tiveram uma produção similar de leite durante a primeira semana de avaliação e redução nas semanas posteriores. Diferente das vacas no início da lactação, a produção de leite diminuiu na primeira semana de avaliação em vacas no meio e no estágio final da lactação em condições de estresse calórico. Com isto mostraram que, os efeitos do estresse calórico em vacas leiteiras dependem do estágio da lactação. Em nosso trabalho verificamos uma interação entre tratamento e dia para CMS e produção de leite similar entre tratamentos. Estes resultados podem estar relacionados ao período curto do experimento e ao estágio da lactação das vacas.

Os efeitos do estresse calórico sobre a composição do leite são diversos. Normalmente, junto com a redução da produção, ocorre uma redução dos componentes do leite. Porém, vários trabalhos mostram resultados distintos para os teores de gordura e proteína do leite, que podem ser maiores, menores ou permanecem inalterados no verão. Heck et al. (2009), encontrou menores teores de gordura no leite produzido no verão quando comparado com leite produzido no inverno, enquanto que, Smith et al. (2013), observaram uma diminuição do teor de gordura do leite em vacas Holandês e Jersey em condições de ITU maior ou igual a 72. Bernabucci et al. (2015) encontrou teores de proteína mais baixos no verão em relação ao inverno (Verão = 3,29% e Inverno = 3,5%; $P < 0,05$). Para Tao et al. (2018), resultados divergentes entre estudos relacionados ao estresse calórico e a composição do leite podem estar ligados a diferença de dietas, estágio da lactação das vacas, grau de estresse, duração dos ensaios e modelos experimentais de avaliação animal. Os resultados de composição do leite, encontrados em nosso trabalho, mostram que o estresse calórico afetou principalmente o teor de proteína do leite.

O estresse calórico afetou as propriedades físico-químicas do leite. As vacas do tratamento SVA apresentaram maior valor na média de resultados no teste do álcool e menor crioscopia que as vacas do tratamento VA, além de haver interação entre tratamento e dia para acidez titulável. Fagnani et al. (2018), determinaram que o leite instável ao teste do etanol 72% quando comparado com o leite estável, continha menor concentração de alfa-lactoalbumina (α -LA). Determinaram também, uma relação entre a baixa concentração de α -LA e o baixo teor de lactose no leite instável. Já a acidez titulável é determinada por componentes do leite com capacidade tamponante como as proteínas, citratos e CO_2 (TSIOULPAS et al., 2007). Tsioulpas et al. (2007), observaram um elevado teor de proteína nos dias iniciais de lactação e uma elevada correlação logarítmica com acidez titulável ($r = 0,95$). A variação da acidez titulável também pode estar relacionada com a variação das frações proteicas do leite (TÖPEL, 2016). Bernabucci et al. (2015), atribuíram a menor acidez titulável observada no verão, à diminuição da concentração de α s-caseína (α s-CN) e β -caseína (β -CN), duas caseínas do leite, ricas em grupos fosfato. A fosforilação das caseínas necessita de γ -fosfato de ATP e como durante o estresse calórico, ocorre uma diminuição do CMS e as exigências de manutenção aumentam, as vacas podem entrar em balanço energético negativo. Com isso, estes autores supõem que a menor concentração de α S-CN e β -CN no leite do verão, pode ser parcialmente devido à redução na disponibilidade de energia e proteína, afetando dessa forma, a síntese e a proporção destas caseínas no leite, afetando assim, a acidez titulável. Töpel (2016), considera a técnica de determinação da acidez titulável factível a erros e com isso, já em desuso em vários países. Considera ainda, mais apropriado, a avaliação do leite por potenciometria para a determinação do pH. A crioscopia do leite é relativamente constante e é uma consequência do equilíbrio osmótico entre o sangue e o leite (HENNO et al., 2008). Com isso, é um teste utilizado para avaliar a adição proposital de água no leite. A lactose e íons dissolvidos respondem por cerca de 80% da diminuição do índice crioscópico, enquanto outras substâncias como ureia, ácidos graxos de cadeia curta e CO_2 , são responsáveis por cerca de 20% (TÖPEL, 2016). Schukken et al. (1992), observaram um aumento da crioscopia do leite nos meses de verão e atribuíram isto, à variação do teor de lactose e proteína no leite. Os resultados de nosso experimento podem ter sido devido a variações de componentes do leite (nem todos analisados) e pelo grau de hidratação das vacas.

O estresse calórico é acompanhado por mudanças na concentração de metabólitos sanguíneos e respostas metabólicas sistêmicas (TAO et al., 2018; MARINS et al., 2019). Marins et al. (2019), encontraram que vacas não resfriadas em estresse calórico, quando comparadas com vacas resfriadas, apresentaram uma redução nas concentrações de glicose, beta-hidroxibutirato (BHB), ácidos graxos não-esterificados (NEFA) e triglicerídeos. Estes autores atribuem isto a diminuição do CMS e menores exigências de nutrientes para a síntese de leite associados à redução na produção de leite. Heck et al. (2009), observaram um menor teor de ácidos graxos provenientes da síntese de novo e maior teor de ácidos graxos pré-formados no leite no verão quando comparado com leite produzido no inverno. O acetato e o beta-hidroxibutirato são precursores na síntese de Novo de ácidos graxos e são produzidos no rúmen a partir de polissacarídeos da dieta (SAMKOVÁ et al., 2012). Em nosso trabalho, as vacas resfriadas (tratamento SVA), quando comparadas as vacas não resfriadas (grupo SVA), apresentaram maiores concentração de BHB. A maior concentração de beta-hidroxibutirato pode estar relacionada ao estágio da lactação, já que vacas no início da lactação foram inclusas nesse experimento.

3.7 Conclusão

O resfriamento ativo de vacas influencia na quantidade de calor produzido e retido, que a curto prazo, não afeta a produção de leite, mas afeta parâmetros fisiológicos, metabólitos sanguíneos, componentes e propriedades físico-químicas do leite.

3.8 Agradecimentos

Ao Sindicato das Indústrias de Laticínios e Produtos Derivados do estado de Santa Catarina (SINDILEITE/SC) pelos recursos financeiros concedidos para o financiamento parcial deste projeto e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

CAPÍTULO IV

4 LEITE DE VACAS SOB ESTRESSE CALÓRICO CONTÉM PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 70

4.1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi identificar e comparar a presença da proteína de choque térmico 70 (HSP70) em amostras de leite de vacas Holandês e Jersey em condições de estresse calórico. Vacas Holandês (n = 8) e Jersey (n = 8) foram divididas em dois grupos homogêneos e alojadas em um confinamento em sistema *Compost Bedded Pack Barn*: tratamento com ventilação por toda a área de alojamento e aspersão na linha do cocho (VA) e tratamento sem ventilação e aspersão (SVA). Os tratamentos foram constituídos por 4 vacas Holandês e 4 vacas Jersey cada e agrupadas de acordo com o peso vivo, número de lactações, dias em lactação, escore de condição corporal e produção de leite. O experimento teve 14 dias de período de pré-experimental (PP) ao local e às condições do experimento e 5 dias de período experimental (PE). No período PP, todas as vacas foram resfriadas com auxílio de ventiladores em toda a área de alojamento e aspersores na linha do cocho e o último dia foi considerado dia 0 (D0). A avaliação do consumo de matéria seca e produção de leite foi realizada diariamente. A coleta de dados e amostras de leite para análise de HSP70 foram realizadas no D0 e D5. O delineamento experimental foi um fatorial 2x 2, com dois tratamentos (VA, com ventilação e aspersão; SVA, sem ventilação e aspersão) e 2 dias (D0 e D5). Determinou-se a presença de HSP70 em amostras de leite dos tratamentos VA e SVA, no dia 0 e dia 5. A HSP70 está presente no leite de vacas sob resfriamento ativo e sem acesso a resfriamento por ventilação e aspersão.

Palavras-chave: chaperonas, calor, termotolerância

4.2 ABSTRACT

The objective of this work was to determine and compare the presence of heat shock protein 70 (HSP70) in milk samples from Holstein and Jersey cows under heat stress conditions. Holstein (n = 8) and Jersey (n = 8) cows were divided into two homogeneous groups and housed in a confinement in a Compost Bedded Pack system: treatment with cooling (VA) and treatment without cooling (SVA). The treatments consisted of 4

Holstein cows and 4 Jersey cows each and grouped according to live weight, number of lactations, days in lactation, body condition score, and milk production. The experiment had 14 days of pre-trial period (PP) to the place and conditions of the experiment and 5 days of the experimental period (PE). In the PP period, all cows were cooled with the fans and sprinklers and the last day was considered day 0 (D0). In the PE period, only VA cows were cooled. The evaluation of dry matter intake and milk production was performed daily. Data collection and milk samples for HSP70 analysis were performed on D0 and D5. The experimental design was a 2x2 factorial, with two treatments (VA, cooled cows; SVA, not cooled cows) and two days (D0, D5). The presence of HSP70 was determined in milk samples from the VA and SVA treatment, on day 0 and day 5. The HSP70 is present in milk from cows under active cooling and without access to cooling.

Keywords: chaperones, heat, thermotolerance

4.3 INTRODUÇÃO

Apesar dos grandes avanços em ambiência e sistemas de resfriamento, o clima quente ainda representa um grande desafio para a produção leiteira, causando elevados prejuízos econômicos. O estresse calórico causa diversos efeitos adversos e pode afetar a ingestão de alimentos, a produção e a saúde de vacas leiteiras. A seleção genética baseada principalmente em características produtivas, tem contribuído significativamente para uma diminuição da tolerância ao estresse calórico já que a produção basal de calor metabólico aumenta com o aumento da produção (BAUMGARD; RHOADS, 2013; RENQUIST, 2019).

Para bovinos de origem europeia, a zona de termoneutralidade é uma faixa de temperatura ambiente entre 5 a 20°C (NRC, 2001) e a resposta ao estresse calórico é desencadeada por um aumento da temperatura ambiental de apenas alguns graus (RICHTER et al., 2010). Para Collier et al. (2008), a resposta ao estresse calórico se inicia quando a temperatura superficial dos animais for maior que 35°C. No entanto, Richter et al. (2010) sugerem que o acúmulo deletério de proteínas desdobradas e agregadas seja o sinal para o início da resposta ao choque térmico. A resposta ao estresse calórico inicia a ativação de um conjunto de genes, com sinais intra e extracelulares que coordenam o metabolismo celular. Ocorre a ativação do Fator de Transcrição de Choque Térmico 1 (HSF1), aumento da expressão de proteínas de choque térmico (HSP),

diminuição da expressão e síntese de outras proteínas do organismo, aumento da oxidação de glicose e aminoácidos, metabolismo reduzido de ácidos graxos e ativação do sistema imunológico. Se o estresse persiste, essas mudanças levam a um estado fisiológico alterado, conhecido como aclimatação, em que o metabolismo é ajustado para minimizar os efeitos prejudiciais do aumento da carga de calor (COLLIER, 2008).

As proteínas de choque térmico, também conhecidas como chaperonas moleculares, diferem de peso molecular e função biológica. Podem ser classificadas em famílias de acordo com sua massa molecular em HSP110 (110 kDa), HSP100 (100 kDa), HSP90 (90 kDa), HSP70 (70 kDa), HSP60 (60 kDa), HSP40 (40 kDa), HSP10 (kDa) e pequenas famílias de HSP. A função das chaperonas está relacionada ao dobramento, desdobração de proteínas nascentes ou desnaturadas por estresse. Se ligam a sequências de proteínas hidrofóbicas liberadas por desnaturação e assim, impedem a interação com proteínas vizinhas e conseqüentemente, evitam a perda da função proteica (SLIMEN et al., 2016).

Em vacas sob estresse calórico, a diminuição do fluxo sanguíneo esplâncnico, resulta na ativação do sistema nervoso simpático. Com isso, o fluxo sanguíneo aumenta na pele, auxiliando nas trocas de calor com o ambiente. Com isso, a disponibilidade de oxigênio no intestino é afetada (RENQUIST, 2019). Os danos intestinais gerados pela isquemia podem levar a um aumento da permeabilidade intestinal, permitindo a entrada de substâncias estranhas no organismo e estimulando uma resposta imune (GAUGHAN et al., 2013; RENQUIST, 2019). Gaughan et al. (2013), sugerem que a hipóxia nestes tecidos pode ser a origem do aumento da concentração de proteínas de choque térmico extracelulares (eHSP) (GAUGHAN et al., 2013).

O desencadeamento das respostas ao choque térmico e um sistema imune ativado, aumentam as exigências de energia, característico de vacas sob estresse calórico. A síntese de HSP e a manutenção de sua função como chaperonas, requer quantidades consideráveis de ATP (BAUMGARD; RHOADS, 2013), assim como um sistema imune ativado, dependente estrito de energia via glicólise. Estas mudanças acontecem em detrimento da síntese de leite pela glândula mamária, podendo haver uma diminuição da produção de leite, alterações de composição (BAUMGARD; RHOADS, 2013), propriedades físico-químicas (BERNABUCCI; CALAMARI, 1998) e maior risco de desenvolvimento de infecções da glândula mamária (BERTOCCHI et al., 2014).

Para Richter et al. (2010), condições de estresse calórico não letais podem levar ao desenvolvimento de termotolerância e concentrações aumentadas de HSPs sintetizados

em resposta ao choque térmico são a base para essa resistência (RICHTER et al., 2010). As diferenças de termotolerância observadas entre raças tropicais de bovinos e raças européias também reside na expressão de HSP (DEB et al., 2014). As diferenças genéticas para termotolerância em nível celular são mediadas por uma família de proteínas de choque térmico 70 (HSP70), chaperonas intracelulares que protegem células de danos térmicos e apoptose. Estão envolvidas na manutenção da homeostase intracelular principalmente pelo controle do processo de dobramento de proteínas (DEB; SAJJANAR; PAVANI, 2015).

A síntese de proteínas de choque térmico 70 (HSP70) é rápida e massiva e também tem sido associada ao desenvolvimento de resistência a doenças (KRISTENSEN et al., 2004; AGGARWAL et al., 2012). Em sua maioria, a expressão e síntese de HSP envolvem estudos *in vitro*. Collier et al. (2006), verificaram que quando células epiteliais da glândula mamária foram incubadas a 42^oC, a expressão gênica de HSP70 aumentou drasticamente, 1 a 2 h após o início do estímulo estressor, atingindo seu pico em 4 h. Resultados similares foram encontrados por Hu et al. (2016).

Poucos são os estudos *in vivo*, relacionando o estresse calórico com proteínas de choque térmico e qualidade do leite em vacas leiteiras. Corazzin et al. (2020), em um estudo *in vivo*, avaliaram a expressão gênica em células somáticas de vacas Holandês sob estresse calórico por calor. Determinaram maior expressão gênica de HSPA1A, gene que codifica a HSP70 induzida por calor.

Considerar condições ambientais reais, envolvendo diferentes raças leiteiras e estratégias de resfriamento, são fundamentais para identificar animais mais tolerantes ao calor e representa um importante avanço na bovinocultura leiteira. A hipótese deste trabalho foi que o estresse calórico pode afetar a função mamária, induzindo a produção de proteínas de choque térmico. Com isso, o objetivo deste estudo foi identificar e comparar a concentração de HSP70 no leite de vacas Holandês e Jersey com e sem acesso a resfriamento por ventilação e aspersão.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em uma propriedade rural no município de Itapiranga, SC, Brasil (Latitude 27° 7'2.12"S, longitude 53°47'42.57"O) e de acordo com Dubreuil et al. (2018), a região apresenta um clima do tipo Cfa, de acordo com a classificação de

Köppen. Todos os procedimentos envolvendo as vacas do experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina com número de protocolo 6172220518.

4.4.1 Animais e alojamento

Dezesseis vacas, Holandês (n = 8) e Jersey (n = 8) foram alojadas e divididas em dois grupos em um galpão de confinamento, com sistema *Compost Bedded Pack Barn*: grupo com ventilação por toda a área de alojamento e aspersão na linha do cocho (VA) e grupo sem ventilação e aspersão (SVA). O galpão de confinamento média, medindo 40m x 9m e 4m de altura, proporcionou uma área de 11,62m² de cama por animal.

