CRISTIAN MARLON DE MAGALHÃES RODRIGUES MARTINS

Fatores nutricionais que alteram o desempenho produtivo e a estabilidade do leite, e características sensoriais e reológicas do leite instável pasteurizado

Pirassununga

2019

CRISTIAN MARLON DE MAGALHÃES RODRIGUES MARTINS

Fatores nutricionais que alteram o desempenho produtivo e a estabilidade do leite, e características sensoriais e reológicas do leite instável pasteurizado

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos

De acordo: _____

Orientador

Pirassununga
2019

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3741
FMVZ

Martins, Cristian Marlon de Magalhães Rodrigues
Fatores nutricionais que alteram o desempenho produtivo e a estabilidade do leite, e características sensoriais e reológicas do leite instável pasteurizado / Cristian Marlon de Magalhães Rodrigues Martins. – 2019.
150 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos.

1. Alizarol. 2. Amido. 3. Digestão ruminal. 4. LINA. 5. Processamento de grãos. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Fatores nutricionais que alteram o desempenho produtivo e a estabilidade do leite, e características sensoriais e reológicas do leite instável pasteurizado", protocolada sob o CEUA nº 8085081015 (ID 002018), sob a responsabilidade de **Marcos Veiga dos Santos e equipe; Cristian Marlon de Magalhães Rodrigues Martins** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 11/02/2016.

We certify that the proposal "Nutritional factors that change lactating performance and milk stability, and sensorial and rheological characteristics of unstable milk", utilizing 40 Bovines (40 females), protocol number CEUA 8085081015 (ID 002018), under the responsibility of **Marcos Veiga dos Santos and team; Cristian Marlon de Magalhães Rodrigues Martins** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 02/11/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **Jan/201** a **Dez/201**

Área: **Nutrição E Produção Animal**

Origem:

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **a**

N: **20**

Linhagem: **Holandês**

Peso: **a**

Origem:

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **a**

N: **20**

Linhagem: **Bovinos**

Peso: **a**

Local do experimento:

São Paulo, 26 de dezembro de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MARTINS, Cristian Marlon de Magalhães Rodrigues

Título: Fatores nutricionais que alteram o desempenho produtivo e a estabilidade do leite, e características sensoriais e reológicas do leite instável pasteurizado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a minha família, em especial a minha mãe e meu pai vivo dentro de mim nesta jornada, que mesmo estando distante, mesmo não conseguindo compartilhar de todos os momentos, sempre soube que vocês estavam a pronta espera das viagens para casa para compartilhar grandes momentos, e solícitos em poder ajudar no que fosse preciso!

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi iniciado no ano de 2015 e é produto da ajuda, orientação e apoio de muitas mentes e instituições. Em primeiro lugar, agradeço à Deus, por permitir que pudesse vivenciar todas as experiências, barreiras e desafios nesta jornada.

Agradeço a todos os meus familiares, em especial a minha mãe, e meu papai vivo em minhas lembranças e inspirações, por todo o apoio e demonstrações de amor e determinação. É mais fácil concluir um objetivo quando se tem inspirações na própria casa. Agradeço a minha companheira de longa data (desde a metade do curso de Zootecnia, em Palmeira das Missões), Katiéli Welter, juntos vivenciamos o conceito de sinergia e evolução em meio de tantos desafios superados, e estamos prontos para muitos outros que virão.

Agradeço a Universidade de São Paulo pela excelente estrutura de ensino e corpo docente. Agradeço aos grandes mestres de pós-graduação, em especial ao Prof. Marcos Veiga dos Santos, meu orientador de mestrado, doutorado e também inspiração profissional. Agradecimento especial nesta tese ao Prof. Francisco Rennó, que foi fundamental para realizarmos os trabalhos aqui apresentados, além de todos ensinamentos e experiências compartilhadas.

Agradeço a concessão da bolsa: processo nº 2015/03942-2, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo financiamento do projeto (403469/2013-9).

Agradeço a todos os colegas e amigos do Laboratório Qualileite, muito obrigado por toda ajuda, companheirismo e principalmente, por permitirem dividir grande parte de meus dias com vocês, fazendo muitas coisas parecerem mais fáceis de serem superadas. É com alegria e com sentimento de dever cumprido que escrevo esta tese, mas também com um pesar em pensar que este ciclo se encerra, mas com a esperança de manter contato com todos.

A todos os demais colegas de pós-graduação e amigos que a Universidade de São Paulo me apresentou, meu muito obrigado. Antes de pisar em Pirassununga pela primeira vez (início de 2012), nunca passou pela minha cabeça que construiria uma história com raízes fortes, e que fizeram desta jornada como minha nova casa.

Agradeço também a todos os colegas e amigos que fiz durante minha passagem pela Penn State University. Foi uma passagem relativamente rápida, mas que marcou positivamente minha

vida. Agradeço em especial ao grande amigo Pedro Carvalho, foram 7 meses juntos, mas que se formou um laço forte de amizade, e ao Prof. Dr. Alexander Hristov, que permitiu-me executar este desafio e foi solícito em tudo que precisei.

No que diz respeito ao empenho, ao compromisso, ao esforço, à dedicação, não existe meio termo. Ou você faz uma coisa bem-feita ou não faz.

Airton Senna

As pessoas esperam que eu faça tudo por elas, mas não percebem que elas têm o poder. Você quer um milagre? Seja um milagre!

Todo Poderoso

Procure primeiro compreender, depois ser compreendido

Stephen R. Covey. Os 7 hábitos das pessoas altamente eficazes. 69ª Edição. Editora Best Seller, Rio de Janeiro, 2018.

RESUMO

MARTINS, C. M. M. R. **Fatores nutricionais que alteram o desempenho produtivo e a estabilidade do leite, e características sensoriais e reológicas do leite instável pasteurizado.** [Nutritional factors that change lactating performance and milk stability, and sensorial and rheological characteristics of unstable milk]. 2019. 150 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

Os objetivos do presente estudo foram avaliar o efeito: 1) do processamento do milho e da relação da proteína degradável (PDR) e não degradável (PNDR) no rúmen (PDR:PNDR) sobre o metabolismo digestivo, o desempenho produtivo e a estabilidade do leite; 2) da inclusão tamponante/alcalinizante (TAC) em dietas e substituição parcial de milho moído (MM) por polpa cítrica (PC) sobre o metabolismo digestivo, o desempenho produtivo e a estabilidade do leite; 3) da estabilidade do leite ao teste de estabilidade ao etanol (TEA) sobre a resistência do leite à coagulação durante a pasteurização, análise sensorial e características reológicas durante a vida de prateleira. Para tanto, o presente estudo foi organizado em três experimentos. No experimento 1, 20 vacas da raça Holandesa em lactação foram distribuídas em delineamento do tipo quadrado latino com 5 quadrados contemporâneos, 4 períodos de 21 dias e 4 tratamentos em arranjo fatorial 2×2 : fator 1 - Processamento do milho (MM ou floculado - MF); fator 2 - relação PDR:PNDR (Alta: 107 g de PDR/kg MS e 51 g de PNDR/kg MS ou Baixa: 95 g de PDR/kg MS e 63 g de PNDR/kg MS). No experimento 2, 16 vacas da raça Holandesa em lactação foram distribuídas em delineamento do tipo quadrado latino com 4 quadrados contemporâneos, 4 períodos de 21 dias e 4 tratamentos em arranjo fatorial 2×2 . O fator 1 correspondeu ao tipo de carboidrato não fibroso (CNF) principal da dieta (MM ou substituição parcial do MM por PC) e o fator 2 ao uso de TAC (bicarbonato de sódio associado ao óxido de magnésio). Em ambos experimentos, dos 21 dias de cada período, os primeiros 14 dias foram destinados à adaptação da dieta e os últimos 7 dias à coleta de dados e amostras. No experimento 3, 22 vacas da raça Holandesa em lactação foram distribuídas em dois tratamentos sob delineamento em blocos ao acaso: 1) controle (CO) - balanço cátion-aniônico positivo; e 2) indução à instabilidade do leite - dieta aniônica (DA). Para o processamento de pasteurização, as vacas foram classificadas de acordo com a instabilidade ao

teste do etanol (instável: ≤ 72 e controle: $\geq 80\%$), de modo a compor dois subgrupos de três vacas, cujo leite foi submetido ao processamento ($75^{\circ}\text{C}/20\text{ sec}$). No experimento 1, houve interação entre tipo de processamento do milho e relação PDR:PNDR sobre o CMS ($P = 0,007$), produção de leite ($P = 0,042$), tempo de coagulação durante o aquecimento a 140°C ($P = 0,0291$). Quando as vacas foram alimentadas com MM e baixa relação PDR:PNDR, o CMS, a produção de leite e a estabilidade do leite a 140°C foram maiores em comparação às vacas alimentadas com alta relação PDR:PNDR, sendo que quando o MF foi incluído na dieta não houve efeito da relação PDR:PNDR sobre estas variáveis. As vacas alimentadas com baixa relação PDR:PNDR independentemente do processamento do milho produziram leite com maior estabilidade ao etanol. Por outro lado, a inclusão de MF aumentou a digestibilidade da MS e do amido e a eficiência produtiva. No experimento 2, a inclusão de TAC e a substituição parcial de MM por PC não afetaram a produção e a estabilidade do leite ao etanol, embora a inclusão de PC reduziu o CMS e tendência de reduzir a estabilidade do leite a 140°C . A substituição parcial do MM por PC aumentou o consumo de partículas pequenas ($>4\text{ mm}$) e intermediárias da dieta ($> 8\text{mm}$ e $< 19\text{ mm}$), enquanto reduziu o consumo de água. Nas dietas sem PC e sem TAC houve redução do pH urinário, porém sem alteração da concentração de cálcio iônico do leite. No experimento 3, a utilização de dieta aniônica reduziu o pH urinário (de 8 para 5,8), porém não alterou a estabilidade do leite. Amostras de leite com alta (controle $\geq 80\%$) e baixa ($\leq 72\%$) estabilidade ao TEA resistiram à pasteurização sem formar coágulos visíveis, e, adicionalmente, a viscosidade do leite foi similar para ambos os tratamentos, durante 21 e 42 dias de armazenamento. Em relação à análise sensorial, houve tendência de maior preferência de sabor do leite de baixa estabilidade em relação ao controle. Por fim, não foram observados os efeitos da acidificação ruminal e sanguínea sobre a estabilidade do leite no presente estudo, o leite instável ao etanol 72% pode ser processado sem detrimento das características sensoriais e reológicas em relação ao leite estável ao etanol 80%.

Palavras-chave: Alizarol. Amido. Digestão ruminal. LINA. Processamento de grãos.