O experimento teve a duração de 19 dias: período pré-experimental de 14 dias (PP) e período experimental (PE) de 5 dias para avaliar os efeitos do estresse calórico. No período de adaptação, as vacas foram adaptadas ao manejo e aos lotes e todos os animais foram resfriados com auxílio de ventiladores em toda a área de alojamento e aspersores na linha do cocho. O sistema de resfriamento das vacas incluía ventiladores (diâmetro = 2 m) que proporcionaram uma velocidade média de vento de 3,72 m/s no local de alojamento das vacas. A aspersão, instalada acima da linha do cocho, com bicos de aspersão a cada 0,9m, proporcionava o resfriamento com água para cada vaca durante os horários de alimentação. A ventilação e aspersão eram controladas automaticamente, com acionamento quando a temperatura ambiental era igual ou superior a 24°C. A ventilação era contínua e a aspersão funcionava em ciclos intermitentes de 2 minutos de aspersão e 15 minutos com o sistema desligado. O último dia do período de adaptação foi considerado como dia 0 (D0) e todas as vacas tinham acesso a ventilação e aspersão. Do dia 1 (D1) ao dia 5 (D5), apenas as vacas do grupo VA continuaram com acesso a ventilação e à aspersão. A coleta de dados e amostras de leite foram realizadas no D0 e D5.

4.4.2 Condições ambientais do confinamento

As condições de temperatura e umidade dentro do galpão de alojamento foram determinadas com auxílio de um dataloger e mensuradas em intervalos de 15 minutos. A partir dos dados de temperatura e umidade foi calculado o índice de temperatura e umidade (ITU) de acordo com a fórmula: $ITU = (1,8 \times T + 32) - [(0,55 - 0,0055 \times UR)$

$\times (1,8 \times T - 26)]$, onde: T = temperatura do ar ($^{\circ}\text{C}$) e UR = umidade relativa do ar (%) (MADER; DAVIS; BROWN-BRANDL, 2006).

4.4.3 Consumo de matéria seca e coleta de amostras de alimentos

A dieta das vacas foi formulada para atender 100% das exigências nutricionais, de acordo com o NRC (2001) (Tabela 1), sendo fornecida na forma de dieta total (TMR). O alimento foi fornecido em cochos individuais para cada vaca em quatro horários: 8:00h, 12:00h, 16:00h e 19:00h. A duração de acesso das vacas ao alimento em cada horário foi de 1h e 30 min. Comida fresca foi ofertada em dois horários: as 8:00h e as 16:00h. A quantidade de alimento ofertada para cada animal era ajustada diariamente a fim de proporcionar sobras entre cinco e dez por cento. As sobras eram recolhidas para pesagem diariamente após o último período de fornecimento de alimento. Amostras das sobras e dos alimentos foram coletadas no D0, D1 e D5. Para a realização das análises bromatológicas, foram coletadas amostras individuais das sobras de cada vaca, de silagem de milho, feno de tifton, concentrado comercial e farelo de soja. As amostras foram submetidas à secagem em estufa com ventilação forçada (Solab SL-31, Piracicaba, Brasil) a 60°C durante 72 horas e posteriormente moídas em peneira de 1 mm. Para determinar o teor de matéria seca (MS), as amostras moídas foram submetidas à secagem em estufa a 105°C por 24 horas. As amostras de cada alimento e sobras coletadas, foram agrupadas para posterior análise química. A matéria mineral foi determinada por queima em forno mufla a 550°C durante 4 horas. O teor de fibra em detergente neutro (FDN) foi determinado conforme proposto por (MERTENS et al., 2002). O teor de nitrogênio total foi determinado em um equipamento Leco (Saint Joseph, MI, USA) e teor de extrato etéreo (EE) foi determinado em um extrator Soxhlet, com éter etílico por 4 horas. Os carboidratos não fibrosos (CNF) foram obtidos pelo cálculo por diferença através da fórmula: $\text{CNF} = 100 - (\% \text{FDN} + \% \text{PB} + \% \text{EE} + \% \text{MM})$, onde, FDN: fibra em detergente neutro, PB: proteína bruta, EE: extrato etéreo e MM: matéria mineral (NRC, 2001).

Tabela 1. Composição e constituição bromatológica da dieta com base na matéria seca (MS) fornecida às vacas

Itens (% da MS)	Dieta Total
Silagem de milho	48,63
Feno de Tifton-85	11,89
Concentrado comercial ¹	30,25
Farelo de soja	7,78
Suplemento mineral ²	1,45
PB	18,21
FDN	31,13
FDA	21,84
EE	3,79
MM	8,28
CNF	39,73
Energia líquida de lactação (Mcal/ kg de MS)	1,55

¹Puro Milk Bypass 26 PB (Puro Trato). Níveis de garantia, FDN=18%, FDA=9%, cinzas 9%, extrato etéreo= 5%, umidade= 13% Ca=12,5%, P=0,6%, S=0,13%, Mg=0,3%, K=0,002%, Co=0,92 mg/kg, Cu=27,37 mg/kg, Zn= 146 mg/kg, Fe= 40 mg/kg, Mn = 96 mg/kg, I = 2,12 mg/kg, Se = 1 mg/kg, vitamina A= 11.800 UI/kg, vitamina D= 2.800 UI/kg, vitamina E 50 UI/kg, biotina 6 mg/kg e monensina sódica 40 mg/kg.

² Mistura mineral contendo 45% de bicarbonato de sódio e 55% de núcleo mineral (Miner A1 Pro Biotina), Ca=23%, P=6%, S=2%, Mg=1,2%, K=0,35%, Na=4,7%, Cl= 7%, Co=95 mg/kg, Cu=950 mg/kg, Zn=6.000 mg/kg, Fe= 700 mg/kg, Mn = 3.000 mg/kg, I = 80 mg/kg, Se = 30 mg/kg, vitamina A= 600.000 UI/kg, vitamina D= 12.0000 UI/kg, vitamina E 2.500 UI/kg, niacina 2.500 mg/kg, biotina 150 mg/kg.

4.4.4 Coleta e análise de amostras de leite

As vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia, as 7h e as 17:30h. Nos D0 e D5, coletou-se amostras de leite de cada vaca, compostas por uma alíquota da produção de leite da tarde e da manhã. As amostras foram acondicionadas em recipientes sem conservante e mantidas sob refrigeração até seu processamento. Centrifugou-se as amostras de leite em uma centrífuga Janetsky T150 (Alemanha) a 4000g por 10 minutos. Removeu-se, com auxílio de uma espátula, a fração de gordura de cada amostra. O leite desengordurado foi acondicionado em tubos de plástico e congelado a -20 °C até a realização de análises subsequentes.

4.4.5 Determinação da proteína e eletroforese

Determinou-se o teor de proteína do leite pelo método de Bradford utilizando 5 µL de leite diluído em água ultrapura (1:20) e 250 µL do reagente Bradford (Scienco, Lages, SC, Brasil). A albumina sérica bovina (BSA) (Sigma, EUA), foi utilizada como

padrão para a construção da curva de calibração utilizando-se soluções com as seguintes concentrações: 0; 250; 500; 750 e 1500 µg/mL de BSA. A absorvância das soluções padrão e teste, foi medida em um espectrofotômetro NanoDrop 200 a 595 nm.

A análise e a visualização do perfil de proteínas totais das amostras de leite, foi realizada pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis) adaptado de Laemmli (1970). Previamente o gel de SDS-PAGE foi preparado, com gel de concentração a 4% e gel de separação a 12%. O gel de separação a 12% foi preparado utilizando acrilamida/bisacrilamida 30%, Tris-HCl (1,5 mol/L; pH 8,8), SDS 10%; persulfato de amônio 10% e TEMED 0,2%. Após a polimerização do gel de separação, foi preparado o gel de concentração a 4%, utilizando-se o tampão Tris-HCl (0,5 mol/L; pH 6,8). Os géis foram montados entre placas de vidro (100 x 100 mm), separadas por espaçador (GE HEALTHCARE) de 0,75 mm de espessura.

Amostras de leite desengorduradas contendo 40 µg de proteína foram homogeneizadas em tampão de amostra 2X (SDS 10%, 2-mercaptoetanol, glicerol; azul de bromofenol 2%; Tris-HCl 0,5 mol/L e pH 6,8). As proteínas foram desnaturadas em um banho seco 95°C (DryBlock, AC-2516, Acblabor) por 10 minutos.

A corrida foi realizada em uma cuba de vertical Hoefer miniVE (Hoefer, Holliston, MA, USA). As amostras foram aplicadas no gel, juntamente com tampão de corrida 10X (Tris-base, glicina, SDS). Usou-se um marcador de massa molecular Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (26634, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). A eletroforese foi realizada em voltagem constante (60 V) até que as amostras saíssem completamente do gel de concentração e em seguida, em uma corrente constante de 70 mA e 120 V, até atingirem o final do gel. Após a eletroforese, os géis foram lavados por 15 minutos com água milli-Q e corados com Fastblue (Scienco, Lages, SC, Brasil).

4.4.6 Western Blot

Após a eletroforese, realizou-se a transferência das proteínas que consistiu na incubação do gel de separação (acrilamida/bisacrilamida, 12%), juntamente com membrana de nitrocelulose (Biorad) e dois filtros (Paper Bridge, Biorad) por 15 minutos em tampão de transferência (25 mmol/L Tris, 192 mmol/L glicina, 20% de metanol). A transferência foi realizada num equipamento miniVE System Blot Module (Amersham Biosciences), dentro do qual montou-se um sanduíche, colocando-se primeiramente duas

folhas de papel filtro, o gel SDS-PAGE, a membrana de nitrocelulose e duas folhas de papel filtro. A transferência foi realizada a corrente constante de 400 mA por 12 h. Após a transferência a membrana foi corada com Ponceau S 0,1% para verificar a qualidade da transferência e descorada com água ultrapura. A membrana foi incubada por 2 h sob agitação em solução de TBS (NaCl 150 mol/L, Tris-base 50 mol/L, Tween 0,1%) com leite em pó desnatado a 5%. Posteriormente, realizou-se 2 lavagens rápidas e 3 lavagens de 5 minutos cada, com TBS.

Incubou-se a membrana de nitrocelulose com o anticorpo Anti-HSP70 produzido em coelhos e diluído na proporção de 1:500 (SAB4200797, Sigma Life Science) em uma solução de TBS (Tris-base 50 mol/L, NaCl 150 mol/L, Tween 0,1%) com leite em pó desnatado a 0,5%. Realizou-se 2 lavagens rápidas e 3 lavagens de 5 minutos com TBS. O anticorpo secundário anti-IgG de coelho marcado com fosfatase alcalina (A3687, Sigma Life Science) foi diluído na proporção de 1:30000 em uma solução de TBS (NaCl 150 mol/L, Tris-base 50 mol/L, Tween 0,1%) com leite em pó desnatado a 0,5%, na qual, incubou-se a membrana de nitrocelulose por duas horas em temperatura ambiente. Foram realizadas 2 lavagens rápidas e 3 lavagens de 5 minutos com TBS. A revelação foi realizada uma solução de NBT/BCIP (NBT/BCIP Stock solution, Sigma) até o aparecimento das bandas. As imagens capturadas da membrana de nitrocelulose foram processadas usando-se o software ImageJ.

4.4.7 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em um arranjo fatorial 2 x 2 com dois tratamentos (VA: ventilação e aspersão; SVA: sem ventilação e aspersão) e dois dias (D0 e D5).

4. 5 RESULTADOS

Os dados de ITU são mostrados na Figura 1.

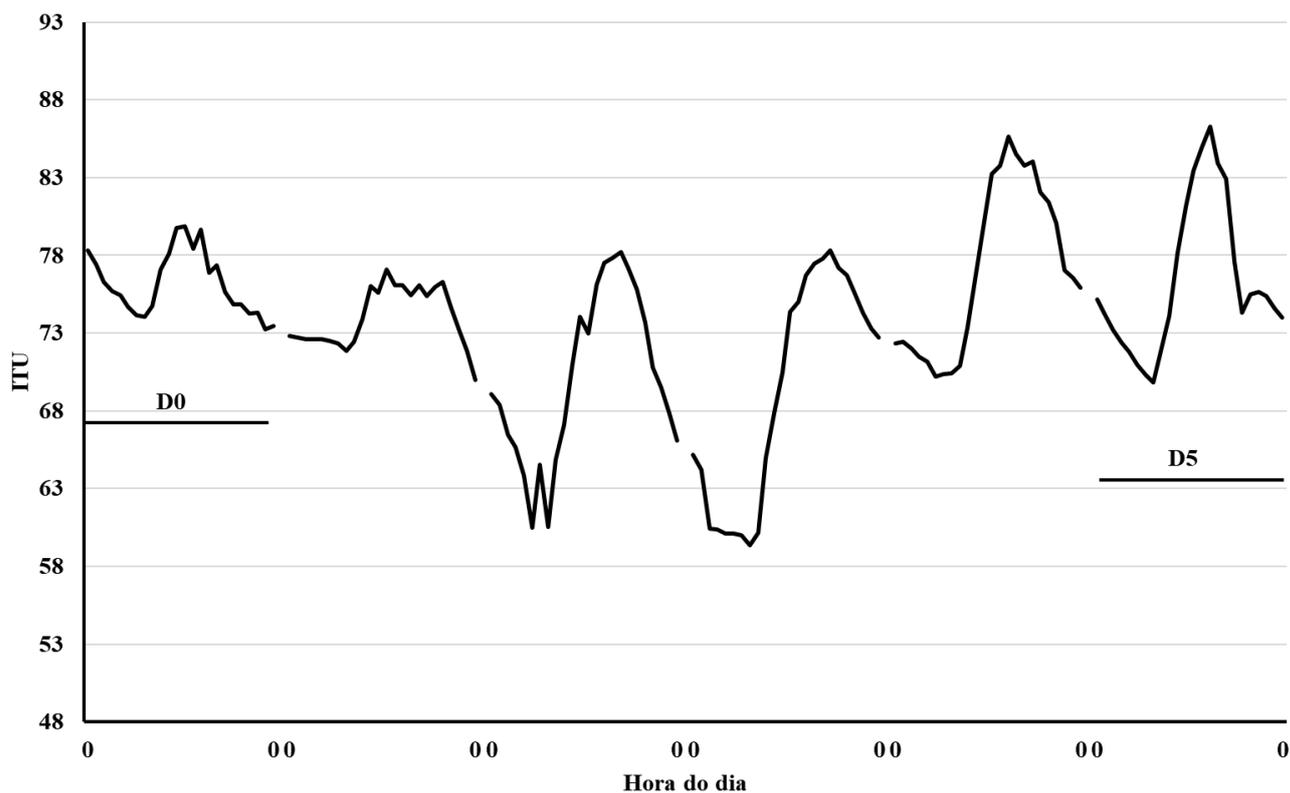


Figura 1. Índice de Temperatura e Umidade (ITU) determinado durante o período experimental (PE) nos ambientes dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA (sem ventilação e aspersão)

A Figura 2, mostra uma representação esquemática do Western blot de amostras de leite do D0.



Figura 2. Representação esquemática do Western blot de amostras de leite do D0: M (marcador molecular, marcador Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder); 2 (vaca J do tratamento VA); 8 (vaca J do tratamento SVA).

Das amostras de leite analisadas, detectou-se a presença de HSP70 no leite de vacas do tratamento VA e SVA, nos dias D0 e D5, conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2. Amostras de leite com presença da proteína de choque térmico 70 (HSP70)

Tratamento	n com HSP70/ n total (% de amostras com HSP 70)	
	Dia 0	Dia 5
VA (n = 8)	5 (62,5)	4 (50)
SVA (n = 8)	3 (37,5)	3 (37,5)

4.6 DISCUSSÃO

O ITU é usado para estimar as necessidades de resfriamento em vacas leiteiras. Zimbelman et al. (2009), com base em dados fisiológicos e produtivos, determinaram que o limiar para condições termoneutras e de estresse calórico em vacas leiteiras de alta produção é um ITU = 68. Klein (2014), considera que a zona de termoneutralidade 4°C a 15 °C para vacas leiteiras de alta produção. As características relacionadas aos animais como a produção de calor metabólico, tipo de pelagem, pele, perdas de calor por respiração e sudação e padrões de comportamento variam entre os animais e entre os grupos de animais em um rebanho e podem tornar vacas leiteiras mais suscetíveis ao estresse calórico. As variáveis relacionadas ao manejo como densidade animal, exposição à radiação solar, sistema de alimentação e métodos de alívio do estresse por calor podem exacerbar os efeitos do calor. Os valores de ITU, determinados no PE em nosso experimento, mostram condições acima da zona termoneutra para vacas leiteiras (Figura 1) e possíveis condições de estresse para vacas leiteiras.