ABSTRACT

MARTINS, C. M. M. R. **Nutritional factors that change lactating performance and milk stability, and sensorial and rheological characteristics of unstable milk.** [Fatores nutricionais que alteram o desempenho produtivo e a estabilidade do leite, e características sensoriais e reológicas do leite instável pasteurizado]. 2019. 150 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

The goals of present study were to evaluate the effect of: 1) RDP:RUP ratio and corn processing on digestive metabolism, lactating performance and milk stability; 2) inclusion of buffering/alkalinizing (BA) and partial replacement of ground corn (GC) with citrus pulp (CP) pellets on digestive metabolism, lactating performance and milk stability; 3) Milk ethanol stability (MES) on resistance to form clots during pasteurization processing, sensorial perceptions and rheological properties during shelf life. In order to attend the aims of this study, it was organized into 3 trial. In trial 1, 20 Holstein cows were distributed in a Latin Square design with 5 contemporaneous squares, 4 periods of 21 d and 4 treatments in a factorial arrangement of treatments 2×2 : factor 1 – Corn processing (GC or steam flaked - SF); factor 2 – RDP:RUP ratio (High: 107 g RDP/kg DM and 51 g RUP/kg DM or Low: 95 g RDP/kg DM and 63 g RUP/kg DM). In trial 2, 16 Holstein cows were distributed in a Latin Square design with 4 contemporaneous squares, 4 periods of 21 d and 4 treatments in a factorial arrangement of treatments 2×2 : factor 1 was the partial or not replacement of GC with CP pellets; and factor 2 was the inclusion or not of BA (sodium bicarbonate associate with magnesium oxide). In both trials, 14 d out of 21 d were used for diet adaptation and the last 7 d for sampling. In trial 3, it was used 22 Holstein cows distributed in a randomized block design, where they were distributed into 2 treatments: 1) Control – Positive cation-anion balance; 2) Instability induction – anionic diet. For milk pasteurization (75° C/ 20 sec), 3 animals from each group were selected in order to make 2 subgroups according to stability at ethanol test (unstable: ≤ 72 and Control: $\geq 80\%$). The results of trial 1 showed interaction between RDP:RUP ratio and corn processing on DMI ($P = 0.007$), milk yield (MY; $P = 0,042$), milk coagulation time (HCT) at 140°C ($P = 0,029$). When cows were fed with GC, the DMI, MY and HCT increased for low RDP:RUP ratio compared to high RDP:RUP ratio, and when the starch source were SF corn there was no effect of RDP:RUP ratio on these outcomes. The milk

stability at ethanol increased with low RDP:RUP ratio, independently of corn processing. In another hand, SF corn increased DM and starch digestibility and productivity efficiency. In the trial 2, the inclusion of BA and partial replacement of GC with CP did not change production and milk stability at ethanol test, although the inclusion of CP reduced DMI and showed tendency of reduction of milk heat stability at 140°C. The partial replacement of GC with CP increased the intake of low (<1.18 mm) and intermediated (> 8mm and < 19mm) particles, and reduced water intake, while diets without citrus pulp and without BA reduced the urinary pH, but not the milk concentration of ionic calcium. In the trial 3, the using of anionic diet decreased the urinary pH (from 8 to 5.8), but did no change the milk stability. Milk with high (control $\geq$ 80%) and low ($\leq$ 72%) MES resisted the pasteurization without forming clots, and, additionally, milk viscosity was the same for both groups during 21 d and 42 d of storage. For sensorial analysis, there was a tendency of unstable milk show more preference of flavor in relation to control group. Thus, the effects of ruminal and blood acidification on milk stability were not observed in our study, and unstable milk at ethanol 72% can be processed without negative effect on sensorial and rheological properties in relation to milk stable at ethanol 80%.

Key-words: Alizarin. Starch. Ruminal digestion. UNAM. Grain processing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Relação entre produção de leite e PB de dietas avaliadas em 112 experimentos com variação do consumo de matéria seca de 10 a 30 kg/dia. Fonte: Adaptado de Ipharraguerre e Clark, 2005.	25
Figura 2 - Figura esquemática do modelo clássico de submicelas de caseína	41
Figura 3 - Figura esquemática do modelo de nano-agregados (caseínas são conectadas ao fosfato de cálcio para formar o nano-agregado, que por sua vez conectam-se com outros nano-agregados para formar a micela) e modelo clássico de submicelas de caseína	42
Figura 4 - Leite normal e com diversos "graus" de coagulação de proteínas pelo teste do etanol	44
Figura 5 - Principais fatores associados com a estabilidade do leite ao teste do álcool.....	46
Figura 6 - Esquema de coagulação do leite bovino ao teste do etanol resultante do aumento da concentração de cálcio iônico do leite	47
Figura 7 - Efeito do processamento do milho e da relação PDR:PNDR sobre a concentração de ureia sanguínea antes (T0) e 4 horas após a alimentação (T4).....	86
Figura 8 - Planta piloto de pasteurização e envase: A) Trocador de calor em placas (figura à esquerda); B) Cabine de segurança de fluxo de ar vertical (imagem do centro); C) seladora por indução (imagem à direita da figura).....	134
Figura 9 - Embalagem selada com seladora por indução e armazenamento do leite pasteurizado à 0,5° C, protegida da luz ambiente.....	135
Figura 10 - Determinação da viscosidade aparente do leite com um viscosímetro digital programável (Brookfield, modelo DV-II+), utilizando-se sonda cilíndrica n 4 e velocidade de 50 rpm.....	137
Figura 11 - Efeito das dietas (acidogênica e não-acidogênica) sobre o pH urinário de vacas leiteiras em lactação	140
Figura 12 - Produção de leite de acordo com dieta (acidogênica e não-acidogênica) e os dias de experimento	140
Figura 13 - Viscosidade aparente do leite pasteurizado e armazenada durante 42 dias de acordo com a estabilidade ao teste do etanol realizada antes do processamento	143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valor biológico de diferentes fontes proteicas utilizadas na alimentação animal (Santos et al., 1998)	27
Tabela 2 - Recomendações de fibra e CNF na dieta de vacas leiteiras considerando dietas totalmente misturadas	30
Tabela 3 - Efeito do dia relativo ao parto sobre a ocorrência de acidose ruminal subaguda em vacas primíparas da raça Holandesa (Penner et al., 2007)	36
Tabela 4 - Proporção de ingredientes e composição bromatológica das dietas para vacas leiteiras	73
Tabela 5 - Efeito do processamento do milho e da relação PDR:PNDR sobre o consumo, digestibilidade, produção, composição e estabilidade do leite de vacas leiteiras.....	81
Tabela 6 - Efeito do processamento do milho e da relação PDR:PNDR sobre o perfil de subunidades de caseínas e teor de proteínas do soro	83
Tabela 7 - Efeito do processamento do milho e da relação PDR:PNDR sobre os índices de DP e eficiência de utilização do N da dieta de vacas leiteiras em lactação.....	84
Tabela 8 - Efeito do processamento do milho e da relação PDR:PNDR sobre variáveis sanguíneas de vacas leiteiras	85
Tabela 9 - Proporção de ingredientes e composição bromatológica das dietas para vacas leiteiras	107
Tabela 10 - Efeito da substituição parcial de milho moído por polpa cítrica (PC) e inclusão de tamponante/alcalinizante (TAC) sobre o consumo, digestibilidade de nutrientes e desempenho produtivo em vacas da raça Holandesa.....	111
Tabela 11 - Efeito da substituição parcial de milho moído por polpa cítrica (PC) e da inclusão de tamponante/alcalinizante (TAC) sobre o comportamento ingestivo de vacas leiteiras	112
Tabela 12 - Efeito da substituição parcial de milho moído por polpa cítrica (PC) e inclusão de tamponante/alcalinizante (TAC) sobre o índice de seleção de partículas da dieta de vacas leiteiras em lactação.....	113
Tabela 13 - Efeito da substituição parcial de milho moído por polpa cítrica (PC) e inclusão de tamponante/alcalinizante (TAC) sobre o pH urinário e metabolismo ruminal	115

Tabela 14 - Proporção de ingredientes e composição bromatológicas das dietas para vacas leiteiras	132
Tabela 15 - Composição do leite instável ou controle destinados ao processamento de pasteurização	133
Tabela 16 - Contagem de microrganismos do leite antes e após apasteurização, de acordo com a estabilidade ao etanol.....	136
Tabela 17 - Efeito das dietas sobre a composição e estabilidade do leite	141
Tabela 18 - Avaliação sensorial do leite estável ao teste do etanol 80% ou instável ao teste do etanol 72%	142
Tabela 19 - Intenção de compra (%) do leite estável ao teste do etanol 80% ou instável ao teste do etanol 72%, realizada com 112 avaliadores não treinados	142

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1. BALANCEAMENTO DE PROTEÍNA EM DIETAS DE VACAS LEITEIRAS	23
2.2. BALANCEAMENTO DE CARBOIDRATOS NÃO FIBROSOS NA DIETA DE VACAS LEITEIRAS	30
2.3. ACIDOSE E TAMPONANTES	35
2.4. PROTEÍNAS DO LEITE	38
2.4.1. Estabilidade das proteínas do leite	43
2.4.2. Leite Instável Não Ácido (LINA)	46
REFERÊNCIAS	57
3 EFEITO DA RELAÇÃO PDR:PNDR E DO TIPO DE PROCESSAMENTO DO MILHO SOBRE O METABOLISMO DIGESTIVO, DESEMPENHO PRODUTIVO E ESTABILIDADE DO LEITE BOVINO	66
3.1 RESUMO	66
3.2 ABSTRACT	67
3.3 INTRODUÇÃO	68
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	70
3.5 RESULTADOS	80
3.6 DISCUSSÃO	86
3.7 CONCLUSÃO	97
REFERÊNCIAS	98
4 INCLUSÃO DE POLPA CÍTRICA E DE TAMPONANTE/ALCALINIZANTE NA DIETA DE VACAS LEITEIRAS NÃO ALTERAM A ESTABILIDADE DO LEITE	103
4.1 RESUMO	103
4.2 ABSTRACT	104
4.3 INTRODUÇÃO	105
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	106
4.5 RESULTADOS	109

4.6 DISCUSSÃO	115
4.7 CONCLUSÃO	121
REFERÊNCIAS	122
5 CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS E REOLÓGICAS DO LEITE INSTÁVEL NÃO-ÁCIDO PASTEURIZADO	127
5.1 RESUMO	127
5.2 ABSTRACT	128
5.3 INTRODUÇÃO	129
5.4 MATERIAL E MÉTODOS	131
5.5 RESULTADOS	139
5.6 DISCUSSÃO	140
5.7 CONCLUSÃO	146
REFERÊNCIAS	146
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	149

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda por maior qualidade e segurança do leite cru durante a produção primária, impõem maiores exigências aos produtores de leite. Do ponto de vista higiênico/sanitário e industrial, segundo a Instrução Normativa N° 76 (IN 76) (BRASIL, 2018) o leite deve ter limites máximos de contagem padrão em placa (CPP < 300 mil UFC/mL) e de contagem de células somáticas (CCS < 500 mil cél/mL), e estabilidade ao teste do etanol (mínima de 72% v/v) para poder ser considerado adequado para o processamento industrial.

O teste de estabilidade ao etanol (TEA) ou Teste do Alizarol tem sido realizado, rotineiramente, antes da coleta de leite nas fazendas e na plataforma de recebimento de leite nos laticínios, com o objetivo de estimar a acidez e a estabilidade térmica do leite. A estabilidade do leite refere-se à capacidade relativa das proteínas do leite resistirem ao processamento térmico industrial (estabilidade térmica) ou à reação com o etanol (estabilidade do leite ao etanol) sem sofrer coagulação (FISCHER et al., 2012). A utilização do TEA para avaliação da estabilidade do leite cru iniciou no quarto trimestre do século XIX, e uma série de estudos laboratoriais mostraram que, do total de 90 amostras analisadas, 45 coagularam no TEA. Destas 45 que coagularam, 43 apresentaram evidências de coagulação durante o processamento de evaporação e esterilização do leite à 112,8°C, enquanto que das 45 que não coagularam no TEA, apenas 3 apresentaram problemas de coagulação durante o processamento (DAHLBERG e GARNER, 1921), evidenciando a importância da implementação do TEA como rotina na avaliação da qualidade do leite cru para o processamento. No entanto, outros estudos demonstraram que apenas metade das amostras que coagularam no TEA apresentaram algum problema durante a condensação e evaporação do leite, sugerindo que não haveria um teste rápido capaz de identificar adequadamente amostras de leite impróprias para o processamento (RAMSDELL et al., 1931). Com os resultados controversos, o TEA entrou em desuso nos EUA e Europa, mas ainda é utilizado em muitos países, como o Brasil, principalmente por ainda não haver um teste substituto rápido, de fácil interpretação e com maior acurácia para estimar a estabilidade térmica durante o processamento (HORNE, 2016).

A estabilidade térmica e ao teste do etanol diminui de acordo com o aumento de acidez do leite, ou pode alterar de acordo com fatores ambientais, genéticos e nutricionais das vacas leiteiras.

As alterações de estabilidade do leite sem aumento de acidez foram denominadas de leite instável não ácido (LINA) (ZANELA et al., 2006; FISCHER et al., 2012). O consumo de LINA não representa risco à saúde humana, mas há limitação durante o processamento industrial em razão da provável menor resistência térmica. Na última década, foi descrito no Brasil elevada ocorrência de leite instável sem acidez, o que resultou em grandes prejuízos a todos os elos da cadeia agroindustrial do leite, pois o LINA não é captado ou então o produtor recebe uma penalização no pagamento (ZANELA et al., 2006; MARQUES et al., 2007; FISCHER et al., 2012). A instabilidade do leite é um fenômeno multifatorial, que pode ser influenciada pela acidez do leite, pH, composição das micelas de caseínas, concentração de cálcio iônico, força iônica e equilíbrio salino do leite (NEGRI et al., 2001). Em estudos prévios, o principal componente lácteo associado negativamente com a estabilidade das proteínas do leite foi o cálcio iônico (Cai; MARQUES et al., 2011; MARTINS et al., 2015). De acordo com Barros et al. (1999), o aumento da concentração de Cai do leite pode reduzir as cargas negativas das micelas de caseínas e a força de repulsão eletrostática entre elas, o que favorece a formação de coágulos durante o contato com o etanol e/ou durante o tratamento térmico. Outros fatores também foram associados com a instabilidade do leite, como

O teor de Cai do leite aumenta em resposta à acidificação sanguínea resultante da redução do balanço cátion-aniônico da dieta das vacas (MARQUES et al., 2011; MARTINS et al., 2015a) ou da acidose ruminal (PONCE e HERNANDES, 2005). A acidificação sanguínea, em resposta à redução do balanço cátion-aniônico da dieta (BCAD), aumenta a concentração láctea de Cai e reduz a estabilidade do leite (MARQUES et al., 2011; MARTINS et al., 2015a). Além disso, a incidência de LINA foi maior em períodos de baixa disponibilidade de pastagens (ZANELA et al., 2006; MARQUES et al., 2007), ou por restrição da oferta de alimentos às vacas leiteiras (BARBOSA et al., 2012; STUMPF et al., 2013). A restrição alimentar severa pode aumentar a permeabilidade do epitélio mamário, o que pode facilitar a passagem de íons para o leite e reduzir a estabilidade das proteínas lácteas (STUMPF et al. (2013).

No entanto, amostras de LINA apresentaram maior concentração de β -caseína e menor de κ -caseína, quando comparada amostras de leite estável (BARBOSA et al. 2012). A κ -caseína é a única subunidade da micela de caseína que é hidrofílica e estável ao cálcio, e desta forma, protege o interior hidrofóbico (composto por α e β -caseína) do contato com a água e da ionização com o cálcio. De acordo com Li et al. (2014), a expressão das subunidades de caseínas do leite depende

da disponibilidade ruminal da proteína e do amido, porém não foram avaliados os efeitos de outros fatores nutricionais sobre a estabilidade do leite. Desta forma, ainda não foram avaliados como os efeitos de fatores nutricionais alteraram, de forma isolada ou por interações, a estabilidade do leite. São escassos os estudos sobre o efeito da disponibilidade ruminal de carboidratos e de proteínas sobre a concentração láctea de cálcio iônico, das subunidades de caseína e estabilidade do leite ao etanol e ao aquecimento térmico.

Alguns estudos avaliaram o efeito da restrição alimentar (ZANELA et al., 2006; BARBOSA et al., 2012; STUMPF et al., 2013) e do uso de dietas aniônicas (MARQUES et al., 2011) sobre a estabilidade do leite ao etanol e ao aquecimento a 140°C (MARTINS et al., 2015). Porém, foram usados modelos experimentais em condições extremas de deficiência nutricional ou de distúrbios metabólicos, o que difere das situações encontradas nos sistemas de produção (MARQUES et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011; FISCHER et al., 2012). O modelo experimental do presente estudo visou avaliar diferentes fatores nutricionais que foram previamente associados com a acidificação sanguínea (tipo de carboidrato não fibroso – CNF e inclusão de tamponantes/alcalinizantes na dieta) ou com a concentração de proteínas lácteas (digestão ruminal de carboidratos e proteínas), os quais podem alterar a estabilidade do leite ao etanol e ao aquecimento térmico.

Por fim, a maioria dos estudos sobre estabilidade do leite utilizou o TEA como método para estimar a estabilidade térmica do leite. No entanto, o TEA apresenta acurácia limitada, o que dificulta o uso de resultados de estudos baseados apenas na estabilidade ao etanol para definir medidas de correção (MOLINA et al., 2001; CHAVES et al., 2004; FISCHER et al., 2012; MARTINS et al., 2015a). Fischer et al. (2012) relataram que amostras de LINA (instáveis ao etanol ≥ 76 %) são estáveis ao teste da fervura e aos processamentos de ultra alta temperatura (UAT). Desta forma, a avaliação de acurácia e precisão do teste do etanol em diferentes graduações alcoólicas, bem como possíveis métodos alternativos associados com a estabilidade da micela de caseína, podem aumentar a confiabilidade para a tomada de decisão sobre aceitação ou rejeitar do leite de acordo com a estabilidade.

Atualmente, as indústrias de laticínios utilizam concentrações de etanol no TEA maiores que os recomendados na IN 76/2018 (de 72% para até >80%), com o objetivo de aumentar a estabilidade térmica do leite captado e reduzir problemas de tempo de prateleira dos derivados lácteos (FISCHER et al., 2012). No entanto, são escassos os estudos que avaliaram a estabilidade

ao etanol mínima necessária para garantir adequado processamento térmico. Adicionalmente, ainda não há estudos sobre os efeitos da estabilidade do LINA ao etanol sob diferentes graduações alcoólicas e sobre o tempo de prateleira dos produtos lácteos processados por pasteurização e UAT. O aumento da concentração de Cai do leite pode potencializar as interações entre β -lactoglobulina e κ -caseína (SINGH e FOX, 1987; MARTINS et al., 2015a), resultando na formação de complexos proteicos, que podem, posteriormente, se dissociar da micela e contribuir para o processo de gelificação do leite longa vida (UAT) durante a estocagem (McMAHON, 1996).

Desta forma, as hipóteses testadas no presente estudo foram as seguintes:

1) A digestibilidade ruminal do amido e a relação de proteína degradável (PDR) / e não degradável (PNDR) no rúmen alteram a síntese de proteína microbiana e de proteína metabolizável, afetam a disponibilidade de aminoácidos para síntese de caseína, e consequentemente, a estabilidade do leite ao etanol e ao aquecimento térmico;

2) A inclusão de tamponante/alcalinizante reduz a acidificação ruminal e a concentração de cálcio iônico do leite,, especialmente em dietas com elevado teor de carboidratos não fibrosos (CNF), e consequentemente, aumenta a estabilidade do leite ao teste do etanol e ao aquecimento térmico;

3) O leite instável ao etanol 72% apresenta estabilidade térmica ao processamento de pasteurização, porém tem menor tempo de prateleira quando comparado ao leite estável ao etanol 80 %.

1.1. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

Para testar as hipóteses propostas, o objetivo geral do presente estudo foi avaliar os efeitos de fatores nutricionais (processamento de milho e relação de PDR:PNDR, fonte principal de CNF e inclusão de tamponante/alcalinizante na dieta) sobre a produção, a composição e a estabilidade do leite, e características sensoriais e reológicas do leite instável pasteurizado. Para tanto, o presente estudo foi organizado em três experimentos, com objetivos específicos de avaliar:

Experimento 1: o efeito da relação PDR:PNDR e do processamento do milho sobre o metabolismo digestivo, produção, composição e a estabilidade do leite bovino.

Experimento 2: o efeito da substituição parcial do milho moído (MM) por polpa cítrica peletizada (PLC) e da inclusão de tamponante/alcalinizante (TAC) sobre o metabolismo digestivo e a composição e a estabilidade do leite bovino.