A indução da expressão e síntese de HSP é o primeiro mecanismo de defesa celular para atenuar os efeitos do estresse calórico e em vacas leiteiras expostas a temperaturas acima de sua zona termoneutra, a expressão de HSP aumenta após a ativação do Fator de Transcrição de Choque Térmico 1 (HSF1). A HSP70 auxilia as células na manutenção da integridade de proteínas, contribui na resposta imune, modula as vias inflamatórias e previne a apoptose celular. Em nível celular o aumento da expressão dos genes HSP70 e HSP90 são considerados marcadores de estresse ambiental e análises genéticas mostraram que a expressão do mRNA de HSP é maior em indivíduos tolerantes ao calor do que em indivíduos sensíveis ao calor (NANAS et al., 2020). Para Gaughan et al. (2013), a HSP70 tem um papel fundamental na termotolerância celular e sobrevivência animal. A fonte de HSP70 extracelular (eHSP70) determinada no plasma durante o estresse por calor não foi totalmente elucidada, no entanto, acredita-se que pode ser oriunda de células intestinais danificadas e o redirecionamento do sangue para a periferia

para maior dissipação de calor. A diminuição do fluxo intestinal reduz o fornecimento de O₂ e nutrientes, que pode resultar em isquemia e dano celular, levando a uma perda da integridade da barreira intestinal e aumento da permeabilidade intestinal.

A produção de leite depende da estrutura e função normal das células epiteliais da glândula mamária (MA et al., 2019). Collier et al. (2006), em um estudo *in vitro*, demonstraram que a expressão do gene HSP70 em células epiteliais da glândula mamária permaneceu elevada por 4 horas a 42°C, retornando aos níveis basais 8 horas após o início do estímulo por calor, sugerindo o fim da termotolerância e ativação de genes associados com apoptose. Orellana et al. (2017), determinaram elevada expressão gênica de proteínas de choque térmico em biópsias mamárias coletadas de vacas em lactação aos 7 e 56 dias após a privação de resfriamento evaporativo durante o verão. Além disso, a expressão de genes relacionados à apoptose também estavam regulados positivamente 7 dias após a privação do resfriamento evaporativo, sugerindo que a morte celular programada estava aumentada. Em nosso experimento, determinamos a presença de HSP70 no leite de vacas do tratamento VA e SVA, enquanto ambos os tratamentos tinham acesso ao resfriamento por ventilação e aspersão (D0). Isso pode sugerir certo grau de estresse calórico das vacas do experimento, possivelmente pela mitigação inadequada que o sistema de resfriamento evaporativo proporcionou, considerando o elevado ITU durante todo o experimento. Além disso, como a HSP70 é uma proteína intracelular e em nosso experimento, detectada no leite de vacas do tratamento VA e SVA, pode ter ocorrido perda de citoproteção na glândula mamária ou um aumento da permeabilidade vascular, acompanhado de lesões teciduais e morte celular programada em curso.

4.7 CONCLUSÃO

Leite de vacas Holandês e Jersey com e sem acesso a ventilação e aspersão, contém proteínas de choque térmico 70.

4.8 AGRADECIMENTOS

Ao Sindicato das Indústrias de Laticínios e Produtos Derivados do estado de Santa Catarina (SINDILEITE/SC) pelos recursos financeiros concedidos para o financiamento parcial deste projeto e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

CAPÍTULO V

5 EFEITO DO ESTRESSE CALÓRICO E DA INSOLAÇÃO SOBRE O CONSUMO, INDICADORES BIOQUÍMICOS, PRODUÇÃO E QUALIDADE DO LEITE DE VACAS HOLANDÊS E JERSEY

5.1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar e comparar o consumo de matéria seca, a produção e composição do leite, propriedades físico-químicas do leite, parâmetros fisiológicos e bioquímicos em vacas Holandês e Jersey em condições de estresse calórico agudo e de insolação por um curto período. Vacas Holandês (n = 10) e Jersey (n = 10) foram divididas em dois tratamentos homogêneos quanto à raça, peso vivo, número de lactações, dias em lactação, escore de condição corporal e produção de leite, sendo alojadas em um sistema *Compost Bedded Pack*. As vacas dos tratamentos ficaram em dois ambientes distintos: (i) ventilação por toda a área de alojamento e aspersão na linha do cocho (VA); (ii) uma hora de insolação diária e sem acesso a ventilação e aspersão (SVA+I). O experimento teve 15 dias de período pré-experimental (PP) ao local e às condições do experimento e 7 dias de período experimental (PE). No período PP, todas as vacas foram resfriadas com auxílio de ventiladores em toda a área de alojamento e aspersores na linha do cocho e o último dia foi considerado dia 0 (D0). A avaliação do consumo de matéria seca (CMS) e produção de leite foi realizada diariamente. No dia 0 do período PP e nos dias 3, 5 e 7 do período PE, coletou-se amostras de leite para análises de composição, propriedades físico-químicas do leite e de células somáticas (CCS). Nestes mesmos dias, coletou-se amostras de sangue para análise de glicose e beta-hidroxi-butirato e avaliou-se os parâmetros fisiológicos das vacas após a ordenha da manhã e da tarde. O experimento teve dois tratamentos (VA e SVA+I), duas raças (Holandês e Jersey) e três dias (dias 3, 5 e 7). Os dados foram submetidos a análise de variância, sendo os dados do dia 0 considerados como covariáveis. Houve interação entre tratamento e raça ($P = 0.014$) e efeito de dia para CMS ($P < 0.0001$). Quando o CMS foi calculado como % de peso vivo (CMS como % de PV), as vacas VA ($P = 0,011$) e da raça Jersey ($P = 0,041$) consumiram mais. Os tratamentos afetaram a produção de leite ($P = 0,002$) e de leite corrigido a 3,5% de gordura ($P = 0,0002$), as quais foram maiores nas vacas do tratamento VA. Houve interação entre dia e raça ($P = 0,023$) para leite corrigido a 3,5% de gordura. A eficiência alimentar (EA) e a eficiência alimentar corrigida a 3,5% de gordura (EA corrigida a 3,5% de gordura) foi similar entre tratamentos e raças. Para o

teor de proteína, houve interação entre tratamento e dia ($P = 0,017$). O teor de gordura, lactose, sólidos totais e os valores de ECS não diferiram entre tratamentos. A concentração de NUL ($P=0,002$) foi mais elevada no leite das vacas VA. Não houve diferença entre os tratamentos quanto aos valores médios de teste do álcool e acidez titulável mas as vacas Holandês apresentaram maior estabilidade ao etanol ($P=0,029$). Houve interação entre tratamento e dia para os valores de pH ($P = 0,0001$). A crioscopia foi mais elevada nas vacas SVA + I ($P = 0,007$). Foram encontradas diferenças de tratamento nos parâmetros FR manhã (maior no tratamento SVA + I; $P= 0,047$), TS tarde (maior no tratamento SVA + I; $P=0,015$). Houve interação entre tratamento e dia para TR tarde ($P = 0,0001$) e MR tarde ($P = 0,002$). Não houve diferença de tratamento para a concentração de beta-hidroxibutirato e glicose. Conclui-se que o estresse calórico e a insolação reduzem o consumo de vacas leiteiras. Vacas Holandesas submetidas ao estresse calórico com insolação, tem um consumo total mais reduzido que vacas da raça Jersey. Vacas Holandesas e Jersey, sob estresse calórico, sem acesso a ventilação e aspersão e sob um curto período de insolação nas horas mais quentes do dia, reduzem a produção de leite e a concentração de nitrogênio ureico do leite, mas a crioscopia aumenta. O estresse calórico afeta os parâmetros fisiológicos e aumenta a FR e a TS. O estresse calórico não afeta a concentração de BHB e glicose.

Palavras-chave - calor, termotolerância, teor de proteína do leite.

5.2 ABSTRACT

The objective of this work was to determine and compare dry matter intake, milk production, and composition, physiological and biochemical parameters in Holstein and Jersey cows under short-term heat stress conditions with insolation. Holstein cows ($n = 10$) and Jersey ($n = 10$) were divided into two groups and housed in a Compost Bedded Pack: (i) cooled (VA) and (ii) noncooled group with insolation (SVA+I). Each treatment was composed of 5 Holstein cows and 5 Jersey cows and grouped according to body weight, parity, days in milk, body condition score, and milk production. The experiment had 15 days pre-trial period (PP) at the place and conditions of the trial and 7 days of experimental period (PE). In the PA period, all cows were cooled with fans and sprinklers. The last day of the PP period was considered as day 0. In the PE period, only the VA treatment cows were cooled during all days. The evaluation of dry matter intake and milk

production was performed daily. On day 0 of the PP period and on days 3, 5, and 7 of the PE period, milk samples were collected for composition analysis, physical analysis, the somatic cells count. On the same days, blood samples were collected for analysis of total proteins, albumin, urea, glucose, beta-hydroxybutyrate. Also, on days 0, 3, 5, and 7, respiratory rate, surface temperature, rectal temperature, and ruminal movements were evaluated. The experiment had two treatments (VA and SVA+I), two breeds (Holstein and Jersey) and three days (days 3, 5 and 7). Data were subjected to analysis of variance, and data from day 0 were considered as covariates. There was interaction between treatment and breed ($P = 0.014$) and day effect for dry matter intake ($P < 0.0001$). When dry matter intake was calculated as % of body weight, VA ($P=0.011$) and Jersey ($P=0.041$) cows consumed more. The treatments affected milk production ($P = 0.002$) and milk production corrected to 3.5% fat ($P = 0.0002$), which were higher in the VA treatment cows. There was an interaction between day and breed ($P=0.023$) for milk corrected to 3.5% fat. Feed efficiency and feed efficiency corrected at 3.5% fat were similar between treatments and breeds. For protein content, there was an interaction between treatment and day ($P = 0.017$). Fat content, lactose, total solids and somatic cell score values did not differ between treatments. The concentration of milk urea nitrogen ($P=0.002$) was higher in milk from VA cows. There was no difference between treatments regarding the mean values of alcohol test and titratable acidity, but Holstein cows showed greater means values of alcohol test ($P=0.029$). There was an interaction between treatment and day for pH values ($P = 0.0001$). Cryoscopy was higher in SVA + I cows ($P = 0.007$). Treatment differences were found in the respiratory frequency in the morning (greater in the SVA + I treatment; $P= 0.047$), superficial temperature in the afternoon (greater in the SVA + I treatment; $P=0.015$). There was an interaction between treatment and day for late rectal temperature in the afternoon ($P = 0.0001$) and ruminal movement in the afternoon ($P = 0.002$). There was no treatment difference for the concentration of beta-hydroxybutyrate and glucose. It is concluded that heat stress and insolation reduce the consumption of dairy cows. Holstein cows subjected to heat stress with insolation, have a lower total intake than Jersey cows. Holstein and Jersey cows, under heat stress, without access to ventilation and sprinklers, and under a short period of insolation during the hottest hours of the day, reduce milk production and the concentration of urea nitrogen in milk, but cryoscopy increases. Heat stress affects physiological parameters and increases respiratory frequency and superficial temperature. Heat stress does not affect the concentration of beta-hydroxybutyrate and glucose.

Keywords – heat, thermotolerance, milk protein content.

5.3 INTRODUÇÃO

O estresse calórico é um problema na maioria das regiões do mundo e coloca em risco o bem-estar animal, a lucratividade e a segurança alimentar (BAUMGARD et al., 2015). Em vacas leiteiras, a temperatura e a umidade do ar (muitas vezes combinadas como um Índice de Temperatura e Umidade, ITU), excedendo os limites tolerados pela espécie, levam a quedas significativas no consumo de matéria seca (CMS), produção de leite e fertilidade, que estão associadas a mudanças fisiológicas, incluindo aumento da temperatura corporal, frequência respiratória, ofegação, salivação, sudorese (GARNER et al., 2016), importantes na manutenção da homeostase.

Em vacas leiteiras sob estresse calórico ocorre uma redução na absorção de nutrientes e as exigências de energia aumentam devido a ativação de mecanismos termorregulatórios (HILL; WALL, 2017). Além disso, ocorrem mudanças metabólicas e endócrinas (GARNER et al., 2016) que causam uma diminuição da produção de leite e podem alterar a composição e as propriedades físico-químicas (BERNABUCCI; CALAMARI, 1998; BERNABUCCI et al., 2002; (HILL; WALL, 2017).

Em altas temperaturas, o resfriamento evaporativo é o modo preponderante de perda de calor em vacas leiteiras. Este mecanismo é afetado pela velocidade do vento, temperatura do ar, umidade relativa e radiação solar. As propriedades físicas e a cor do pelo e da pele também afetam a eficácia do resfriamento evaporativo. Esses fatores podem inclusive aumentar a absorção da radiação solar (WILLARD; ARTHINGTON; BRANDL, 2008), elemento climático que impacta muito na criação de bovinos em regiões tropicais e subtropicais. Características inerentes ao animal como a elevada produção de leite, o estado fisiológico, o estágio da lactação, a raça, o peso e a idade, também tornam vacas leiteiras mais suscetíveis ao estresse por calor (GARNER et al., 2016; TARABA; BEWLEY, 2016). Entender quais estressores ambientais afetam mais as vacas leiteiras e assim identificar animais, raças e meios que amenizem efetivamente os efeitos do calor, torna-se fundamental na atividade leiteira. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar e comparar o consumo de matéria seca (CMS), a produção, composição e propriedades físico-químicas do leite, a eficiência alimentar (EA), parâmetros bioquímicos e fisiológicos em vacas Holandês e Jersey sob insolação ou não e com e sem acesso a resfriamento por ventilação e aspersão.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em uma propriedade rural no município de Itapiranga, SC, Brasil (latitude 27° 7'2.12"S, longitude 53°47'42.57"O) e de acordo com Dubreuil et al. (2018), a região apresenta um clima do tipo Cfa, de acordo com a classificação de Köppen-Geiger. Todos os procedimentos envolvendo as vacas do experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina com número de protocolo 6172220518.

5.4.1 Animais e alojamento

Vinte vacas, (n = 10) Holandês e (n = 10) Jersey foram alojadas e divididas em dois tratamentos em um galpão de confinamento, com sistema *Compost Bedded Pack Barn*: (i) com ventilação por toda a área de alojamento e aspersão na linha do cocho (VA); (ii) com 1 h de insolação diária e sem acesso a ventilação e aspersão (SVA+I). O galpão de confinamento de 40 m x 9 m e 4 m de altura, proporcionou 11,62 m² de área de cama por animal. Os grupos formados eram homogêneos quanto ao peso vivo, paridade, dias em lactação (DEL), escore de condição corporal (ECC) e produção de leite, sendo cada tratamento constituído por 5 vacas Holandês e 5 vacas Jersey: VA (PV= 496,3 ± 123 kg; paridade = 3,5 ± 1,58; DEL = 233,7 ± 37,5; ECC = 2,88 ± 0,32 e produção de leite = 18,84 ± 3,75 kg/dia); SVA+I (PV= 510,6 ± 112 kg; paridade = 3,4 ± 1,42; DEL = 223,1 ± 88; ECC = 3,02 ± 0,21 e produção de leite = 18,75 ± 5,4 kg).

O experimento teve duração de 22 dias, sendo um período de adaptação de 15 dias (PA) e período experimental de 7 dias (PE), para avaliar os efeitos de um curto período de estresse calórico. No período de adaptação, as vacas foram adaptadas ao manejo e aos lotes e todos os animais foram resfriados com auxílio de ventiladores em toda a área de alojamento e aspersores na linha do cocho. O sistema de resfriamento das vacas incluiu ventiladores (diâmetro = 2 m) no local de alojamento das vacas e sistema de aspersão instalado acima da linha do cocho, com bicos de aspersão a cada 0,9 m, proporcionando o resfriamento com água para cada vaca durante os horários de alimentação. A vazão de água de cada aspersor foi de 1,25x10⁻⁵ m³/s. A ventilação e a aspersão eram controladas automaticamente, com acionamento quando a temperatura ambiental era igual ou superior a 24°C. A ventilação foi contínua e a aspersão funcionou em ciclos intermitentes de 2

minutos de aspersão e 15 minutos com o sistema desligado. O último dia do período de adaptação foi considerado como dia 0, com todas as vacas tendo acesso a ventilação e aspersão. No PE apenas as vacas do grupo VA continuaram com acesso a ventilação e à aspersão. Além disso, durante o período PE, as vacas do tratamento SVA+I foram submetidas a 1 h de insolação diária, das 11 às 12 h, período no qual, as vacas permaneciam em um piquete, com acesso à água, mas sem disponibilidade de alimento. A coleta de dados, amostras sanguíneas e de leite foram realizadas no dia 0 (D0), dia 3 (D3), dia 5 (D5) e dia 7 (D7). As vacas dos dois tratamentos foram separadas entre si e do restante dos animais no galpão de alojamento com cercas elétricas.