Experimento 3: a) o efeito da acidose metabólica induzida pelo uso de dieta acidogênica em vacas em lactação sobre a composição e a estabilidade do leite; b) a concentração de etanol mínima no TEA adequada ao processamento de pasteurização; c) o efeito da estabilidade do leite ao teste do etanol sobre as características sensoriais e reológicas do leite pasteurizado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. BALANCEAMENTO DE PROTEÍNA EM DIETAS DE VACAS LEITEIRAS

O balanceamento de proteína em dietas de vacas leiteiras não é tema “novo” na formulação de dietas, mas ainda é o foco de muitas pesquisas sobre sistemas de formulação proteica mais eficientes no uso do nitrogênio (N) dietético. Desde a publicação do NRC (2001), a formulação proteica de vacas leiteiras é baseada no atendimento de exigências de proteína metabolizável (PM), a partir das estimativas de síntese de proteína microbiana (Pmic), proteína não degradável no rúmen (PNDR) digestíveis no intestino e fração endógena. Para estimar a PM, o NRC (2001) define que a Pmic contém 20% de ácidos nucleicos e 80% de digestibilidade, de modo que a contribuição de Pmic para a proteína metabolizável deve ser multiplicada por 0,64 (0,8 de aminoácidos $\times$ 0,8 de digestibilidade), enquanto que a digestibilidade da PNDR é estimada em 80%.

O modelo do NRC (2001) estima a síntese de proteína microbiana (SPM) em kg/d a partir do teor de nutrientes digestíveis totais (NDT): $0,13 \times \text{consumo de NDT em kg/d}$. Adicionalmente, o NRC (2001) estabelece um ajuste para a SPM a partir da proteína degradável no rúmen (PDR), quando PDR é 1,18 vezes menor que a estimativa de síntese de Pmic, em que $Pmic = 85\%$ do consumo de PDR, e não mais 13% do consumo de NDT. De forma semelhante, o modelo do Agricultural Research Council (ARC, 1980) estima o total de nitrogênio microbiano (TNM) baseado no nitrogênio degradável no rúmen (NDR), de acordo com a equação: $TNM = NDR \times 0,80 \times 0,70 \times 0,75$. De acordo com o ARC (1980), a exigência de NDR pode ser estimada pela equação: $NDR = EM_L \times 0,06418 \times 0,65 \times 30 \times 1$, ou simplesmente $1,25 \times ME_L$ (energia metabolizável de lactação). De outra forma, a solução 1 do modelo da Universidade de Cornell - Cornell Net Carbohydrate and Protein System (TEDESCHI et al., 2015) utiliza a FDN e o tamanho de partícula (FDN fisicamente efetiva = FDNfe) para estimar o pH ruminal e a síntese de proteína microbiana: $Pmic = NDTd \times CMS \times 0,13 \times 0,64 \times f(FDNfe) \times PNDRd \times PB \times CMS \times 0,8$, em que $f(FDNfe) = [1 - (20 - FDNfe) \times 0,025]$, onde o 100% de SPM será possível se $FDNfe \geq 20\%$. Apesar dos modelos mais complexos de estimativa de síntese de proteína microbiana parecerem mais confiáveis, segundo Galyean e Tedeschi (2014) modelos mais complexos do que simplesmente estimar a SPM a partir do NDT pouco contribuem para a acurácia desta estimativa.

Isto se deve à complexidade de interações que ocorrem no rúmen e que afetam a síntese de proteína microbiana, bem como da quantidade e qualidade dos aminoácidos disponíveis para a absorção intestinal. A complexidade destes fatores limitaram os avanços na nutrição proteica de ruminantes, de modo que pesquisas ainda tentam definir estratégias nutricionais que justifiquem o uso de alguns aminoácidos protegidos na dieta, como lisina, metionina e histidina, que atualmente são considerados os três aminoácidos mais limitantes para a produção de leite, respectivamente (LEE et al., 2012).

De acordo com Ipharraguerre e Clark (2005), o teor ótimo de PB da dieta para produção de leite de 30-40 l/d varia de 16 – 16,5% da dieta (com base na matéria seca, MS) (Figura 1). Quando em excesso, especialmente de PDR, há aumento de excreção de nitrogênio não proteico no leite (nitrogênio ureico do leite – NUL), urina e fezes, resultando em aumento de gasto energético e menor eficiência de uso do nitrogênio dietético.

Broderick e Reynal (2009) avaliaram efeito de PDR (0, 1,2, 2,4 e 3,7% de PDR na MS) em dietas de vacas leiteiras com 10.5% de PDR na MS, oferecidos pela inclusão de ureia na dieta. Os resultados indicaram redução linear no CMS, bem como, da produção de leite e de componentes (gordura, proteína e sólidos não gordurosos) com a inclusão de PDR a partir de ureia. Adicionalmente, quanto maior a inclusão de ureia como fonte de PDR na dieta maior a excreção de N-ureico na urina e no leite, bem como, a concentração de N-amoniaco no rúmen e de ureia sanguínea.

Figura 1 - Relação entre produção de leite e PB de dietas avaliadas em 112 experimentos com variação do consumo de matéria seca de 10 a 30 kg/dia. Fonte: Adaptado de Ipharraguerre e Clark, 2005.

Em média, apenas 25% do nitrogênio ingerido pelas vacas leiteiras é secretado como proteína verdadeira no leite, sendo o restante excretado no ambiente. Nas dietas com teor de PDR acima do necessário para otimização da síntese de proteína microbiana há redução da produção de leite e de proteína verdadeira do leite pela deficiência de proteína metabolizável, que seria suprida pela PNDR, bem como da eficiência de uso do N dietético; prejudicando a eficiência econômica e sustentável dos sistemas de produção. Desta forma, na última década, diversas pesquisas objetivaram aumentar a eficiência de uso do nitrogênio dietético, sem redução do desempenho produtivo por meio da otimização da síntese de Pmic e/ou da suplementação com fontes de PNDR ou de aminoácidos específicos protegidos da fermentação ruminal (BRODERICK et al., 2009; LEE et al., 2012; DANES et al., 2013).

O teor de PB no concentrado (8,7%, 13,4% e 18,1% de PB) de vacas com produção de 19 l/leite/d, em sistema de pastejo não afetou o CMS, a produção de leite e teores de gordura e proteína bruta do leite (DANES et al., 2013). De forma semelhante, não houve efeito de dois teores de PB (13 vs 14,8% da MS) em dietas com grão de soja ou farelo de algodão como principais fontes proteicas e cana-de-açúcar como volumoso sobre a produção e a composição do leite, e o balanço diário e a eficiência de utilização do N dietético para a produção de leite (g N leite/g N consumido) Migliano et al. (2015). Estes resultados sugerem a adequação de dietas com 13% de PB na MS

para vacas leiteiras com produção \ média de 19 l/d, sem ocorrer redução na produção e na composição do leite, o que representa 1,3 % a menos de PB na dieta, de acordo com as recomendações do NRC (2001).

De forma semelhante, Jesus et al. (2012) estudaram a utilização de farelo de soja ou ureia como principais fontes proteicas da dieta em associação a dois níveis dietéticos de PB, baixo (14,2% de PB / kg de MS) ou alto (15,6% de PB/kg de MS), em vacas alimentadas com cana de açúcar como volumoso exclusivo da dieta. Como resultados, não houve efeito de fonte, teor e interação sobre a produção de leite, produção de leite corrigida e produção diária de proteína, gordura e lactose. Estes resultados indicam que em dietas de vacas leiteiras produzindo em média 19 l/d, a redução do teor de PB da dieta não limitou a síntese de proteína microbiana, sendo esta a principal fonte de proteína metabolizável para vacas com este nível de produção de leite (NRC, 2001).

A contribuição relativa de PNDR sobre a proteína metabolizável deve ser aumentada de acordo com o aumento de produção de leite, uma vez que somente a proteína microbiana não atenderia as exigências de proteína metabolizável. O aumento de PDR acima da capacidade de utilização pelos microrganismos ruminais acarreta maior excreção de N pela urina ou como nitrogênio ureico do leite (NUL) (SANTOS et al., 1998; SANTOS, 2006). Em revisão de literatura, foi estabelecido que 11,4 mg/dl de NUL é o ponto ótimo que indica otimização do metabolismo microbiano ruminal, sendo que limites acima deste valor podem indicar excesso de PDR ou baixa digestibilidade ruminal dos carboidratos (NOUSIAINEN, SHINGFIELD e HUHTANEN, 2004).

É possível aumentar a eficiência de uso do nitrogênio dietético em vacas leiteiras com produção >35 l/d, pela otimização da SPM associada à suplementação com fontes de PNDR ou de aminoácidos essenciais protegidos (lisina, metionina, e mais recentemente, histidina). Por exemplo, a produção de leite e de proteína aumentou quando a PB da dieta foi reduzida de 18,3% para 17,3% e 16,1% em dietas com suplementação de metionina protegida (BRODERICK et al., 2008). No entanto, a redução da PB da dieta para 14,8% reduziu a produção de leite, produção de leite corrigida para gordura (PLC) e produção de gordura. Desta forma, a suplementação com fontes de PNDR ou metionina protegida aumentam a produção de leite (SCHMIDT et al., 1999), bem como o conteúdo de proteína verdadeira do leite (ARMENTANO et al, 1997; BERTHIAUME et al., 2006; BRODERICK et al., 2008; BRODERICK et al., 2009), desde que a síntese de proteína microbiana não seja limitada por este processo.

Dentre as fontes de proteína que chegam ao intestino delgado de vacas leiteiras, a PM é a que apresenta o perfil de aminoácidos mais próximo ao perfil da proteína do leite (SANTOS et al., 1998). Desta forma, na nutrição proteica de vacas leiteiras, o principal objetivo é otimizar a síntese de proteína microbiana, sendo o excedente necessário para atender à exigência de proteína metabolizável atendida por fontes de PNDR ou de aminoácidos limitantes, como metionina ou histidina (LEE et al, 2012). Das fontes de PNDR disponíveis para uso em dietas de vacas leiteiras, os derivados de soja submetidos ao tratamento térmico (como o farelo de soja “protegido”) apresentam maior teor de aminoácidos essenciais na PB, quando comparado a outras fontes de PNDR, como glúten de milho e resíduos de cervejaria (Tabela 1).

Tabela 1 - Valor biológico de diferentes fontes proteicas utilizadas na alimentação animal

	His	Fen	Leu	Tre	Met	Arg	Val	Ile	Trp	Lis
F. Sangue	100*	100	93	86	45	33	70	10	76	91
F. Peixe	77	69	58	68	100	59	59	47	71	80
F. Carne	67	65	46	59	49	76	51	36	39	58
FGM	67	100	100	60	100	36	48	40	30	18
F. Alfafa	69	100	55	80	60	50	66	51	100	46
R. Destilaria	74	84	72	63	81	42	53	38	45	24
F. Soja	89	100	56	74	56	89	60	55	75	70
P. Microbiana	90	97	54	100	97	79	66	61	99	100

*Percentual do aminoácido na proteína do alimento em relação proteína do leite. Fonte: Adaptado de Santos et al. (1998).

Broderick et al (2009) estudaram o efeito do teor de PB e da suplementação com PNDR (SoyPlus, West Central Coop, Ralston, IA) e metionina protegida (Mepron®, Degussa Corp., Kennesaw, GA) sobre o desempenho produtivo de vacas leiteiras com média de 40 L/d, em arranjo fatorial de tratamentos $2 \times 2 \times 2$, nos quais os fatores foram os seguintes: teor de PB (15,8% ou 17,1% da MS), inclusão de PNDR (5% da MS) e inclusão de metionina protegida (0,06% da MS). Como resultado, não houve efeito de interação entre os fatores, mas o aumento do teor de PB da dieta aumentou o CMS em 1,1 kg/d, a produção de leite em 1,7 kg/d, produção de leite corrigida para 3,5% de gordura em 2,2 kg/d, a produção de gordura em 0,10 kg/dia e a produção de proteína verdadeira em 0,05 kg/d, quando comparada com a utilização de dietas com 15,8% de PB. Além

disso, a suplementação com PNDR e com metionina protegida aumentaram a produção de leite corrigida e a produção diária de gordura, e houve tendência de aumento da síntese de proteína do leite.

Cyrioc et al. (2008) avaliaram o efeito da redução do teor de PDR (11,3, 10,1, 8,8, ou 7,6% da MS) com suplementação constante de PNDR (7,1% da MS) sobre o desempenho produtivo de vacas leiteiras em estágio intermediário de lactação. A redução do teor de PDR, de 11,3% para 7,6%, reduziu linearmente o CMS, o que resultou em tendência de menor produção de leite para vacas alimentadas com o menor teor de PDR. Por outro lado, o teor de PDR da dieta não alterou os teores de proteína, lactose e gordura do leite, enquanto que o nitrogênio ureico do leite reduziu linearmente com a redução do teor de PDR da dieta. A eficiência de utilização do N dietético para a produção de leite aumentou de 27,7% na dieta com 11,3% de PDR para 38,6% para a dieta com 7,6% de PDR. Estes resultados sugerem que as recomendações do NRC (2001) de PDR estão superestimadas, especialmente de vacas com elevada produção de leite (> 30 L/d) e maior consumo de nutrientes quando comparadas às vacas de menor produção (CYRIOIC et al., 2008).

Os efeitos da suplementação com fontes de PNDR ou de aminoácidos essenciais variam de acordo com o nível de consumo e produção de leite, ingredientes utilizados, nível de inclusão e estágio de lactação das vacas. A suplementação com PNDR geralmente apresenta resultados positivos em vacas com produção de leite ≥ 3 vezes a manutenção, especialmente em estágio inicial de lactação, desde que a síntese de proteína microbiana não seja limitada por deficiência de PDR (SANTOS et al., 2006; BRODERICK et al., 2009). Adicionalmente, a suplementação com aminoácidos essenciais específicos aumenta o desempenho produtivo de vacas em lactação alimentadas com dietas deficientes em proteína metabolizável. Lee et al. (2012) estudaram a suplementação com lisina e metionina ou lisina, metionina e histidina em dietas deficientes em proteína metabolizável para vacas leiteiras. A produção de leite (38,5 L/d) das vacas suplementadas com lisina, metionina e histidina em dietas deficientes em proteína metabolizável (balanço de -317 g/d) foi semelhante à produção de leite (38,8 L/d) das vacas que receberam dietas com adequado aporte de proteína metabolizável (dieta controle; balanço de $+9$ g/d) de acordo com o NRC (2001). Por outro lado, as vacas alimentadas com dietas deficientes em proteína metabolizável sem a suplementação com aminoácidos protegidos produziram em média 3,6 L/d a menos que a dieta controle. Entretanto, as vacas alimentadas com dietas deficientes em proteína metabolizável com suplementação apenas de lisina e metionina apresentaram produção de leite intermediária (36,9

L/d), sem diferir da produção de leite das vacas alimentadas com a dieta controle (38,2 L/d) e das vacas alimentadas com dieta deficiente em proteína metabolizável com suplementação de lisina, metionina e histidina. Estes resultados sugerem que a deficiência de proteína metabolizável é causada principalmente por aminoácidos específicos, como lisina, metionina e/ou histidina.

O farelo de soja, principal fonte proteica de dietas de vacas leiteiras, geralmente apresenta adequado teor de lisina e moderado de histidina, mas a metionina é o primeiro aminoácido limitante para a produção de leite (SANTOS et al., 1998; SANTOS, 2007). De acordo com o NRC (2001), a concentração de metionina e histidina na proteína do leite é de 5,5% para ambos aminoácidos. Desta forma, a recomendação do teor de histidina na proteína metabolizável é semelhante à de metionina. No entanto, a relação metionina:histidina da proteína microbiana pode variar de 1,14 a 1,3 (STORM e ORSKOV 1983; CLARK et al., 1992). De forma similar, Schwab et al. (2005) e Huhtanen et al. (2002) descreveram que a proteína microbiana apresenta 25% a 30% menos histidina do que metionina, enquanto que Czerkawski (1976) descreveu 50% menos histidina do que metionina na proteína microbiana. Desta forma, quando a proteína microbiana é que mais contribui com aminoácidos da proteína metabolizável, a histidina pode ser considerada o primeiro aminoácido limitante.

Duas meta-análises (PATTON, 2010; ROBINSON, 2010) avaliaram a suplementação com lisina e metionina em dietas de vacas leiteiras com adequado aporte de proteína metabolizável, no entanto, não houve efeito da suplementação sobre o desempenho produtivo. Desta forma, os efeitos da suplementação de aminoácidos protegidos em dietas de vacas leiteiras em lactação são marginais ou inexistentes sobre o desempenho produtivo de vacas alimentadas com dietas balanceadas para proteína metabolizável. Diversos estudos avaliaram os efeitos isolados do teor de proteína (BRODERICK et al., 2009; JESUS et al., 2012; MIGLIANO et al., 2015), da suplementação com fontes de PNDR (CYRIO et al., 2008; BRODERICK et al., 2009) e de aminoácidos essenciais (BRODERICK et al., 2009; LEE et al., 2012), ou das interações (BRODERICK et al., 2009) em dietas de vacas leiteiras sobre a produção de leite e de proteína verdadeira. No entanto, são escassos estudos que avaliaram estratégias de balanceamento de proteínas para vacas leiteiras sobre a qualidade da proteína láctea para o processamento industrial durante a produção de derivados do leite.

2.2. BALANCEAMENTO DE CARBOIDRATOS NÃO FIBROSOS NA DIETA DE VACAS LEITEIRAS

Os carboidratos não fibrosos (CNF) são constituídos pelos açúcares, amido e pectina. Apesar da pectina sofrer digestão ruminal semelhante ao conteúdo celular, na avaliação morfológica da planta é classificada como carboidrato estrutural (CE), bem como celulose e hemicelulose (CF e CE). A pectina não é degradada pelas enzimas animais (VAN SOEST et al., 1991; HALL et al., 1997), mas a taxa e a extensão da degradação da pectina são similares a dos carboidratos não-estruturais. Além disso, a fermentação ruminal da pectina aumenta a produção de acetato, mas não a de ácido láctico (HATFIELD e WEIMER, 1995). De forma geral, não há exigência nutricional estabelecida para CNF em dietas de vacas leiteiras, porém, recomenda-se limites máximos de inclusão para evitar distúrbios digestivos e metabólicos, como a acidose ruminal, devido à alta digestão ruminal dos CNF. O limite de inclusão de CNF em dietas de vacas leiteiras varia de acordo com a inclusão de FDN da dieta, principalmente oriunda de forragem ou então como limite mínimo de tamanho de partícula (FDN fisicamente efetiva - FDNfe). O NRC (2001), baseado em dietas completas (TMR), muitas vezes utilizando silagem de milho e/ou alfafa (feno ou silagem) como volumoso da TMR, estabelece recomendações para limites mínimos e máximos para inclusão de FDN e CNF, respectivamente, em dietas de vacas leiteiras (Tabela 2).

Tabela 2 - Recomendações de fibra e CNF na dieta de vacas leiteiras considerando dietas totalmente misturadas

Mínimo de FDN da forragem (% da MS)	Mínimo de FDN total (% da MS)	Máximo de CNF (% da MS)	Mínimo de FDA (% da MS)
19	25	44	17
18	27	42	18
17	29	40	19
16	31	38	20
15	33	36	21

Fonte: Adaptado de NRC (2001).

De outra forma, Allen (1995) recomenda limites mínimos de inclusão de FDN na dieta de vacas leiteiras de cerca de 30% da MS. Desta forma, variações nas recomendações de limites mínimos e máximos de inclusão de FND (FDNfe ou oriunda de forragem) e CNF, respectivamente, variam de acordo com o tipo de volumoso e de fontes de CNF. Especialmente em dietas baseadas em silagem de milho como volumoso único da TMR, o tamanho de partícula é fator fundamental para definir limites de CNF e FDN.

Para atender a exigência de FDNfe das vacas e reduzir riscos de acidose subaguda e demais doenças associadas, pelo menos 60% da dieta deve ter > 8 mm, desde que o teor de amido da dieta não ultrapasse 27% (WHITE et al., 2017). O milho é a principal fonte de amido na nutrição animal, e o uso de amido em dietas de vacas leiteiras é praticamente imprescindível para se conseguir alta produtividade das vacas, especialmente para vacas com alta exigência nutricional. Da mesma forma que o CNF, não há exigência nutricional definida para inclusão de amido em dietas de vacas leiteiras.

A degradabilidade ruminal do amido é muito variável, de 70 a 100%, sendo determinada pela taxa de degradação e o tempo de retenção dos alimentos no rúmen (FIRKINS et al., 2001). Outros fatores alteram a degradabilidade do amido são o método de processamento (CALLISON et al., 2001), o tamanho de partícula, a maturidade e umidade à colheita (FIRKINS et al., 2001), o método de conservação e o tipo de endosperma (PEREIRA et al., 2004).

Parte da variação da taxa de degradação ruminal do amido é explicada pelo tipo de endosperma (caracterizado como vitreosidade ou dureza), ou seja, pela variabilidade do teor de matriz proteica que envolve os grânulos de amido. As matrizes proteicas dos grãos de milho e de sorgo são extremamente resistentes à degradação, enquanto aquelas da cevada, aveia e trigo são facilmente digeridas no rúmen. Até mesmo entre híbridos de milho há considerável variação de teor de prolaminas (zeínas) envoltas nos grânulos de amido, o que dificulta a digestão ruminal do amido. Esta característica de vitreosidade ou dureza dos grãos de milho afeta a digestão ruminal do amido, sendo que quanto maior o teor de prolaminas maior é a vitreosidade ou dureza. A resistência das matrizes proteicas à digestão microbiana explica parcialmente por que > 40,0% do amido do milho e do sorgo podem escapar da fermentação ruminal, enquanto menos de 10,0% do amido do trigo e da cevada chegam ao intestino delgado (ORSKOV, 1986).