5.4.2 Dados climáticos

As condições de temperatura, umidade, radiação solar e velocidade do vento, dentro e fora do galpão de alojamento foram obtidas com auxílio de duas estações meteorológicas, ATMOS 41 (METER Group, Court Pullman, WA, EUA), acopladas a um *dataloger* Zentra ZL6 (METER Group, Court Pullman, WA, EUA) e os dados ambientais, mensurados em intervalos de 15 minutos. A partir dos dados de temperatura e umidade foi calculado o índice de temperatura e umidade (ITU) de acordo com a equação $ITU = (1,8 \times T + 32) - [(0,55 - 0,0055 \times UR) \times (1,8 \times T - 26)]$, onde: T = temperatura do ar (°C) e UR = umidade relativa do ar (%) (MADER; DAVIS; BROWN-BRANDL, 2006).

A temperatura de globo negro (Tgn) foi calculada pela equação $Tgn = (1,33 \times Ta) - (2,65 \times Ta^{0,5}) + (3,21 \times \log(Rad + 10)) + 3,5$. Onde: Ta = temperatura do ar (°C); Rad = intensidade da radiação solar ($W.m^{-2}$) (HAHN; MADER; EIGENBERG, 2003). O índice de carga térmica (ICT) foi calculado de acordo com as seguintes equações: se $Tgn \geq 25$, $ICT = 8,62 + (0,38 \times UR + (1,55 \times Tgn) - 0,5 \times V_v + e^{(2,4 - V_v)})$; Se $Tgn < 25$, $ICT = 10,66 + (0,28 \times UR + (1,3 \times Tgn) - V_v)$. Onde: Tgn = temperatura de globo negro (°C); UR = umidade relativa (%); V_v = velocidade do vento ($m.s^{-1}$) (HAHN; MADER; EIGENBERG, 2003).

5.4.3 Peso vivo, escore de condição corporal

O peso vivo foi estimado no início do período de adaptação com auxílio de uma balança digital Filizola (Filizola Balanças Industriais, São Paulo, Brasil). O escore de

condição corporal (ECC) foi determinado no início do período de adaptação de acordo com a metodologia de FERGUSON et al. (1994).

5.4.4 Frequência respiratória, temperatura superficial, temperatura retal e movimentos ruminais

A frequência respiratória (FR) (movimentos/min) foi aferida por meio de contagem de movimentos do flanco, durante 15 segundos e posteriormente multiplicado por quatro para a obtenção da frequência respiratória por minuto (PILATTI, 2017). A frequência cardíaca (FC) (batimentos/min) foi determinada com auxílio de um estetoscópio. A temperatura superficial (TS) das vacas foi determinada com um termômetro de infravermelho a 1 m de distância do animal e mensurada em 5 pontos do corpo do animal. O valor de TS considerado foi a média aritmética dos 5 pontos determinados, conforme a metodologia descrita por Pilatti (2017) e mostrado na Figura 1. A temperatura retal (TR) foi determinada com auxílio de um termômetro clínico.

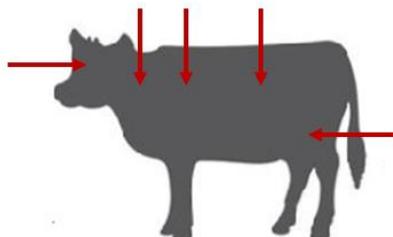


Figura 1. Pontos de medida da temperatura superficial

A FR, FC, TS, TR e os MR foram determinados duas vezes ao dia, de manhã e à tarde, às 10 h e às 19 h, nos dias 0, 3, 5 e 7. A TS foi determinada apenas à tarde.

5.4.5 Consumo de matéria seca e coleta de amostras de alimentos

A dieta das vacas foi formulada para atender 100% das exigências nutricionais, de acordo com o NRC (2001) (Tabela 1), sendo fornecida na forma de dieta total (TMR). O alimento foi fornecido em cochos individuais para cada vaca em quatro horários do dia: 08:00, 12:30, 16:00 e 19:00, período em que permaneciam presas em contenções cervicais. A duração de acesso das vacas ao alimento em cada horário foi de 1 h e 30 min. As vacas receberam comida fresca às 08:00 e nos demais horários, sempre que necessário,

era reposto. A quantidade de alimento ofertada para cada animal era ajustada diariamente a fim de proporcionar sobras entre 5 e 10 %. As sobras eram recolhidas para pesagem diariamente após o último período de fornecimento de alimento. Amostras das sobras e dos alimentos foram coletadas no dia 15 do período PA e no dia 3, 5 e 7 do período PE. Foram coletadas amostras compostas das sobras de cada tratamento (VA e SVA+I), de silagem de milho, feno de tifton, concentrado comercial e farelo de soja. As amostras foram remetidas ao Laboratório 3RLab (Chapecó, SC, Brasil) para a realização de análises bromatológicas. O teor de MS das amostras de alimentos e da dieta foi medido em equipamento de circulação forçada de ar, tipo Air Fryer (Agratto, 2.5L 1270W) em temperatura de 120°C por 30 minutos (WALLAU; VENDRAMINI, 2019).

Tabela 1. Composição e constituição bromatológica da dieta com base na matéria seca (MS) fornecida às vacas

Item, % da MS a menos que especificado	Valor
Silagem de Milho	45.55
Feno de Tifton	5.63
Ração ¹	47.31
Mineral ²	1.51
FDN	31.53
FDA	18.02
PB	16.73
MM	9.38
EE	3.99
CNF ³	39.15
ELI (Mcal/kg de MS)	1.64

¹Puro Milk Bypass 26 PB (Puro Trato®). Níveis de garantia, FDN=18%, FDA=9%, Cinzas 9%, Extrato Etéreo= 5%, Umidade= 13% Ca=12.5%, P=0.6%, S=0.13%, Mg=0.3%, K=0.002%, Co=0.92mg/kg, Cu=27.37 mg/kg, Zn= 146 mg/kg, Fe= 40 mg/kg, Mn = 96 mg/kg, I = 2.12 mg/kg, Se = 1 mg/kg, Vitamina A= 11800 UI/kg, Vitamina D= 2800 UI/kg, Vitamina E 50 UI/kg, Biotina 6 mg/kg e Monensina Sódica 40 mg/kg.

²Mistura mineral contendo 40% de bicarbonato de sódio, 40% de cloreto de sódio e 20% de núcleo mineral (Miner A1 Pro Biotina, Ca=23%, P=6%, S=2%, Mg=1.2%, K=0.35%, Na=4.7%, Cl= 7%, Co=95mg/kg, Cu=950 mg/kg, Zn=6000 mg/kg, Fe= 700 mg/kg, Mn = 3000 mg/kg, I = 80 mg/kg, Se = 30 mg/kg, Vitamina A= 600000 UI/kg, Vitamina D= 120000 UI/kg, Vitamina E 2500 UI/kg, Niacina 2500 mg/kg, Biotina 150 mg/kg.

5.4.6 Coleta e análise de amostras de leite

As vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia, às 07:00 e às 17:30. A produção de leite foi medida diariamente durante o período PA e PE, utilizando-se medidores de leite WAIKATO Multi Meter. Nos dias 0, 3, 5 e 7, coletou-se amostras de leite de cada vaca, compostas por uma alíquota da produção de leite da tarde e da manhã. As amostras foram acondicionadas em recipientes com bronopol como conservante e enviadas ao

Laboratório da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH) em Curitiba, PR, para realização das análises dos teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e nitrogênio ureico do leite (NUL), pelo método de infravermelho (Bentley Combisystem, Bentley Instruments Inc., USA). Também foi analisada a contagem de células somáticas por citometria de fluxo (Delta Combiscope, Advanced Instruments Inc., USA).

Foi coletada uma segunda amostra de leite de cada vaca, composta por uma alíquota da produção de leite da tarde e da manhã, sendo acondicionadas em recipientes sem conservante e mantidas refrigeradas por 12 h entre 3 e 8°C, para a determinação do pH, teste do álcool, acidez Dornic e crioscopia. O pH do leite foi mensurado utilizando-se um pHmetro Kasvi K39 (Kasvi, São José dos Pinhais, PR). O teste do álcool foi realizado, misturando-se 2 mL de leite e 2 mL de etanol em uma placa de Petri sob um fundo preto. As soluções de etanol utilizadas variavam entre 56 e 90% (v/v) e foram preparadas com concentrações de etanol variando em intervalos de 2%. As amostras de leite analisadas pelo teste do álcool foram consideradas instáveis quando ocorria a formação de grumos. A acidez titulável foi determinada em graus Dornic (°D) conforme a metodologia descrita na IN 68 (BRASIL, 2006) em que, a uma amostra de 10 mL de leite, adicionava-se 4 a 5 gotas da solução de fenoftaleína a 1%. A solução resultante era titulada com uma solução de NaOH 0,1 mol/L até aparecimento de coloração rósea persistente por aproximadamente 30 segundos.

A produção de leite corrigido para 3,5% de gordura foi estimada a partir da equação: Leite corrigido a 3,5% de gordura (kg) = (0,4324 x kg de leite) + (16,216 x kg de gordura). A eficiência alimentar (EA) foi calculada pela fórmula: EA = Leite corrigido a 3,5% de gordura (kg)/CMS (kg) (HUTJENS, 2010).

5.4.7 Coleta e análise de amostras de sangue

Nos dias 0, 3, 5 e 7, após o fornecimento de alimento, às 08:00, coletou-se amostras de sangue da veia coccígea com auxílio de agulha 21 G. Coletou-se uma quantidade de sangue para preencher dois tubos vacutainer de 10 mL com heparina lítica (BD, New Jersey, USA), dois tubos vacutainer de 4 mL, com K₂EDTA (BD, New Jersey, USA) e dois tubos de 10 mL com ativador de coágulo para coleta de soro (BD, New Jersey, USA). Após a coleta, o sangue foi centrifugado a 1.328 g durante 10 minutos. As

amostras de plasma e soro resultantes foram acondicionadas em tubos de plástico de 2 mL e congeladas até as análises bioquímicas.

A concentração de beta-hidroxibutirato (BHB) e glicose em cada amostra de sangue, foi determinada imediatamente após a coleta no sangue acondicionado em tubos vacutainer contendo EDTA sódico. As análises foram realizadas utilizando-se um analisador portátil Optium Xceed (Abbott, Chicago, Illinois, USA). Foram utilizadas tiras para análise de glicose e beta-hidroxibutirato (Abbott, Chicago, Illinois, USA).

5.4.8 Análise de dados

Os dados de CCS foram transformados para escore de células somáticas (ECS), pela equação $ECS = \log_2(CCS/100) + 3$. Os dados foram submetidos à análise de variância e previamente testados para normalidade de resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk, utilizando o pacote estatístico SAS (SAS, 2017). O modelo estatístico foi composto pelos efeitos do tratamento, da raça, dos dias de experimento, das interações entre tratamento e raça, tratamento e dia, dia e raça e da covariável medida de cada variável no último dia do período pré-experimental (dia 0). Os resultados foram expressos como médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão da média (SEM) e as médias comparadas pelo teste de Diferença mínima significativa (LSD), sendo consideradas diferentes se $P \leq 0,05$.

5.5 RESULTADOS

As condições térmicas dos ambientes em que as vacas foram alojadas durante o período experimental estão caracterizadas através do índice de temperatura e umidade (ITU) e do índice de carga térmica (ICT) do período experimental (PE) ao longo dos dias e são mostrados nas Figuras 2 e 3, respectivamente.

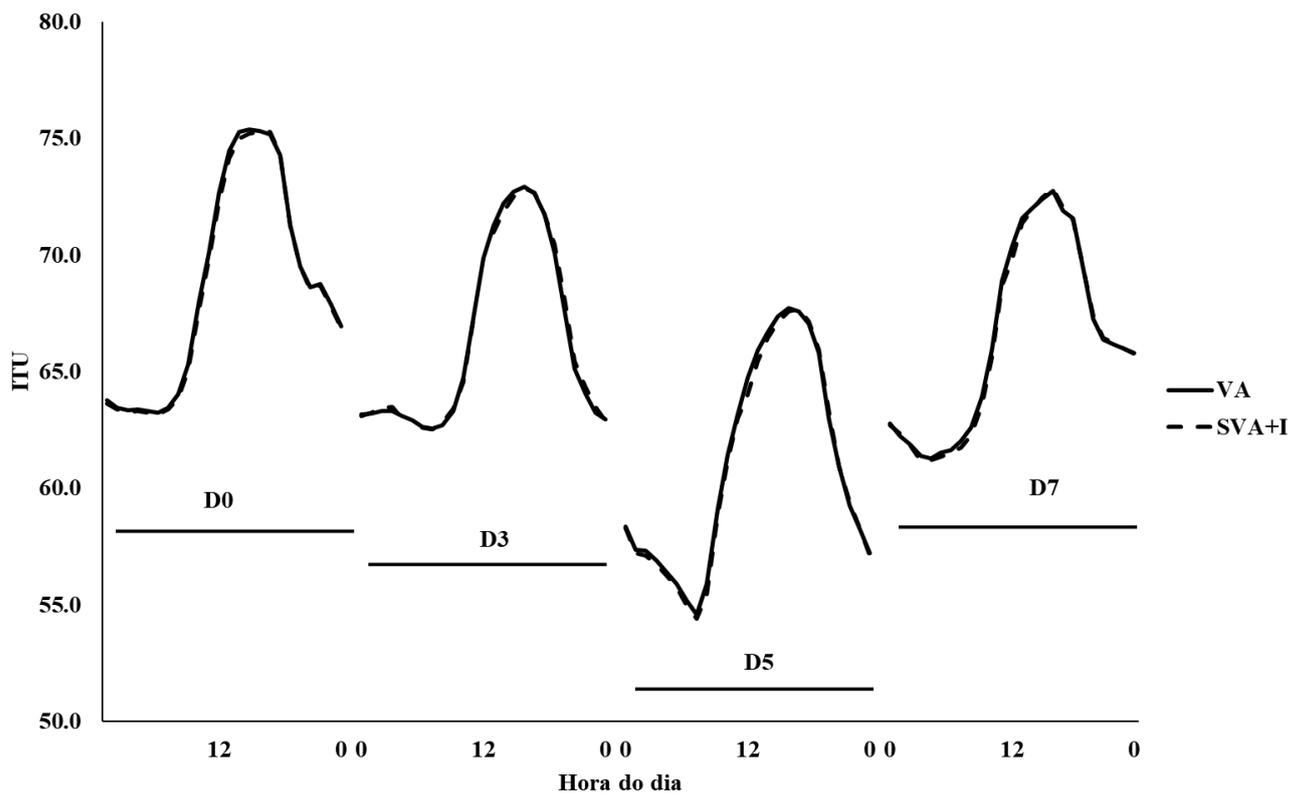


Figura 2. Índice de temperatura e umidade (ITU) durante o período experimental (PE) nos ambientes dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA+I (com insolação e sem ventilação e aspersão)

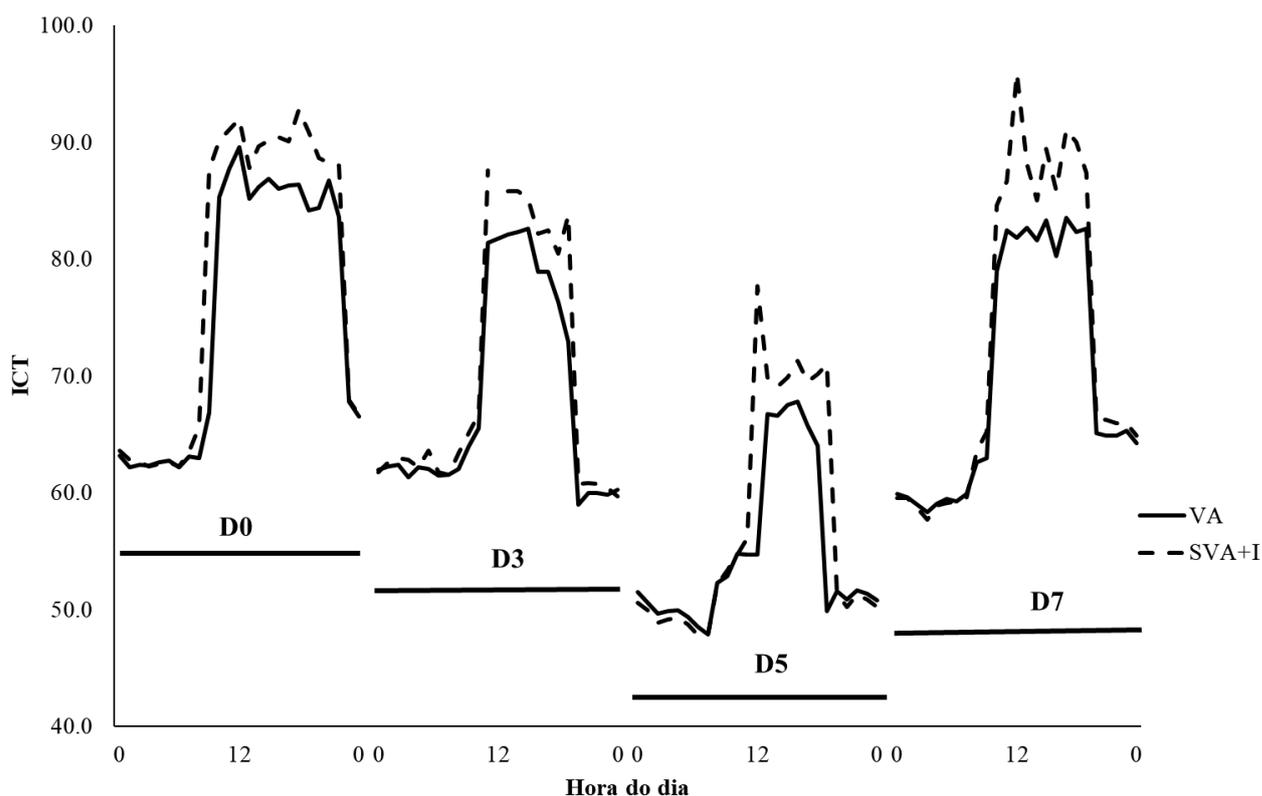


Figura 3. Índice de carga térmica (ICT) durante o período experimental (PE) nos ambientes dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA+I (com insolação e sem ventilação e aspersão)

Houve interação entre tratamento e raça ($P = 0.014$) e efeito de dia para CMS ($P < 0.0001$). Quando o CMS foi calculado como % de peso vivo (CMS como % de PV), as vacas VA ($P = 0.011$) e da raça Jersey ($P = 0.041$) consumiram mais, além de haver efeito de dia ($P = 0.0001$). Os tratamentos afetaram a produção de leite ($P = 0.002$) e de leite corrigido a 3,5% de gordura ($P = 0.0002$), as quais foram maiores nas vacas do tratamento VA. Houve interação entre dia e raça ($P = 0.023$) para leite corrigido a 3,5% de gordura. A eficiência alimentar (EA) e a eficiência alimentar corrigida a 3,5% de gordura (EA corrigida a 3,5% de gordura) foi similar entre tratamentos e raças, havendo apenas efeito de dia. Para o teor de proteína, houve interação entre tratamento e dia ($P = 0.017$). O teor de gordura, lactose, sólidos totais e os valores de ECS não diferiram entre tratamentos. Houve efeito de dia para lactose ($P < 0.0001$) e interação entre dia e raça para gordura ($P = 0.014$) e sólidos totais ($P = 0.007$). A concentração de NUL ($P = 0.002$) foi mais elevada no leite das vacas VA. Os resultados detalhados são mostrados na Tabela 2, Tabela 3 e nas Figuras 4 (A, B, C e D), Figuras 5 (A, B, C e D) e Figuras 6 (A, B, C e D).

Tabela 2. Média dos quadrados mínimos, erro padrão da média (SEM) e valor de P para consumo de matéria seca (CMS), eficiência alimentar (EA), produção de leite, composição do leite, nitrogênio ureico do leite (NUL) e escore de células somáticas (ECS) das vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA+I (com insolação e sem ventilação e aspersão)

Variáveis	Tratamento		SEM	Raça		SEM	P-value						
	VA	SVA+I		H	J		Trat.	Raça	Dia	Trat. x Raça	Trat. x Dia	Dia x Raça	Cov.
CMS (kg)	17,05	15,23	0,436	17,56	14,72	0,627	0,006	0,014	<0,0001	0,014	0,826	0,205	0,174
CMS como % PV (%)	3,36	3,03	0,09	3,04	3,35	0,10	0,011	0,041	0,0001	0,107	0,798	0,647	0,046
Leite (kg/dia)	21,92	19,58	0,498	20,82	20,68	0,505	0,002	0,850	0,053	0,848	0,963	0,241	<0,0001
Leite corrigido a 3,5% de gordura (kg/dia)	23,21	20,80	0,4043	22,14	21,86	0,403	0,0002	0,627	0,294	0,317	0,475	0,023	<0,0001
EA	1,30	1,29	0,04479	1,27	1,32	0,04399	0,816	0,368	0,0001	0,199	0,614	0,984	<0,0001
EA corrigido a 3,5% de gordura	1,41	1,36	0,04747	1,33	1,46	0,053	0,738	0,107	0,0003	0,190	0,991	0,389	<0,0001
Gordura (%)	3,99	3,88	0,125	3,87	4,00	0,152	0,527	0,615	0,013	0,932	0,939	0,014	0,002
Proteína (%)	3,51	3,35	0,039	3,44	3,42	0,043	0,009	0,735	0,025	0,635	0,017	0,073	<0,0001
Lactose (%)	4,33	4,30	0,040	4,35	4,28	0,039	0,559	0,267	<0,0001	0,914	0,904	0,900	<0,0001
Sólidos totais (%)	12,75	12,43	0,138	12,51	12,67	0,166	0,106	0,571	0,013	0,870	0,594	0,007	0,001
NUL (mg/dL)	21,92	19,58	0,498	20,82	20,68	0,505	0,002	0,850	0,053	0,848	0,963	0,241	<0,0001
ECS	3,57	3,85	0,4285	4,47	3,63	0,321	0,372	0,068	0,983	0,513	0,236	0,834	<0,0001

Tabela 3. Efeito da ventilação e aspersão (VA) ou ausência delas com insolação (SVA+I) sobre o consumo de matéria seca em kg/dia e em percentagem do peso vivo de vacas Holandesas ou Jersey

	CMS (kg/DIA)			CMS como % de PV		
	H	J	Média	H	J	Média
VA	19,27 Aa	14,89 Ab	17,05 A	3,30	3,41	3,36 A
SVA	15,85 Bb	14,59 Ab	15,23 B	2,76	3,28	3,02 B
Média	17,56 a	14,72 b		3,03 b	3,35 a	

*Letras iguais maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si ao nível de 5%.

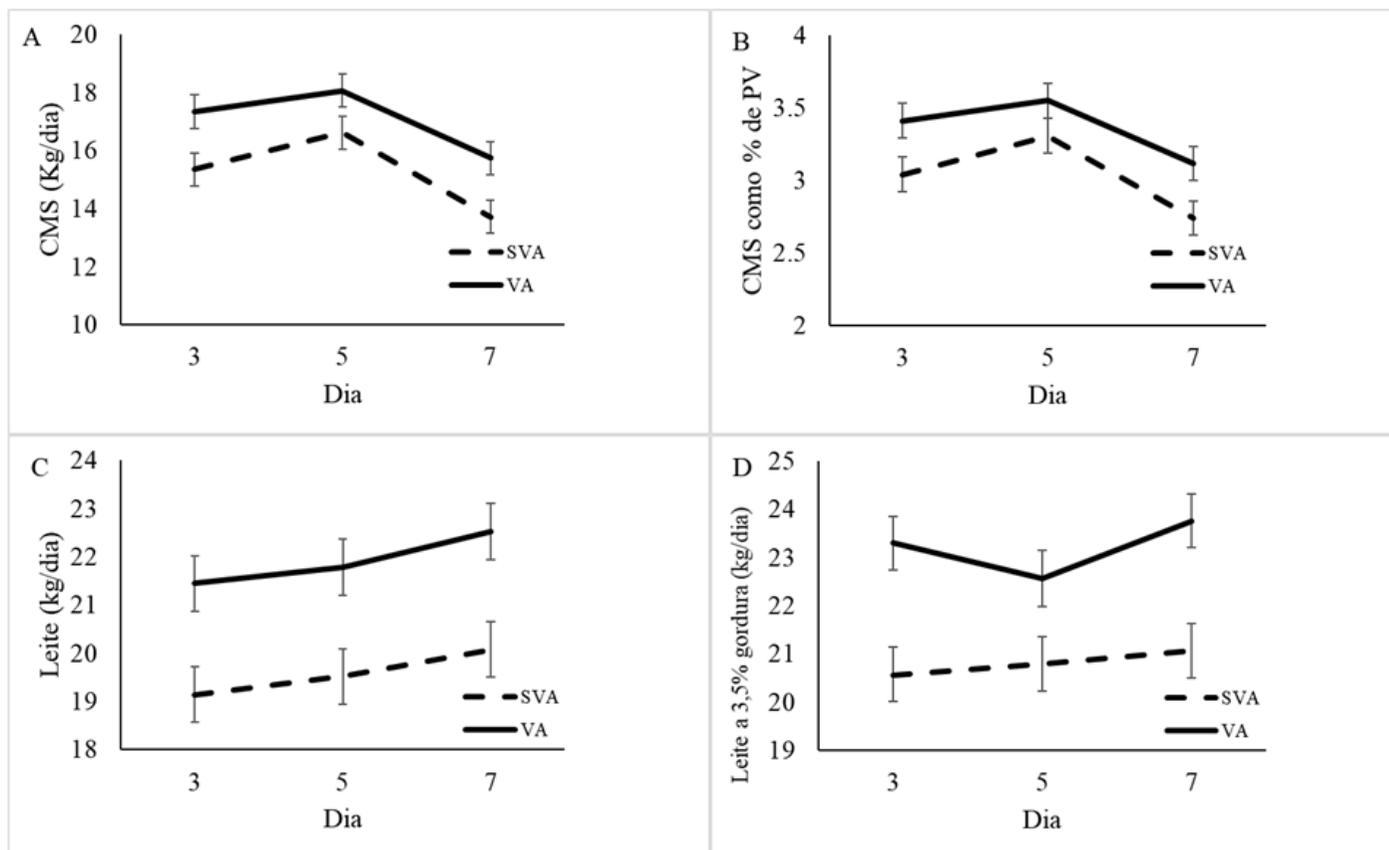


Figura 4. Consumo de matéria seca (CMS) e produção de leite das vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA+I (com insolação e sem ventilação e aspersão) em função dos dias de tratamento: A) CMS, B) consumo de matéria seca como % de peso vivo (CMS como % de PV), C) produção de leite, D) produção de leite corrigido a 3,5% de gordura

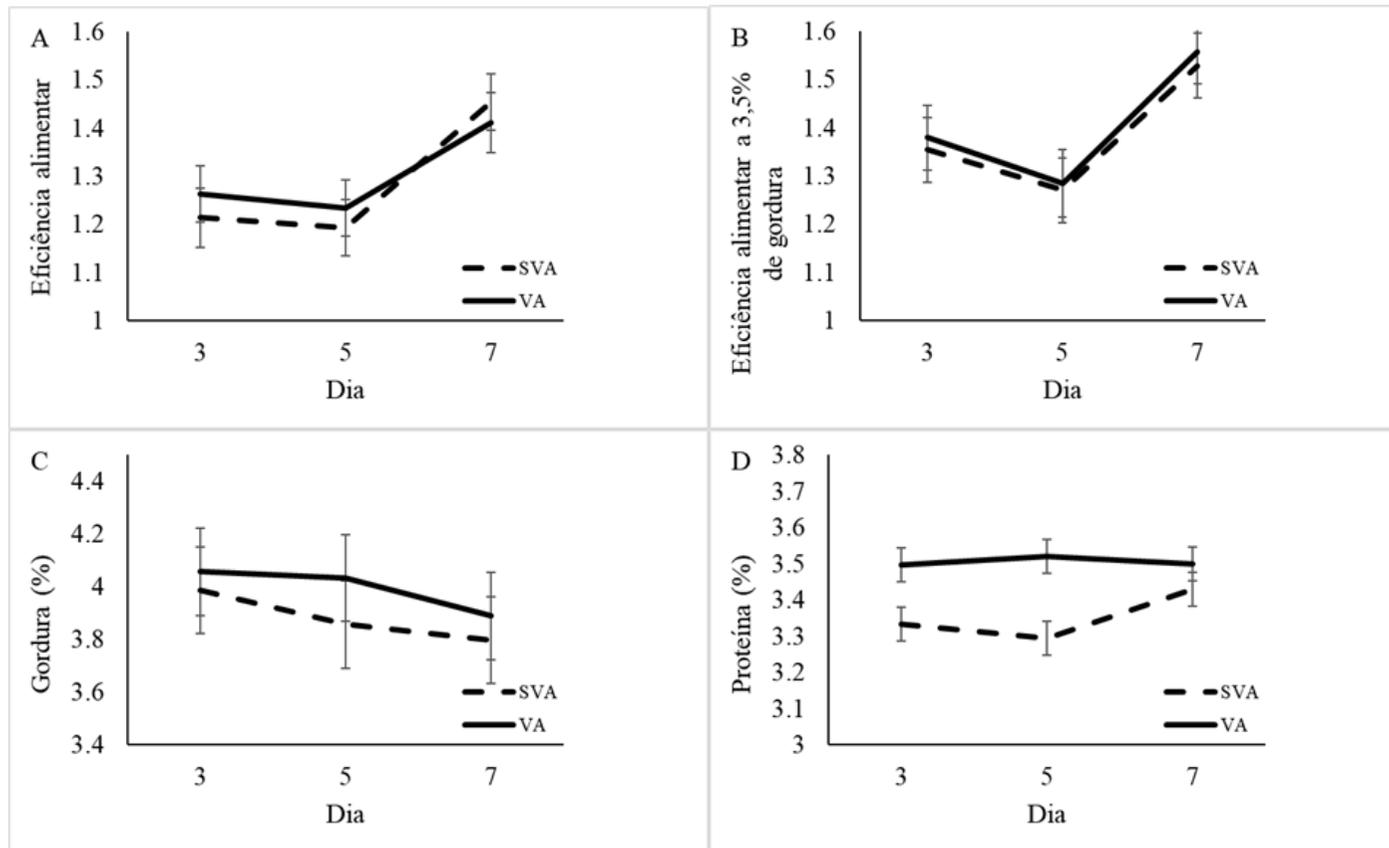


Figura 5. Eficiência e composição do leite das vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA+I (com insolação e sem ventilação e aspersão) em função dos dias de tratamento: A) eficiência alimentar, B) eficiência alimentar corrigida para 3,5% de gordura, C) teor de gordura, D) teor de proteína