O aumento da digestão ruminal do amido tem várias vantagens, como maior produção de propionato e maior síntese de proteína microbiana. O desempenho de novilhos de corte (LOZANO

et al., 2000) e de vacas leiteiras (THEURER et al., 1999) foram superiores quando as fontes de amido foram degradadas no rúmen em comparação com a digestão de amido no intestino. Deste modo, quanto maior a proporção de amido digerido no rúmen maior a eficiência de aproveitamento do mesmo (THEURER et al., 1999). De acordo com Kreikemeier et al. (1991), o uso da glicose oriunda da digestão intestinal do amido é pouco eficiente, pois parte desta glicose é retida e utilizada pelo próprio epitélio do intestino, resultando em baixa eficiência de uso da glicose do amido para os processos produtivos de ruminantes.

A inclusão de amido em dietas de vacas leiteiras, especialmente com produção > 20-25 kg/d, é praticamente indispensável. O aumento do teor de amido dietético de 15 para 30%, por meio da substituição de milho moído por polpa cítrica, aumentou o CMS de forma linear, de 20 para 22,9 kg/d; enquanto que o teor de gordura do leite, a produção de leite e produção de leite corrigida para 3,5% de gordura aumentaram de forma quadrática, sendo a melhor resposta observada com 25% de amido na dieta (CARMO et al. 2015). Entretanto, o teor e a produção diária de PB aumentaram linearmente com a inclusão de amido na dieta, o que sugere maior síntese de proteína microbiana pela maior disponibilidade de carboidratos fermentescíveis no rúmen. Porém, a resposta quadrática de produção de leite, bem como de teor de gordura do leite, podem indicar ocorrência de acidose ruminal subaguda (SARA) com inclusão de amido > 25% da dieta, em dietas com silagem de milho como único volumoso.

Diversos processamentos são utilizados para aumentar a digestão ruminal do amido, como a moagem fina, a ensilagem, e até mesmo a floculação dos grãos. Para avaliar fontes e formas de processamento do amido, Vaz Pires et al. (2008) estudaram a inclusão dos seguintes ingredientes em dietas de vacas leiteiras com 28-32% de amido: milho moído grosso; milho moído fino; milho floculado a 310 g/L; milho floculado a 360 g/L; ou raspa de mandioca. Como resultado, não houve efeito do tipo/processamento do amido sobre o CMS, enquanto que a produção de leite e a secreção diária de proteína e gordura foram menores nas vacas alimentadas com raspa de mandioca (13,81 l/d) quando comparada a produção de leite das vacas alimentadas com milho moído grosso (20,48 l/d), sendo que o processamento do milho não alterou a produção de leite das vacas em comparação ao milho moído grosso. Porém, a floculação do milho e a utilização de raspa de mandioca como fonte de amido reduziram a concentração ruminal de nitrogênio amoniacal (N-NH_3). Adicionalmente, houve tendência ($P < 0,10$) do milho moído fino, floculado a 310 e floculado a 360 g/L em aumentar o fluxo de nitrogênio microbiano para o duodeno quando comparado à raspa

de mandioca e ao milho moído grosso. A menor degradabilidade ruminal do amido do milho moído grosso possivelmente diminui a disponibilidade de substratos para fermentação e síntese de proteína bacteriana, enquanto que a elevada taxa de hidrólise do amido da raspa de mandioca pode ter prejudicado a fermentação da fibra e da proteína, reduzindo a eficiência microbiana total. Em dietas com menor disponibilidade ruminal de amido, há menor fluxo de N microbiano para o intestino, o que sugere que a quantidade de amido fermentando no rúmen seja um fator limitante para o crescimento bacteriano (OBA e ALLEN, 2003).

A ensilagem de grãos de milho úmido também foi descrita como método para melhorar a digestão ruminal do amido. Knowlton et al. (1998) compararam a silagem de grão úmido com milho moído fino em dietas de vacas leiteiras com 40% de amido na matéria seca. Neste estudo, a digestibilidade ruminal do amido da dieta foi de 84% para a silagem de grão úmido e 65% para o milho moído fino; enquanto que a digestibilidade aparente total foi de 97 e 83%, respectivamente. Também substituindo milho moído fino por silagem de grão úmido em dietas com dois níveis de amido (21 ou 32%), Oba e Allen (2003) verificaram maior digestibilidade ruminal do amido para a silagem de grão úmido embora a digestibilidade total não tenha diferido entre os tratamentos.

Recktenwald et al. (2014) avaliaram os efeitos de dois níveis de proteína bruta (16,6 vs 15,1% da MS) e dois níveis de amido (21-23 vs 27,5-29,9% da MS), em dietas com ou sem monensina sódica (Rumensin®) sobre o desempenho produtivo e metabolismo de nitrogênio de vacas leiteiras. Neste estudo, os autores observaram aumento de CMS em resposta ao maior teor proteico da dieta, e maior produção de leite para vacas alimentadas com dietas de maior teor de amido e de proteína. O teor e a secreção diária de proteína foram maiores para vacas alimentadas com dietas com maior teor de amido, em comparação ao menor nível de inclusão deste polissacarídeo, indicando, novamente, a associação positiva existente entre a disponibilidade ruminal de amido e secreção de proteínas lácteas.

Ipharraguerre e Clark (2005) conduziram estudo com objetivo de avaliar os efeitos de inclusão (14,8, 16,8 e 18,7% de PB na MS) e fonte (farelo de soja extraído por solventes-FSS; e FSS associada com proteína animal de origem marinha e metionina protegida) de proteína bruta em dietas de vacas leiteiras sobre o desempenho produtivo e utilização de N dietético. Para aumentar o teor proteico das dietas experimentais, os suplementos proteicos substituíram gradualmente uma proporção de milho da dieta. O estudo indicou que o desempenho produtivo das vacas (média = 40 l/d) depende da fonte e do teor de PB da dieta. Quando as vacas foram

alimentadas com 18,7% de PB na dieta, a dieta com farelo de soja extraído por solventes como fonte proteica apresentou maior CMS, produção de leite, gordura, proteína, e produção de leite corrigida para gordura, mas apresentaram menor eficiência de uso dos alimentos e escore de condição corporal (ECC), do que vacas alimentadas com fontes de PNDR na dieta (proteína animal de origem marinha mais metionina protegida). Este resultado sugeriu que a PM não limitou a produção de leite, porém, a energia metabolizável da dieta pode ter limitado o desempenho produtivo das vacas. Em dietas com 16,8% de PB na MS, as vacas que receberam a dieta com as fontes de PNDR apresentaram maior produção de leite corrigida para gordura, e teores de gordura e proteína do que as vacas alimentadas com dietas sem inclusão de fontes de PNDR, o que sugeriu que o fornecimento de aminoácidos pela PM pode ter limitado a produção de leite em dietas sem inclusão de PNDR. De outra forma, as vacas alimentadas com 14,8% de PB na MS da dieta apresentaram a menor média de produção de leite em comparação as demais dietas, o que sugeriu que o teor proteico de 14,8% de PB na MS foi insuficiente para atender quantitativamente a exigência de PM. Por fim, a melhoria da eficiência bruta de uso do N para a produção de leite foi conseguida através de reduções na ingestão de N, de forma independente da fonte de PB.

Desta forma, diversas interações podem ocorrer no rúmen e determinar a disponibilidade de precursores para a síntese láctea, tais como fonte e disponibilidade ruminal de CNF, FDNfe, PDR e PNDR. O aumento do suprimento de carboidratos fermentescíveis no rúmen pode otimizar a síntese de proteína microbiana e de proteínas lácteas (OBA e ALLEN, 2003; VAZ PIRES et al., 2008), bem como, o fornecimento de fontes de PNDR (BRODERICK et al., 2009), quando a síntese de proteína microbiana não é limitada. Além disso, aumento do suprimento de carboidratos fermentescíveis no rúmen pode contribuir com aumento no teor proteico do leite. Porém, o termo ‘proteína do leite’ pode ser um genérico quando visto dentro do cenário da cadeia agroindustrial do leite. A proteína do leite, além de ser importante quantitativamente para rendimento industrial e nutrição humana, também pode ter alterações do ponto de vista qualitativo, como sua estabilidade durante os processos de aquecimento do leite na indústria. Este contexto será descrito nos próximos itens.

2.3. ACIDOSE E TAMPONANTES

A acidose ruminal pode ser classificada em aguda ou subaguda. De forma geral, na acidose aguda o pH do fluido ruminal situa-se abaixo de 4,8 e mantém-se baixo por um período maior que 24 horas, podendo resultar em acidose metabólica (OWENS et al., 1998). A acidose aguda é causada principalmente pelo aumento da produção de ácido láctico resultante de um aumento do consumo de carboidratos rapidamente fermentescíveis no rúmen. Seus sinais clínicos são: anorexia, dores abdominais, batimentos cardíacos e frequência respiratória acelerados, diarreia, letargia e eventualmente a morte (KRAUSE e OETZEL, 2006).

A acidose ruminal subaguda (SARA) é caracterizada por picos de redução do pH ruminal, porém o pH é reestabelecido após cada pico. Estes picos podem-se perdurar por diversos minutos ou horas. Estima-se que picos longos (> 3-4h) de queda de pH reduzem a digestão da fibra (RUSSELL e WILSON, 1996) e a capacidade de absorção do epitélio ruminal (HARMON et al., 1985). Danos ao trato gastrointestinal podem facilitar a entrada de bactérias, aminas e toxinas (lipopolissacarídeos) para a circulação portal, causando abscessos hepáticos e respostas inflamatórias (GOHZO et al., 2005). A acidose subaguda é causada principalmente por acúmulo de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), quando sua produção excede a capacidade de absorção ruminal. Com o tempo, os AGCC são absorvidos, tamponados ou deixam o rúmen pela passagem aos demais órgãos, reestabelecendo o pH ruminal. Desta forma, um padrão cíclico pode ser atribuídos à acidose ruminal subaguda, porém a concentração de ácido láctico mantém-se baixa (< 1 mM).

Apesar de a incidência de laminite, diarreia e baixo teor de gordura do leite serem um indicativo de SARA, estes sinais clínicos também são alterados por diversos outros fatores. O percentual de vacas em ruminação é utilizado para avaliação da SARA em fazendas leiteiras, no qual pode-se considerar que a função ruminal está adequada quando pelo menos 40% das vacas estão ruminando, exceto quando estão comendo ou em ordenha (EASTRIDGE, 2000; MAEKAWA et al., 2002). No entanto, uma adequada estimativa da ocorrência de SARA só é possível com diversas observações, em diversos dias e diversos tempos de avaliação ao longo do dia. Mesmo assim, essa estimativa é apenas uma visão geral do rebanho e não é capaz de detectar os animais do mesmo lote/rebanho que estão com problema de SARA. Ainda não está claro todas

as causas da variação individual dos animais para o risco de acidose, mas presume-se que os seguintes fatores podem determinar a ocorrência de SARA: CMS, taxa de consumo, seleção da dieta, taxa de salivação, população microbiana inerente, histórico de acidose, taxa de passagem e outros aspectos fisiológicos e comportamentais.

O maior risco de acidose ocorre em vacas pós-parto, uma vez que ocorre mudança abrupta no consumo de carboidratos fermentáveis (GRÖHN and BRUSS, 1990). Penner et al. (2007) observaram que a média de pH ruminal caiu abruptamente de 6,32 antes do parto para 5,98 após o parto e durante os primeiros 40 dias pós-parto o pH ruminal manteve-se abaixo de 5,8 por 7 a 9 horas/dia, em que 71 a 79% das vacas tiveram SARA (Tabela 3).

Tabela 3 - Efeito do dia relativo ao parto sobre a ocorrência de acidose ruminal subaguda em vacas primíparas da raça Holandesa

Variável	Dias relativos ao parto				
	-5 ao -1	1 ao 5	17 ao 19	37 ao 40	58 ao 60
pH mínimo	5,74 ^a	5,38 ^b	5,37 ^b	5,32 ^b	5,37 ^b
pH médio	6,32 ^a	5,96 ^b	5,95 ^b	5,96 ^b	6,03 ^b
SARA (pH < 5,8), h/d	1,1 ^c	7,3 ^{ab}	9,0 ^a	8,3 ^{ab}	6,1 ^b
Proporção de vacas com SARA, %	5	71	71	79	64

^{abc}P < 0.05. Fonte: Adaptado de Penner et al. (2007).

Em alto pH ruminal, a maior parte dos AGCC estão no estado ionizado (dissociado, AGCC), enquanto que em baixo pH (pH < 6) a maior parte está na forma não dissociada (AGCC-H). A absorção dos AGCC não ionizados (protonados) é passiva, o que ajuda na remoção de ácido associado ao AGCC do rúmen. Já a forma ionizada é absorvida em troca com o bicarbonato do sangue ou da síntese “de novo” nas células epiteliais. Para cada 1 mol de AGCC-absorvido, 0,5 moles de bicarbonato são trocados. A taxa de absorção ruminal dos AGGC é fundamental para o controle de acidose. Além disso, a saliva, por conter bicarbonato e fosfatos, também exerce importante papel no controle do pH ruminal. O rúmen é bastante resiliente a alterações no pH, mas o fator chave principal é a adaptação e a estabilidade do mesmo. Evitar trocas de dietas abruptas e/ou adaptar o rúmen, especialmente no período de transição, pode ser fator fundamental na redução de ocorrência de SARA. Uma transição gradual pode ser adotada para troca das dietas pós-

parto para lactação, com o uso de uma dieta “pós-parto” com teor de amido intermediário entre a dieta do período seco e a de alta produção.

Em vacas adaptadas, a metabolização de ácido láctico é rápida, prevenindo o acúmulo de ácido láctico no rúmen. Porém, o crescimento de bactérias que usam ácido láctico (ex: *Megasphaera elsdenii*, *Propionibacterium* spp.) é relativamente baixo. Desta forma, estas bactérias necessitam tempo suficiente para adaptar a mudanças de dietas, e reduzir o acúmulo de ácido láctico (NAGARAJA e TITGEMEYER, 2007). Adicionalmente, o uso de dieta intermediária entre o período seco e a lactação estimula o crescimento de papilas ruminais, e consequentemente a capacidade de absorção dos AGCC, prevenindo o acúmulo de AGCC e surgimento da SARA. Estima-se que são necessárias cerca de oito semanas para o máximo crescimento de papilas ruminais durante a transição de dieta a base de forragem para dieta com concentrado (DIRKSEN et al., 1985). Bauchemin e Penner (2014) relataram que durante o período seco a área de absorção das papilas ruminais é reduzida para 75% da capacidade observada durante a lactação, sendo que o uso de dietas *close-up* durante o período de transição reestabeleceu a área de absorção em 2 à 3 semanas. No entanto, mesmo as vacas reestabelecendo a capacidade absorptiva eles apresentaram SARA, o que indicou que o a redução do CMS antes do parto pode ser o principal fator associado com a SARA no pós-parto. Desta forma, minimizar a redução do CMS durante o período de transição pode ser fator fundamental também no controle de SARA ocorridas no pós-parto.

O balanceamento de carboidratos e o uso de aditivos podem ser estratégias adotadas para minimizar o risco de SARA em rebanhos leiteiros. Bauchemin e Penner (2014) recomendam em dietas de vacas leiteiras limites máximos de 28% de amido, 6% de açúcar e 35-40% de CNF, e limite mínimo de 19-21% de FDN de forragem, sendo que pelo menos 60% do material da forragem deve ficar retido nas peneiras de 8 e 19 mm (máximo de 15% retido na primeira peneira para reduzir a capacidade de seleção dos animais) na peneira separador de partículas “Penn State”. A substituição parcial de grãos por fontes de fibras “não-forragem” como polpa de beterraba, polpa cítrica e casca de soja podem auxiliar no controle de inclusão de amido nas dietas. Por fim, aditivos como bicarbonato de sódio, levedura, bactérias consumidoras de ácido láctico e monensina também pode auxiliar no processo de prevenção de acidose. Bauchemin e Penner (2014) recomendam a inclusão de bicarbonato de sódio de 0,5% a 0,75% do CMS. Estima-se que a inclusão de tampões pode ser equivalente ao aumento de 5% na proporção de forragem na dieta ou 1 h/d a mais de ruminação.

O uso de aditivo tamponante é uma prática consolidada na nutrição de ruminantes. Estudos são realizados para determinar o efeito tamponante das substâncias, a quantidade ideal do aditivo a ser fornecido na dieta e a ação conjunta de diferentes aditivos. O termo tampão tem sido empregado tanto para tampões verdadeiros quanto para substâncias alcalinizantes, contudo, há diferenças entre elas. Substâncias tamponantes ajudam a promover a resistência à variação do pH. Um tampão é uma substância que reage com íons H^+ livres em solução, mantendo o pH do meio próximo ao pK_a do sistema tampão, ou seja, pH em que espécies protonadas e desprotonadas estão presentes em iguais concentrações. Substância tampão atua como reserva de hidrogênio. Quando há excesso de hidrogênio na solução, isto é, pH baixo, o tampão capta o H^+ . No caso de alcalinização, a substância tampão libera hidrogênio na solução. Dessa forma, o pH não varia na mesma proporção em que o hidrogênio é adicionado à solução. Já a substância alcalinizante (óxido de magnésio) sempre capta hidrogênio, aumentando o pH da solução (MURRAY et al., 2002).

2.4. PROTEÍNAS DO LEITE

As proteínas do leite apresentam importante papel na fabricação de queijos, e também de derivados que passam por tratamentos térmicos intensos, como “ultra alta temperatura” e leite em pó. As proteínas do leite podem ser classificadas em dois grupos: as proteínas do soro e as caseínas. A classificação destes dois grandes grupos é baseada na coagulação e precipitação das proteínas do leite: as caseínas são as proteínas que precipitam em $pH = 4,6$; enquanto que as proteínas do soro não sofrem esta precipitação. Além destes grupos, o leite apresenta uma fração de compostos nitrogenados não-protéico (NNP; principalmente ureia, creatinina e creatina) originários do sangue, que podem representar cerca de 5% da proteína bruta do leite (SANTOS; FONSECA, 2007).

Dentre as 4 principais proteínas do soro, apenas duas são sintetizadas na glândula mamária (β -lactoglobulina e α -lactalbumina), enquanto que as demais são originadas do sangue (albumina sérica e imunoglobulinas). De forma geral, a β -lactoglobulina é a proteína do soro presente em maior concentração no leite (representa cerca de 50% das proteínas do soro). A β -lactoglobulina não está presente na secreção láctea de todos os mamíferos, com exceção dos humanos e roedores.

A função biológica da β -lactoglobulina ainda não é totalmente conhecida, mas está associada ao metabolismo do fosfato na glândula mamária, e no transporte da vitamina A e outras moléculas hidrofóbicas, como os ácidos graxos no trato gastrointestinal de neonatos (KONTOPIDIS; HOLT; SAWYER, 2004).

A β -lactoglobulina é formada por uma sequência de 162 resíduos de aminoácidos (HAMBLING; MCALPINE; SAWYER, 1992) com apresentação em dímeros, porém, se dissocia em monômeros quando ocorre desnaturação (KONTOPIDIS; HOLT; SAWYER, 2004). Os agentes que podem desnaturar a β -lactoglobulina são os álcalis, compostos orgânicos ou íons de metais pesados, e, em especial, o calor. A β -lactoglobulina é uma proteína termolábel e apresenta certa capacidade de sequestrar o cálcio em um dado pH sendo que as concentrações de cálcio determinam as interações da β -lactoglobulina com demais proteínas do leite (SINGH; FOX, 1987).

A β -lactoglobulina apresenta reatividade com outros componentes do leite, como a α -lactalbumina e a κ -caseína. A κ -caseína é uma subunidade de caseína hidrofílica que protege o interior hidrofóbico da micela de caseína do contato com a água, íons de cálcio e com o etanol, apresentando papel importante para a estabilidade do leite durante o aquecimento e/ou no teste do etanol (MARQUES et al., 2011; FISCHER et al., 2012; HOLT et al., 2013). Adicionalmente, Bobe et al. (1999) e Bobe et al. (2004) observaram que os genótipos das variantes para κ -caseína e β -lactoglobulina contribuem para maior variância fenotípica observada na composição proteica e de gordura do leite, independente de manejos nutricionais adotados.