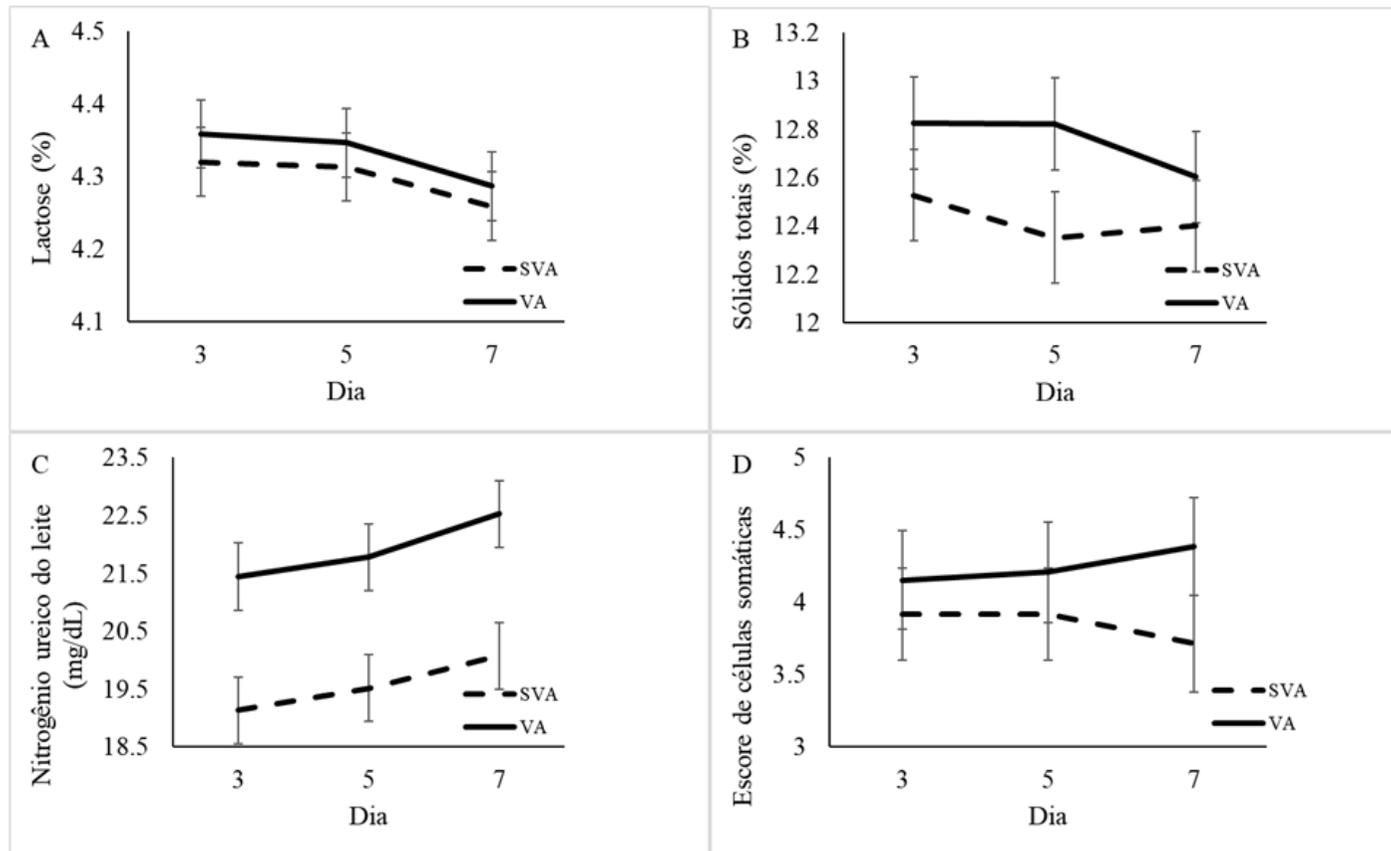


Figura 6. Composição do leite das vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA+I (com insolação e sem ventilação e aspersão) em função dos dias de tratamento: A) teor de lactose, B) teor de sólidos totais, C) concentração de nitrogênio ureico do leite, D) escore de célula somáticas

Em relação às propriedades físico-químicas do leite, não houve diferença entre os tratamentos quanto aos valores médios de teste do álcool e acidez titulável (Tabela 4) mas as vacas Holandês apresentaram maior estabilidade ao etanol ($P=0,029$). Houve interação entre tratamento e dia para os valores de pH ($P = 0,0001$). A crioscopia foi mais elevada nas vacas SVA + I ($P = 0,007$), além de efeito de dia ($P = 0,0003$). Os demais resultados são mostrados na Tabela 4 e na Figura 7 (A, B, C e D).

Tabela 4. Média dos quadrados mínimos, erro padrão da média (SEM) e valor de P para as propriedades físico-químicas do leite produzido das vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA+I (com insolação e sem ventilação e aspersão)

Variáveis	Tratamento			Raça			P-value						
	VA	SVA+I	SEM	H	J	SEM	Trat.	Raça	Dia	Trat. x Raça	Trat. x Dia	Dia x Raça	Cov.
Teste do álcool (%)	78,18	80,08	1,275	81,22	77,05	1,275	0,305	0,029	0,113	0,725	0,979	0,091	0,175
AT (°D)	16,72	15,84	0,480	16,27	16,30	0,485	0,203	0,967	0,047	0,245	0,850	0,110	0,207
pH	6,77	6,83	0,009	6,80	6,79	0,010	0,0003	0,516	<0,0001	0,252	<0,0001	0,178	0,053
Crioscopia (°H)	-0,5422	-0,5365	0,0014	-0,5406	-0,5382	0,0014	0,007	0,248	0,0003	0,881	0,979	0,900	0,232

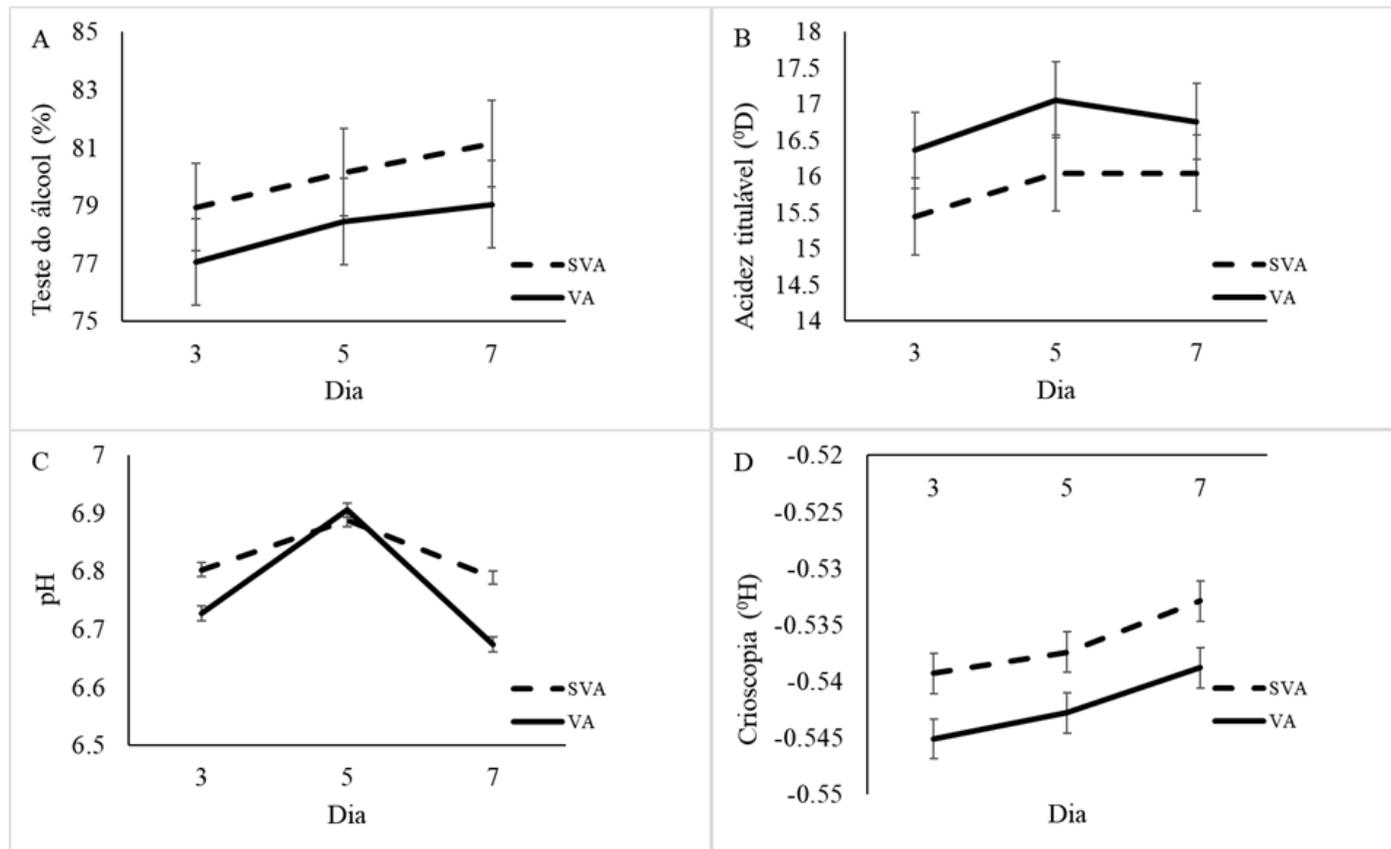


Figura 7. Propriedades físico-químicas do leite produzido das vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA+I (com insolação e sem ventilação e aspersão) em função dos dias de tratamento: A) Teste do álcool, B) acidez titulável, C) pH e D) crioscopia

Na avaliação de parâmetros fisiológicos, foram encontradas diferenças de tratamento nos parâmetros FR manhã (maior no tratamento SVA + I; $P=0,047$), TS tarde (maior no tratamento SVA + I; $P=0,015$), conforme mostrado na Tabela 4. Os resultados detalhados são mostrados Tabela 4 e nas Figuras 8 (A, B, C e D) e 9 (A, B e C). Houve efeito de dia ($P < 0,0001$) para FR manhã, FC manhã, TR manhã, FR tarde e TS tarde. Houve interação entre tratamento e dia para TR tarde ($P = 0,0001$) e MR tarde ($P = 0,002$). Houve interação entre dia e raça para FC tarde ($P = 0,001$). Os resultados detalhados são mostrados Tabela 5 e nas Figuras 8 (A, B, C e D) e 9 (A, B e C).

Tabela 5. Média dos quadrados mínimos, erro padrão da média (SEM) e valor de P para os parâmetros fisiológicos avaliados nas vacas do experimento das vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA+I (com insolação e sem ventilação e aspersão)

Variáveis	Tratamento		SEM	Raça		SEM	P-value						
	VA	SVA + I		H	J		Trat.	Raça	Dia	Trat. x Raça	Trat. x Dia	Dia x Raça	Cov.
FR (resp./min) manhã	51,51	59,02	2,456	54,08	56,45	2,381	0,047	0,493	< 0,0001	0,926	0,120	0,458	0,734
FC (bat./min) manhã	76,73	78,57	2,474	77,90	77,40	2,152	0,653	0,870	< 0,0001	0,723	0,521	0,212	0,498
TR (°C) manhã	38,22	38,20	0,080	38,21	38,21	0,080	0,810	0,965	< 0,0001	0,466	0,066	0,541	0,007
FR (resp./min) tarde	52,23	59,37	2,647	54,24	57,36	2,556	0,076	0,399	< 0,0001	0,982	0,217	0,234	0,463
FC (bat./min) tarde	89,40	90,13	2,379	86,28	93,25	2,046	0,848	0,024	< 0,0001	0,686	0,226	0,001	0,409
TS (°C) tarde	36,46	36,77	0,082	36,51	36,72	0,077	0,015	0,059	< 0,0001	0,469	0,530	0,910	0,643
TR (°C) tarde	38,40	39,46	0,08294	38,88	38,97	0,071	< 0,0001	0,353	< 0,0001	0,763	0,0001	0,533	0,001
MR (mov./min) tarde	3,76	2,77	0,195	2,99	3,54	0,199	0,001	0,064	< 0,0001	0,724	0,002	0,752	0,856

FR: frequência respiratória, FC: frequência cardíaca, TR: temperatura retal, TS: temperatura superficial

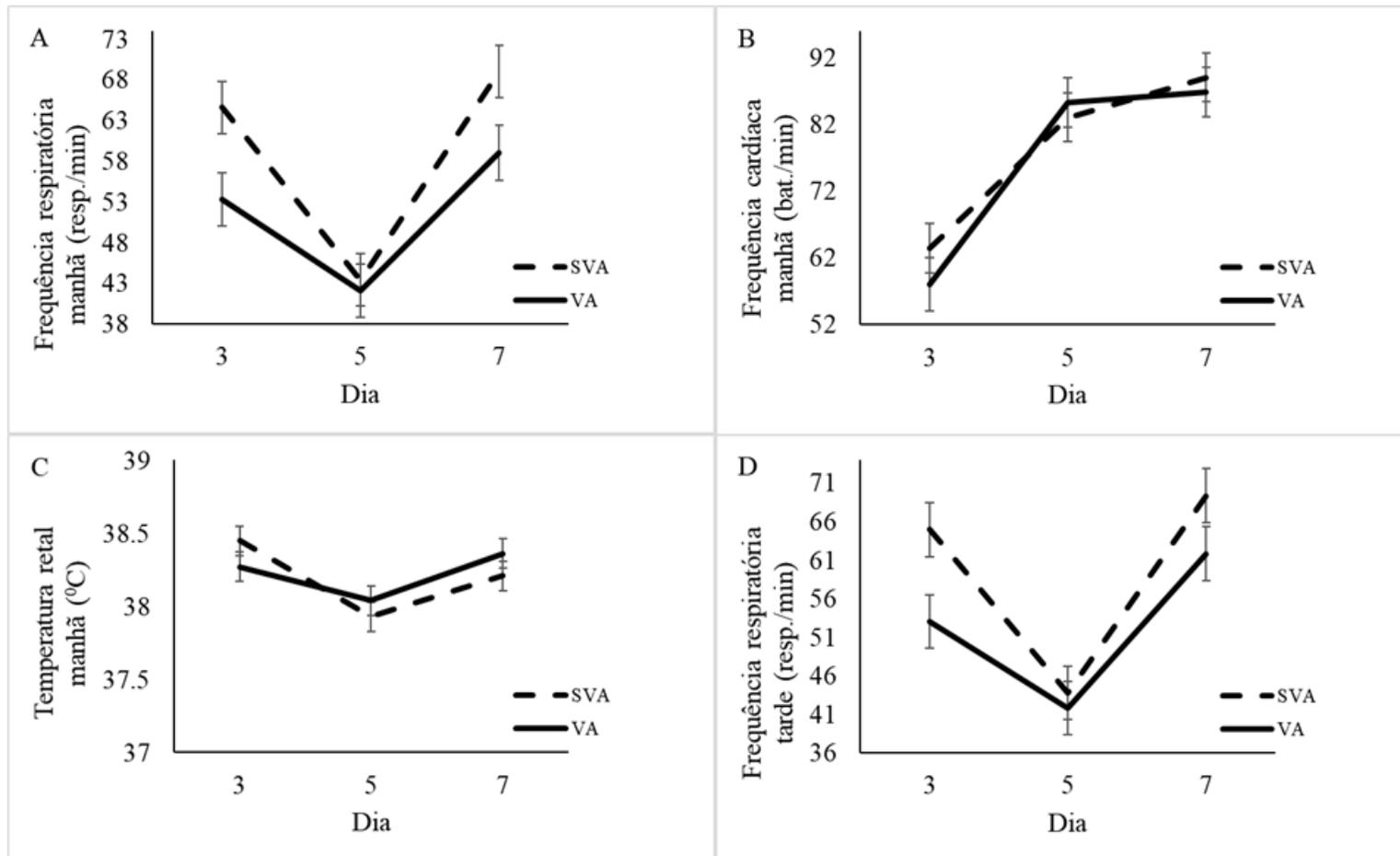


Figura 8. Parâmetros fisiológicos das vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA+I (com insolação e sem ventilação e aspersão) em função dos dias de tratamento: A) Frequência respiratória da manhã, B) Frequência cardíaca da manhã, C) Temperatura retal da manhã, D) Frequência respiratória da tarde

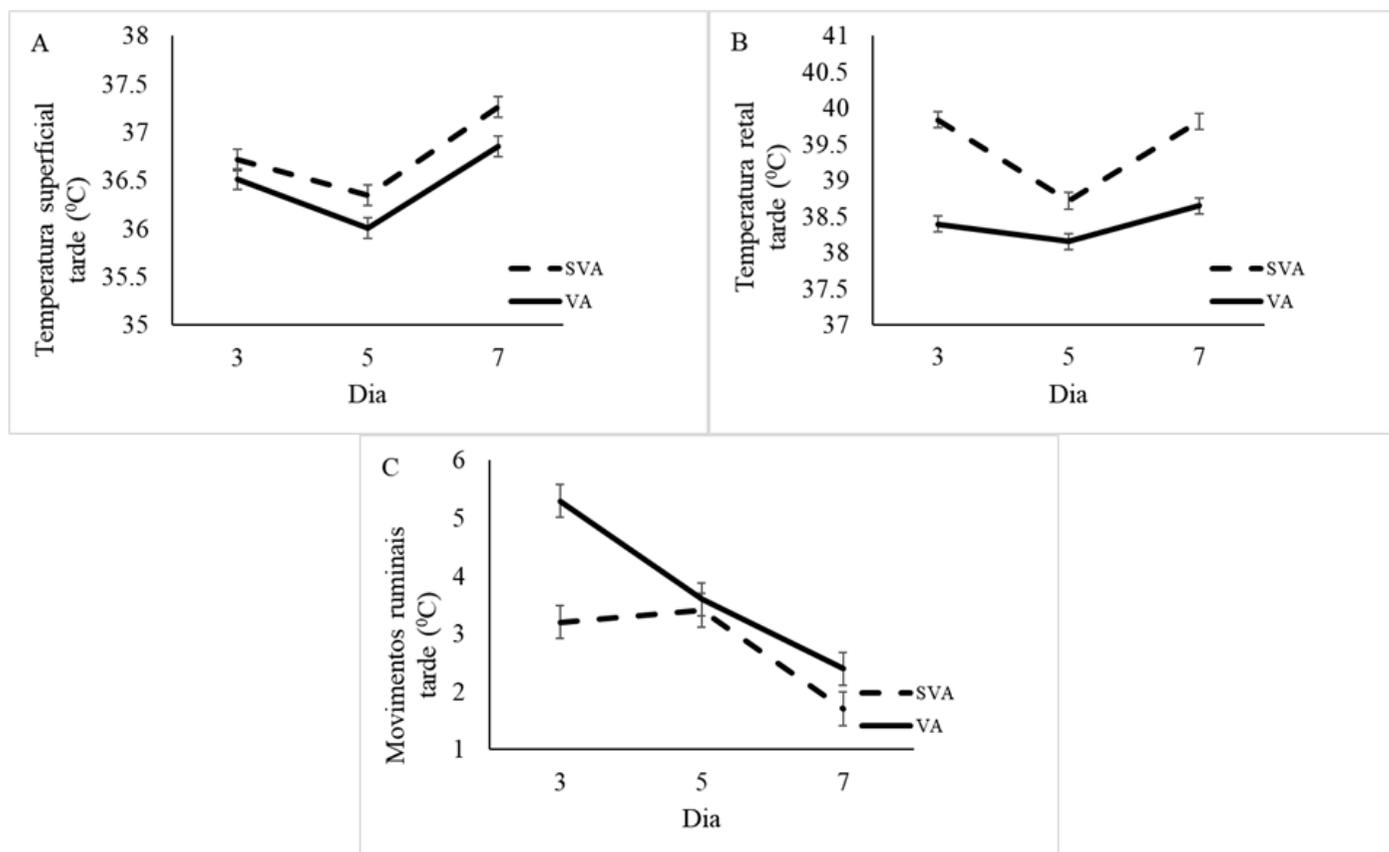


Figura 9. Parâmetros fisiológicos das vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA+I (com insolação e sem ventilação e aspersão) em função dos dias de tratamento: A) Temperatura superficial da tarde, B) temperatura retal da tarde, C) movimentos ruminais da tarde

Nos parâmetros bioquímicos avaliados, não houve diferença de tratamento para a concentração de beta-hidroxibutirato e glicose (Tabela 6 e Figura 10).

Tabela 6. Média dos quadrados mínimos, erro padrão da média (SEM) e valor de P para os parâmetros bioquímicos avaliados nas vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA+I (com insolação e sem ventilação e aspersão)

Variável	Tratamento		SEM	Raça		SEM	P-value						
	VA	SVA+I		H	J		Trat.	Raça	Dia	Trat. x Raça	Trat. x Dia	Dia x Raça	Cov.
Glicose	57,45	53,45	1,670	56,91	53,99	1,710	0,101	0,247	0,300	0,992	0,465	0,625	0,019
Beta-hidroxibutirato	1,08	1,22	0,058	1,08	1,22	0,059	0,099	0,118	0,365	0,079	0,239	0,980	0,004

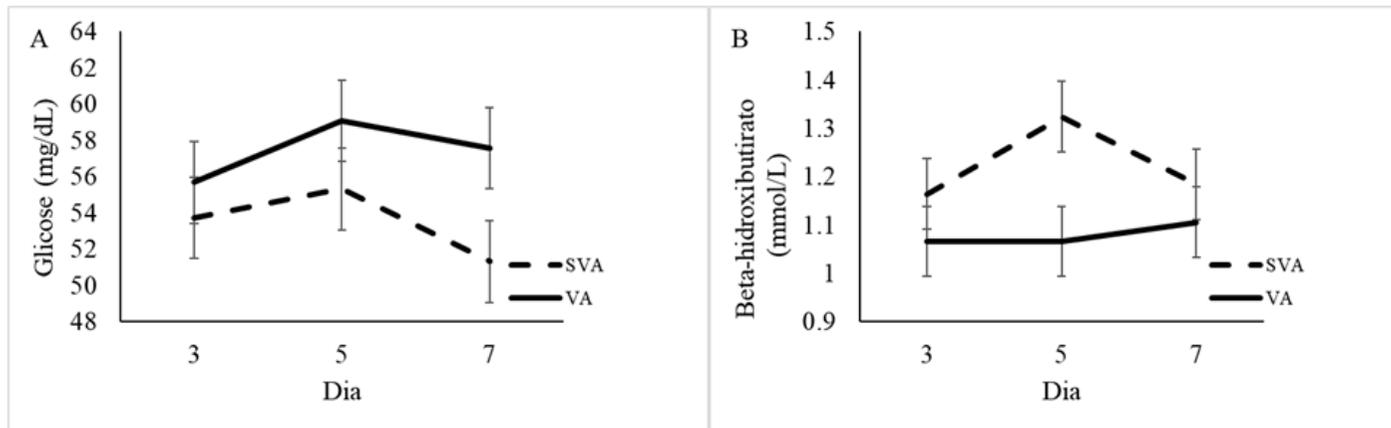


Figura 10. Parâmetros bioquímicos avaliados nas vacas dos tratamentos VA (ventilação e aspersão) e SVA+I (com insolação e sem ventilação e aspersão) em função dos dias de tratamento: A) glicose; B) beta-hidroxiacetato

5.6 DISCUSSÃO

Os valores de ITU e ICT determinados no período experimental, mostram condições ambientais que podem provocar estresse calórico em vacas leiteiras (Figura 2 e Figura 3). Zimbelman et al. (2009), com base em dados fisiológicos e produtivos, determinaram que valores de ITU até 68 proporcionam condições de conforto para vacas leiteiras de alta produção. No entanto, esse índice não leva em consideração o calor ganho pelo animal devido ao microambiente, o efeito da velocidade do vento e da insolação solar, elementos ambientais que afetam consideravelmente os mecanismos de troca de calor (LEES; LEES; GAUGHAN, 2018). Para Gaughan et al. (2008), valores de ICT abaixo de 70 indicam condições de conforto térmico para bovinos; ICT entre 70,1 e 77 indicam condições de pouco calor; ICT entre 77 e 85 indicam condições quentes; valores de ICT acima de 85 indicam condições de calor severo. Considerando esses dados em conjunto com parâmetros fisiológicos, as vacas do grupo SVA+I apresentaram maior FR manhã e TS tarde, possivelmente indicando mudanças fisiológicas na tentativa de dissipar calor acumulado.

A ausência de resfriamento por ventilação e aspersão e o curto período diário de insolação, diminuiu o CMS como % do PV. O estresse calórico diminuiu o CMS em kg de MS por dia das vacas da raça Holandesa. Em regiões de clima tropical e subtropical, a radiação solar é um dos elementos climáticos que mais impactam na criação de bovinos (BRETTAS et al., 2017). O efeito imediato do calor em vacas leiteiras é a redução do CMS e com isso, redução na taxa metabólica e produção de calor endógeno (HILL; WALL, 2017). Porém, a diminuição do CMS, explica apenas parte da redução da produção de leite em vacas sob estresse calórico (RHOADS et al., 2009; WHEELLOCK et al., 2010). Animais em estresse por calor iniciam mudanças metabólicas que não refletem seu plano nutricional, indicando mudanças no metabolismo e na produtividade independentemente da redução de consumo de alimento (BAUMGARD et al., 2015). Para Tao et al. (2018), o efeito do estresse calórico depende do estágio da lactação e observaram que vacas no meio do estágio da lactação diminuem imediatamente a produção de leite, enquanto vacas no início e no final da lactação apresentaram redução na produção de leite após uma semana de estresse por calor quando comparadas com vacas sob resfriamento. Para Wheelock et al. (2010) e TAO et al. (2018), em vacas leiteiras no meio do estágio da lactação, os efeitos do calor provocam um aumento da captação de glicose por outros tecidos em detrimento da glândula mamária, limitando

assim, a disponibilidade de glicose para a síntese de lactose na glândula mamária, podendo assim, explicar em parte a redução na produção de leite e alterações na composição do leite, comuns em vacas sob estresse calórico.

As vacas do grupo VA e SVA+I apresentaram EA similares. Em geral, condições ambientais de frio ou calor intenso, afetam a EA. O estresse calórico por calor aumenta as exigências de energia para manutenção e pode reduzir a EA já que mais nutrientes são necessários para funções como o processo de termorregulação (HUTJENS, 2005). O curto período experimental e as condições de estresse calórico, leves a moderadas deste experimento, podem explicar as eficiências similares dos dois tratamentos. Além disso, a região oeste de Santa Catarina, local do experimento, registra elevadas temperaturas, principalmente nos meses de novembro a março (CLIMATEMPO, 2021). Condições ambientais adversas desencadeiam o processo de aclimação, uma resposta coordenada para melhorar a aptidão de vacas leiteiras a vários estressores ambientais como, elevada temperatura, umidade e radiação solar (COLLIER et al., 2018). Assim, as eficiências similares podem refletir também o estado de aclimatização das vacas devido às condições ambientais anteriores ao experimento.

O estresse por calor não afeta apenas a produção de leite, mas também, a sua composição e os resultados deste experimento mostram que as vacas SVA+I produziram menos leite, menos leite corrigido a 3,5% de gordura e menor concentração de NUL. Gao et al. (2017), observaram uma redução de 4,1% no teor de proteína do leite em vacas sob estresse calórico (HS) quando comparadas com vacas *pair-fed* em condições termoneutras (PFTN), (HS = 2,57% versus PFTN = 2,68%; P = 0,0076). Consideraram que o estresse calórico não só reduz a produção de leite, mas também afeta a síntese de proteína na glândula mamária e relacionaram isso ao aumento no turnover de proteínas no organismo e uma competição por aminoácidos entre caseínas e proteínas estruturais. Para Tao et al. (2018), em vacas sob estresse calórico ocorrem alterações de metabolismo e absorção de nutrientes, que podem afetar a glândula mamária, comprometendo a capacidade de síntese e o crescimento mamário. Já para Bernabucci e Calamari (1998), em vacas sob estresse calórico, a redução do teor de proteína do leite pode estar relacionado a menor síntese de proteína microbiana devido a menor ingestão de proteína e energia resultante da diminuição do CMS e consequente diminuição do fluxo duodenal de aminoácidos. Também consideram que em vacas sob estresse calórico pode haver redução no teor de proteína do leite pois mais aminoácidos são usados como precursores de glicose e energia via gliconeogênese. A concentração do NUL, em geral, reflete o

equilíbrio de energia e proteína no rúmen e conseqüentemente, a menor ingestão total de nitrogênio, de modo que a menor concentração de NUL das vacas SVA+I podem ser a diminuição do CMS e conseqüentemente diminuição da síntese de proteína microbiana (GREEN, 2012).

Observamos neste experimento que os valores médios de teste do álcool e acidez titulável foram similares. As vacas SVA+I, no entanto, produziram leite com maior crioscopia, em comparação com as vacas VA. Para Bernabucci e Calamari (1998), as alterações de crioscopia são dependentes de alterações fisiológicas que ocorrem em vacas sob estresse calórico. A lactose e íons dissolvidos como cloretos, cálcio, respondem por cerca de 80% da diminuição do índice crioscópico e a ureia, ácidos graxos de cadeia curta e CO₂ são responsáveis por cerca de 20% (TÖPEL, 2016). Variações nos componentes solúveis do leite e no grau de hidratação de vacas, refletem diretamente na crioscopia do leite e podem explicar os resultados de nosso experimento.

Em relação aos parâmetros bioquímicos avaliados, as concentrações de beta-hidroxibutirato e glicose foram similares entre tratamentos e possivelmente, refletem o processo de aclimatação ou o estágio da lactação das vacas.

5.7 CONCLUSÃO

O estresse calórico e a insolação reduzem o consumo de vacas leiteiras. Vacas Holandesas submetidas ao estresse calórico com insolação, tem um consumo total mais reduzido que vacas da raça Jersey. Vacas Holandesas e Jersey, sob estresse calórico, sem acesso a ventilação e aspersão e sob um curto período de insolação nas horas mais quentes do dia, reduzem a produção de leite e a concentração de nitrogênio ureico do leite, mas a crioscopia aumenta. O estresse calórico afeta os parâmetros fisiológicos e aumenta a FR e a TS. O estresse calórico não afeta a concentração de BHB e glicose.

5.8 AGRADECIMENTOS

Ao Sindicato das Indústrias de Laticínios e Produtos Derivados do estado de Santa Catarina (SINDILEITE/SC) e à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC), pelos recursos financeiros concedidos para o financiamento parcial deste projeto e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A. S. **FATORES NUTRICIONAIS E NÃO NUTRICIONAIS QUE AFETAM A COMPOSIÇÃO DO LEITE BOVINO**. Tese de doutorado do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da UFRGS. 2015. UFRGS, 2015.

ABREU, A. S. et al. Natural tree shade increases milk stability of lactating dairy cows during the summer in the subtropics. **Journal of Dairy Research**, v. 87, n. 4, p. 444–447, 2020.

ARCHANA, P. R. et al. Role of Heat Shock Proteins in Livestock Adaptation to Heat Stress. **Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research**, v. 5, n. 1, 11 jan. 2017. Disponível em: <<https://medcraveonline.com/JDVAR/role-of-heat-shock-proteins-in-livestock-adaptation-to-heat-stress.html>>.

AZEVÊDO, D. M. M. R.; ALVES, A. A. **Bioclimatologia Aplicada à Bovinocultura Leiteira**. [s.l.] EMBRAPA, 2009.

BALDISSERA, F. G. et al. Subacute exposure to residual oil fly ash (ROFA) increases eHSP70 content and extracellular-to-intracellular HSP70 ratio: a relation with oxidative stress markers. **Cell Stress and Chaperones**, v. 23, n. 6, p. 1185–1192, 2018.

BAUMAN, D. E. et al. Nutrient partitioning and milk yield: constraints and opportunities in the 21ST century. In: Proc. Cornell Nutr. Conf., 1985, **Anais...**2004.

BAUMGARD, L. H. et al. Effects of Heat Stress on Nutritional Requirements of Lactating Dairy Cattle. In: 5th Annual Arizona Dairy Production Conference, **Anais...**2006.

BAUMGARD, L. H. et al. Effects of heat stress on the immune system , metabolism and nutrient partitioning : implications on reproductive success. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 39, n. 1, p. 173–183, 2015.

BAUMGARD, L. H.; RHOADS, R. P. Effects of Heat Stress on Postabsorptive Metabolism and Energetics. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 1, p. 311–337, 2013. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-animal-031412-103644>>.

BERNABUCCI, U. et al. Effects of the hot season on milk protein fractions in Holstein cows. **Animal Research**, v. 51, p. 25–33, jan. 2002. Disponível em: <<http://www.edpsciences.org/10.1051/animres:2002007>>.

BERNABUCCI, U. et al. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. **Animal**, v. 4, n. 7, p. 1167–1183, 2010.

BERNABUCCI, U. et al. Effect of summer season on milk protein fractions in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 3, p. 1815–1827, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8788>>.

BERNABUCCI, U.; BASIRICÓ, L.; MORERA, P. Impact of hot environment on colostrum and milk composition. **Cellular and Molecular Biology**, v. 59, n. 1, p. 67–83, 2013.

- BERNABUCCI, U.; CALAMARI, L. Effects of heat stress on bovine milk yield and composition. **Zootecnica e Nutrizione Animale**, v. 24, n. January, p. 247–257, 1998.
- BERTOCCHI, L. et al. Seasonal variations in the composition of Holstein cow's milk and temperature-humidity index relationship. **Animal**, v. 8, n. 4, p. 667–674, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1017/S1751731114000032>>.
- BIJL, E. **Natural variation in casein composition of milk**. 2014. Wageningen University, 2014. Disponível em: <<http://edepot.wur.nl/302757>>.
- BJERG, M.; RASMUSSEN, M. D.; NIELSEN, M. O. Changes in Freezing Point of Blood and Milk During Dehydration and Rehydration in Lactating Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 9, p. 3174–3185, 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030205730010>>.
- BLECK, G. T. et al. Lactose synthase components in milk: Concentrations of α -lactalbumin and β 1,4-galactosyltransferase in milk of cows from several breeds at various stages of lactation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. 2, p. 241–247, 2009.
- BONDAN, C. et al. Milk composition of holstein cows: A retrospective study. **Ciencia Rural**, v. 48, n. 12, p. 1–8, 2018.
- BRETTAS, P. K. de M. et al. Melhor índice de estresse térmico para novilhas leiteiras mestiças. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, n. 1486, p. 1–8, 2017. Disponível em: <actascivet-submission@ufrgs.br>.
- CLIMATEMPO. **Climatologia, Itapiranga, SC, Brasil**. Disponível em: <<http://www.climatempo.com.br>>.
- COLLIER, R. J. et al. Quantifying Heat Stress and Its Impact on Metabolism and Performance. p. 74–84, 1982.
- COLLIER, R. J. et al. Use of gene expression microarrays for evaluating environmental stress tolerance at the cellular level in cattle. **Journal of animal science**, v. 84 Suppl, n. July, p. 1–13, 2006.
- COLLIER, R. J. et al. Genes Involved in the Bovine Heat Stress Response. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 2, p. 445–454, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030208713869>>.
- COLLIER, R. J. et al. **Heat stress: Physiology of acclimation and adaptation** **Animal Frontiers** Oxford University Press, , jan. 2018. . Disponível em: <<https://academic.oup.com/af/article/9/1/12/5146549>>.
- CORAZZIN, M. et al. Effect of heat stress on dairy cow performance and on expression of protein metabolism genes in mammary cells. **Animals**, v. 10, n. 11, p. 1–13, 2020.
- DAS, R. et al. Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review. **Veterinary World**, v. 9, n. 3, p. 260–268, 2016.
- DEB, R. et al. Effect of heat stress on the expression profile of Hsp90 among Sahiwal (*Bos indicus*) and Frieswal (*Bos indicus*×*Bos taurus*) breed of cattle: A comparative study. **Gene**, v. 536, n. 2, p. 435–440, 2014. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2013.11.086>>.

DEB, R.; SAJJANAR, B.; PAVANI, K. C. Bovine Heat Shock Protein 70 and Its Application in Cellular Thermo Tolerance. **Journal of Veterinary Science & Technology**, v. 06, n. 06, p. 7579, 2015.

DEBONA, D. **SC conquista o quarto lugar na produção de leite do Brasil - De Ponto a Ponto - Notícias - Diário Catarinense.**

DIKMEN, S. et al. Heritability of rectal temperature and genetic correlations with production and reproduction traits in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 6, p. 3401–3405, 2012.

DUBREUIL, V. et al. Os tipos de climas anuais no Brasil : uma aplicação da classificação de Köppen de 1961 a 2015. **Confins**, v. 37, n. 37, p. 1–20, 24 set. 2018. Disponível em: <<http://journals.openedition.org/confins/15738>>.

FAGNANI, R. **Principais fraudes em leite | Rafael Fagnani | MilkPoint.**

FAGNANI, R.; ARAÚJO, J. P. A.; BOTARO, B. G. Field findings about milk ethanol stability: a first report of interrelationship between α -lactalbumin and lactose. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 7, p. 2787–2792, 2018.

FAGNANI, R.; BELOTI, V.; BATTAGLINI, A. P. P. Acid-base balance of dairy cows and its relationship with alcoholic stability and mineral composition of milk. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 5, p. 398–402, 2014.

FERGUSON, J. D.; GALLIGAN, D. T.; THOMSEN, N. Principal Descriptors of Body Condition Score in Holstein Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 9, p. 2695–2703, 1994.

FOX, P. F. et al. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. 2. ed. [s.l.] Springer, 2015.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. 1. ed. London: Thomson Science, 1998.

GAO, S. T. et al. The effects of heat stress on protein metabolism in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 6, p. 5040–5049, 2017.

GARNER, J. B. et al. Genomic selection improves heat tolerance in dairy cattle. **Scientific Reports**, v. 6, n. September, p. 1–9, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep34114>>.

GAUCHERON, F. The minerals of milk. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 45, p. 473–483, 2005.

GAUGHAN, J. B. et al. A new heat load index for feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 1, p. 226–234, 2008.

GAUGHAN, J. B. et al. Effects of chronic heat stress on plasma concentration of secreted heat shock protein 70 in growing feedlot cattle. **J. Anim. Sci**, v. 91, p. 120–129, 2013. Disponível em: <<http://www.journalofanimalscience.org/content/91/1/120%5Cnwww.asas.org%5Cnwww.journalofanimalscience.org>>.

GREEN, M. **Dairy herd health**. Oxfordshire, UK: CABI, 2012.

- HAHN, G. L.; MADER, T. L.; EIGENBERG, R. A. Perspective on development of thermal indices for animal studies and management. In: LACETERA, N. et al. (Ed.). **Interactions between climate and animal production**. EAAP Technical Series. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 2003. p. 31–44.
- HAO, L. et al. The Effect of Heat Stress on the Metabolism of Dairy Cows: Updates & Review. **Austin Journal of Nutrition & Metabolism**, v. 3, n. 1, p. 1–5, 2016.
- HECK, J. M. L. et al. Seasonal variation in the Dutch bovine raw milk composition. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 10, p. 4745–4755, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2009-2146>>.
- HENNO, M. et al. Factors affecting the freezing point stability of milk from individual cows. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 2, p. 210–215, 2008.
- HILL, D. L.; WALL, E. Weather influences feed intake and feed efficiency in a temperate climate. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 3, p. 2240–2257, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-11047>>.
- HILLMAN, P. E. et al. Impact of hair color on thermoregulation of dairy cows to direct sunlight. **ASAE Annual Meeting**, n. 014031, p. Paper No. 014031, 2001. Disponível em: <<http://elibrary.asabe.org/abstract.asp?aid=23648&t=5>>.
- HOLT, C.; CARVER, J. A. Darwinian transformation of a “scarcely nutritious fluid” into milk. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 25, n. 7, p. 1253–1263, 2012.
- HORNE, D. S. Ethanol Stability and Milk Composition. **Advanced Dairy Chemistry**, v. 1B, p. 225–246, 2016.
- HU, H. et al. The effect of heat stress on gene expression and synthesis of heat-shock and milk proteins in bovine mammary epithelial cells. **Animal Science Journal**, v. 87, n. 1, p. 84–91, 2016a.
- HU, H. et al. Heat-induced apoptosis and gene expression in bovine mammary epithelial cells. **Animal Production Science**, v. 56, n. 5, p. 918–926, 2016b.
- HUTJENS, M. F. Dairy Efficiency and Dry Matter Intake. In: Proceedings of the 7th Western Dairy Management Conference, Reno, . **Anais...** Reno, : 2005. Disponível em: <<http://wdmc.org/2005/8Hutjens.pdf>>. Acesso em: 13 jul. 2021.
- HUTJENS, M. F. Benchmarking Your Feed Efficiency, Feed Costs, and Income over Feed Cost Economic Benchmarking Your Feeding Program. **WCDS Advances in Dairy Technology**, v. 22, n. Table 1, p. 3–10, 2010.
- KADZERE, C. T. et al. Heat stress in lactating dairy cows: A review. **Livestock Production Science**, v. 77, n. 1, p. 59–91, 2002.
- KLEIN, B. G. **Cunningham Tratado de Fisiologia Veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.
- KRISTENSEN, T. N. et al. Hsp72 is present in plasma from Holstein-Friesian dairy cattle, and the concentration level is repeatable across days and age classes. **Cell Stress & Chaperones**, v. 9, p. 143–149, 2004.

- LEES, J. C.; LEES, A. M.; GAUGHAN, J. B. Developing a heat load index for lactating dairy cows. **Animal Production Science**, v. 58, n. 8, p. 1387–1391, 2018.
- MA, L. et al. Heat stress induces proteomic changes in the liver and mammary tissue of dairy cows independent of feed intake: An iTRAQ study. **PLoS ONE**, v. 14, n. 1, p. 1–16, 2019.
- MADER, T. L.; DAVIS, M. S.; BROWN-BRANDL, T. Environmental factors influencing heat stress in feedlot cattle 1 , 2. **J. Anim. Sci.**, v. 84, p. 712–719, 2006.
- MARINS, T. N. et al. Response of lactating dairy cows fed different supplemental zinc sources with and without evaporative cooling to intramammary lipopolysaccharide infusion: Intake, milk yield and composition, and hematologic profile. **J Anim Sci.**, v. Mar. 7, 2019.
- MARQUES, L. T. et al. Ocorrência do leite instável ao álcool 76% e não ácido (lina) e efeito sobre os aspectos físico-químicos do leite. **Revista brasileira de agrociencia**, v. 13, n. 1, p. 91–97, 2007.
- MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F.; O'MAHONY, J. A. **Advanced Dairy Chemistry**. 4. ed. Cham: Springer International Publishing, 2020. v. 2
- MERTENS, D. R. et al. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 6, p. 1217–1240, 2002.
- MIN, L. et al. Effects of heat stress on serum insulin, adipokines, AMP-activated protein kinase, and heat shock signal molecules in dairy cows. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, v. 16, n. 6, p. 541–548, 13 jun. 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1631/jzus.B1400341>>.
- MORGAN, P. E. et al. Casein proteins as molecular chaperones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2670–2683, 2005.
- NANAS, I. et al. **A study on stress response and fertility parameters in phenotypically thermotolerant and thermosensitive dairy cows during summer heat stress**. [s.l.: s.n.]v. 55
- NRC. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. Washington, D C: National Academies Press, 2001.
- ORELLANA, R. M. et al. Effects of heat stress, dietary Zn source and mammary inflammation on plasma heat shock protein concentration and gene expression of mammary gland in lactating dairy cows. In: Abstracts of the 2019 American Dairy Science Association ® Annual Meeting. Journal of Dairy Science®, **Anais...**2017.
- PANTOJA, J. C. F. et al. Sampling strategies for total bacterial count of unpasteurized bulk milk. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 5, p. 2326–2335, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-5098>>.
- PILATTI, J. A. O comportamento diurno e bem-estar de vacas em sistema de confinamento Compost Barn. **Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Dois Vizinhos**, p. 150, 2017. Disponível em:

<[http://riut.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/2446/1/DV_PPGZO_M_Pilatti%2C Jaqueline Agnes_2017.pdf](http://riut.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/2446/1/DV_PPGZO_M_Pilatti%2C%20Jaqueline%20Agnes_2017.pdf)>.

RENQUIST, B. J. Invited Review: Hypophagia and hypogalactia associated with heat stress. **Applied Animal Science**, v. 35, n. 1, p. 49–56, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.15232/aas.2018-01773>>.

RHOADS, M. L. et al. Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows : I . Production , metabolism , and aspects of circulating somatotropin. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 5, p. 1986–1997, 2009.

RICHTER, K.; HASLBECK, M.; BUCHNER, J. The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. **Molecular Cell**, v. 40, n. 2, p. 253–266, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2010.10.006>>.

ROBINSON, P. H.; JUAREZ, S. T. Locomotion scoring your cows : Use and interpretation what is a locomotion score ? **Department of Animal Science University of California**, p. 49–58, 2001.

SADAT, A.; EZZATPANAH, H.; BAKHODA, H. Solubility and structure of milk powders manufactured with the addition of disodium phosphate and tetrasodium pyrophosphate mixtures. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 11, p. 2645–2657, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1247272>>.

SAMKOVÁ, E. et al. Animal factors affecting fatty acid composition of cow milk fat: A review. **South African Journal of Animal Sciences**, v. 42, n. 2, p. 83–100, 2012.

SAS. SAS ® UNIVERSITY EDITION. **Statistical Analyses System** SAS Institute Inc, , 2017. .

SCHMIDT, K. A.; STUPAR, J.; SHIRLEY, J. E. Factors affecting titratable acidity in raw milk. v. 0, n. 2, 1996.

SCHUKKEN, Y. H.; FULTON, C. D.; LESLIE, K. E. Freezing point of bulk milk in Ontario - An observational study. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 12, p. 995–998, 1992.

SHARMA, a K. et al. Climatological and genetic effects on milk composition and yield. **Journal of dairy science**, v. 66, n. 1, p. 119–26, 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6833586>>.

SHARMA, N.; SINGH, N. K.; BHADWAL, M. S. Relationship of somatic cell count and mastitis: An overview. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 24, n. 3, p. 429–438, 2011.

SHWARTZ, G. et al. Effects of a supplemental yeast culture on heat-stressed lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 3, p. 935–942, 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030209704011>>.

SILANIKOVE, N. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. **Livestock Production Science**, v. 67, n. October, p. 1–18, 2000.

SILVA, N. N. et al. Casein micelles: From the monomers to the supramolecular structure. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, p. 1–15, 2019.

SLIMEN, B. et al. Heat stress effects on livestock: Molecular, cellular and metabolic aspects, a review. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 100, n. 3, p. 401–412, 2016.

SMITH, D. L. et al. 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, n. 5, p. 3028–3033, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5737>>.

SRIKANDAKUMAR, A.; JOHNSON, E. H. Effect of heat stress on milk production, rectal temperature, respiratory rate and blood chemistry in Holstein, Jersey and Australian milking Zebu cows. **Tropical Animal Health and Production**, v. 36, n. 7, p. 685–692, 2004a.

SRIKANDAKUMAR, A.; JOHNSON, E. H. Effect of heat stress on milk production, rectal temperature, respiratory rate and blood chemistry in Holstein, Jersey and Australian milking Zebu cows. **Tropical Animal Health and Production**, v. 36, n. 7, p. 685–692, 2004b.

TAO, B. S.; BERNARD, J. K.; MONTEIRO, A. P. A. COW BEHAVIOR : A Critical Factor to Consider Under Heat Stress. v. 10, p. 1–4, 2011.

TAO, S. et al. Symposium review: The influences of heat stress on bovine mammary gland function. **Journal of Dairy Science**, p. 1–13, 2018a. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030218300195>>.

TAO, S. et al. The influences of heat stress on bovine mammary gland function. **Journal of Dairy Science**, p. 1–13, 2018b. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030218300195>>.

TARABA, J. L.; BEWLEY, J. Effects of the Thermal Stress on the. In: IV SIMLEITE, Viçosa, MG, Brazil. **Anais...** Viçosa, MG, Brazil: 2016.

THALER NETO, A. et al. Pontos críticos da qualidade do leite. In: IV Simpósio da Vaca Leiteira, **Anais...** 2017a.

THALER NETO, A. et al. Pontos críticos da qualidade do leite. In: IV Simpósio Nacional da Vaca Leiteira, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: 2017b.

TIAN, H. et al. Integrated metabolomics study of the milk of heat-stressed lactating dairy cows. **Scientific Reports**, v. 6, n. January, p. 1–10, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep24208>>.

TOMAZI, T.; GONÇALVES, J. L.; DOS SANTOS, M. V. Novas perspectivas e conceitos associados com a prevenção e controle da mastite em rebanhos leiteiros: revisão de literatura. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 12, n. 2, p. 18–27, 2014.

TÖPEL, A. **Chemie und Physik der Milch**. 4. ed. Hamburg: Behr's Verlag, 2016.

TREWEEK, T. **Alpha-Casein as a Molecular Chaperone**. [s.l.: s.n.]

TSIOULPAS, A.; GRANDISON, A. S.; LEWIS, M. J. Changes in Physical Properties of Bovine Milk from the Colostrum Period to Early Lactation. **Journal of Dairy**

Science, v. 90, n. 11, p. 5012–5017, 2007. Disponível em:
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030207719690>>.

TSIOULPAS, A.; LEWIS, M. J.; GRANDISON, A. S. Effect of minerals on casein micelle stability of cows' milk. **Journal of Dairy Research**, v. 74, n. 2, p. 167–173, 2007.

WALLAU, M.; VENDRAMINI, J. Methods of forage moisture testing. **UF/IFAS**, v. 2019, p. 1–3, 2019.

WHEELLOCK, J. B. et al. Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows1. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 2, p. 644–655, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030210715071>>.

WILLARD, S. T.; ARTHINGTON, J. D.; BRANDL, T. M. B. S Weating R Ates of D Airy C Ows and. v. 51, n. 6, p. 2167–2178, 2008.

WILLIAMSON, P. The Ups and Downs of Genetic Selection in Dairy Cattle - International Milk Genomics Consortium.

ZIMBELMAN, R. B. et al. A re-evaluation of the impact of temperature humidity index (THI) and black globe humidity index (BGHI) on milk production in high producing dairy cows. **Proceedings of the Southwest Nutrition Conference**, p. 158–169, 2009. Disponível em: <[http://www.wdmc.org/2011/A Re-Evaluation of the Impact of Temperature Humidity Index \(THI\) and Black Globe Humidity Index \(BGHI\) on Milk Production in High Producing Dairy Cows pg 113-126.pdf](http://www.wdmc.org/2011/A Re-Evaluation of the Impact of Temperature Humidity Index (THI) and Black Globe Humidity Index (BGHI) on Milk Production in High Producing Dairy Cows pg 113-126.pdf)>.