A caseína é a principal proteína encontrada no leite, pois forma 80% das proteínas lácteas (CHEFTEL et al., 1989). O leite de vaca contém diferentes tipos de subunidades de caseína: α (α_{s1} e α_{s2}), β e κ -caseína (FONSECA; SANTOS, 2000). As subunidades α_{s1} , α_{s2} , β , e κ são encontradas no leite nas proporções 4:1:3,5:1,5, respectivamente (WALSTRA, 1999; SANTOS; FONSECA, 2007). A caseína é sintetizada na glândula mamária e secretada no leite principalmente na forma de micelas (FONSECA; SANTOS, 2000). Portanto, a caseína do leite é um agrupamento em micelas (associação em coloides) das subunidades proteicas α_{s1} , α_{s2} , β , e κ -caseínas, interligadas por fosfato de cálcio (WALSTRA, 1999; OLIVEIRA; TIMM, 2007).

A estrutura e formação interna das micelas de caseína ainda é amplamente discutida, e basicamente 2 modelos ainda são discutidos na literatura: 1) modelo clássico de submicelas; 2) modelo de nano-agregados (nanoclusters; De KRUIF et al., 2012). No modelo clássico de submicelas, considera-se que as submicelas são interligadas por fosfato de cálcio até formar por

completo a micela de caseína propriamente dita. As micelas de caseína variam quanto à composição de submicelas em dois tipos principais: 1) formado por α , β e κ -caseína; e 2) formado por α e κ -caseína. Durante a formação da micela, o arranjo dimensional das ligações entre submicelas aloja a κ -caseína na parte externa da micela, onde o C-terminal da κ -caseína se projeta para fora da micela, o que resulta em aspecto de camada esponjosa (WALSTRA, 1999). A κ -caseína é projetada na parte externa por ser hidrofílica e estável na presença de íons de cálcio, e, desta forma, protege o interior micelar hidrofóbico e cálcio-sensível (composto por α e β -caseína) do contato com a água e da ionização com o cálcio. Adicionalmente, a κ -caseína reage com a água e impede a agregação das micelas por repulsão eletrostática (CREAMER et al., 1998; WALSTRA, 1999). A κ -caseína é codificada por um *locus* no cromossoma 6 e apresenta uma sequência de 169 aminoácidos (RIJNKELS, 2002). As duas principais variantes genéticas de κ -caseína, A e B, diferem na posição dos aminoácidos 136 (treonina por isoleucina, respectivamente) e 148 (aspartato por alanina, respectivamente) (ALEXANDER et al., 1988). As caseínas α e β são as frações em maior proporção entre as caseínas do leite, porém são hidrofóbicas e sensíveis à presença de cálcio, e portanto, são projetadas no interior da micela de caseína (Figura 2) (FONSECA; SANTOS, 2000; SWAISGOOD, 2003). A β -caseína é considerada a caseína mais hidrofóbica encontrada no leite por apresentar um largo C-terminal hidrofóbico dominante, baseado na estrutura primária (SWAISGOOD, 2003). A β -caseína é sensível a altas concentrações de sais de cálcio, embora seja menos sensível à precipitação com cálcio do que as α -caseínas (WALSTRA, 1999).

Figura 2 - Figura esquemática do modelo clássico de submicelas de caseína

Fonte: Di Martins, A. (2009).

Apesar do modelo de sub-micelas ainda ser o mais conhecido e citado na literatura, recentemente as caseínas estão sendo estudadas e entendidas pelo seu ponto de vista biológico (Figura 3). O modelo mais recente de nano-agregados de caseínas sugere a micela como uma matriz (homogeneia) de caseína na qual as caseínas estão anexadas a nano-agregados de fosfato de cálcio (rádio médio de 1,72 a 2,27 nm) por meio do centro de fosforilação (NEVILLE, 2005). Desta forma, nano-agrupamento de fosfato de cálcio envolto por caseína se associam para formar a micela de caseína, que termina com a κ -caseína na superfície da micela conferindo estabilidade a mesma. Neville (2005) sugeriu que a concentração de cálcio é o fator determinante para as interações proteína-proteína e formação dos nano-agregados da micela. A “cauda” da caseína (porção distal do nano-agregado de fosfato de cálcio e caseína) é maior que os agregados de fosfato de cálcio, associado a forma primária da matrix proteica (NEVILLE, 2005). A associação de “caudas” de caseína no fosfato de cálcio é direcionada por interações fracas com características hidrofóbicas, com pontes de hidrogênio, ligações iônicas e atração de Van der Waals, resultando em auto associação. Neste modelo de nano-agregados, sugere-se que é a cooperação de todos estes fatores

que contribuem para a estabilidade da micela (como um velcro), e que a κ -caseína é sugerida como limitador do processo de auto ligação e tamanho da micela, conferindo estabilidade a mesma (DEKRUIF et al., 2012).

Figura 3 - Figura esquemática do modelo de nano-agregados (caseínas são conectadas ao fosfato de cálcio para formar o nano-agregado, que por sua vez conectam-se com outros nano-agregados para formar a micela) e modelo clássico de submicelas de caseína

Modelo de nano-agregados

Fonte: adaptado de Di Martins, A. (2009) e De Kruif et al. (2012).

Além de manter as caseínas estáveis ao etanol e ao tratamento térmico, a organização micelar das subunidades de caseína facilita a ação da enzima quimosina para a clivagem na ligação peptídica Phe105 – Met106 da κ -caseína no estômago humano e/ou no abomaso do bezerro, o que contribui para a adequada nutrição e maior aproveitamento dos aminoácidos contidos na caseína durante os processos de digestão e absorção. A estrutura aberta das micelas de caseína, resultantes da clivagem da κ -caseína, permite o acesso de proteinases. Esta clivagem expõe o interior hidrofóbico da micela de caseína, resultando em susceptibilidade das micelas de caseína em formar um gel (coalho). Adicionalmente, o fosfato de cálcio se dissolve a medida que o pH decresce, e as caseínas são liberadas para reorganizar-se e formar uma rede mais extensa de interações do que era

possível na micela, o que aumenta o tempo de retenção da micela no estômago e facilita a digestão das proteínas e absorção dos aminoácidos (HOLT et al., 2013).

Alterações nas proteínas κ -caseína e β -lactoglobulina foram sugeridas como fatores que podem contribuir para a ocorrência de leite instável não ácido (LINA). As proteínas do soro são desnaturadas durante o tratamento térmico, e, como resultado, reagem com a κ -caseína na micela e podem reduzir a estabilidade do leite. A intensidade das interações da κ -caseína com a β -lactoglobulina depende da concentração de cálcio livre no leite (MARTINS et al., 2015a). Adicionalmente, segundo Jeurnink e De Kruif (1995), a concentração de cálcio livre do leite também determina se o complexo β -lactoglobulina/ κ -caseína permanece na superfície da micela ou dissocia-se para o soro; e quando este último ocorre, o interior hidrofóbico composto pelas caseínas cálcio-sensíveis (α e β) pode ficar exposto ao contato com a água e a ionização com o cálcio iônico facilitando a coagulação da micela.

2.4.1. Estabilidade das proteínas do leite

O termo “estabilidade do leite” refere-se à resistência relativa das proteínas em suportar o tratamento térmico industrial e/ou à reação com o etanol (estabilidade do leite ao etanol) sem sofrer coagulação (SINGH, 2004). A estabilidade das proteínas é um fator importante para o processamento industrial do leite, especialmente para a fabricação de derivados que necessitam tratamentos térmicos intensos, como o leite longa vida (UAT) (HORNE, 2016). Desta forma, em alguns países, antes da captação de leite na fazenda e/ou nas plataformas de recebimento dos laticínios, ainda é utilizada a estabilidade do leite ao etanol (teste do etanol ou alizarol) como uma forma de estimar a estabilidade térmica das proteínas. O teste do etanol/alizarol é utilizado para avaliar a estabilidade térmica do leite, bem como a acidez por meio da utilização de alizarina (indicador de pH) na solução alcoólica (teste do alizarol). Este teste consiste na mistura das mesmas proporções (volume/volume) de leite e etanol, cujo resultado é baseado na visualização de coagulação (positivo) ou não (negativo) (Figura 4). Quando o resultado é positivo, na maioria das vezes o leite não é captado na fazenda, podendo ser descartado e/ou o produtor recebe uma penalização no pagamento (FISCHER et al., 2012).

Figura 4 - Leite normal e com diversos "graus" de coagulação de proteínas pelo teste do etanol

A utilização do teste do etanol para estimar a estabilidade térmica do leite é baseada na resistência das micelas de caseína em manter-se estável em contato com o etanol. A adição de etanol a uma solução aquosa diminui a constante dielétrica do fluido, favorecendo as interações eletrostáticas (MIKHEEVA et al., 2003). Desta forma, a adição de etanol no leite resulta em colapso da região C-terminal da κ -caseína, aumento do pKa dos resíduos glutamato e aspartato e redução da solubilidade do cálcio e dos fosfatos da micela, fatores estes que contribuem para reduzir a força de repulsão eletrostática entre as micelas, o que facilita a coagulação (MIKHEEVA et al., 2003). Ao expor o interior hidrofóbico da micela ao contato com a água e com íons, as caseínas se aglomeram formando um tipo de “gel” na superfície do leite, caracterizado como o processo de coagulação (O’CONNELL et al., 2006).

A utilização do teste do etanol como método de avaliação da qualidade do leite cru é regulamentada pela instrução normativa 76/2018, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a qual estabelece que o leite cru deve ser estável (não coagular) no teste do etanol com pelo menos 72% de etanol na solução alcoólica. No entanto, quando se busca leite de maior estabilidade para o processamento de derivados que necessitam tratamentos térmicos intensos, como o leite longa vida e o leite em pó, algumas indústrias utilizam concentrações até maiores de 80% de etanol na mistura alcoólica, o que pode aumentar o volume de leite descartado por problemas de instabilidade. Em diversas regiões do Brasil (ZANELA et al., 2006; MARQUES et al., 2007; BOTARO et al., 2009; FISCHER et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013) e em outros países que utilizam a estabilidade do leite ao etanol como um critério de qualidade do leite (BARROS et al., 1999; MOLINA et al., 2001; NEGRI et al., 2003; CHAVEZ et al., 2004) foram relatadas alta frequência de leite de baixa estabilidade, no entanto, sem acidez resultante de ação microbiana.

A formação de coágulos no leite instável ao etanol e durante o processamento térmico é resultado do processo de desnaturação da micela de caseína, pois ao expor o interior hidrofóbico da micela ao contato com a água e com íons, as caseínas se aglomeram formando um tipo de “gel” na superfície do leite, caracterizado como o processo de coagulação (WALSTRA, 1999; SANTOS; FONSECA, 2007; FISCHER et al., 2012). A principal proteína do leite é a caseína, a qual é organizada em micelas, ou seja, várias subunidades de caseína, denominadas como α (α), β (β) e κ (κ) caseína, são ligadas entre si por fosfato de cálcio para compor a micela de caseína. A κ -caseína é a única subunidade de caseína que é hidrofílica (não coagula em contato com a água), e por isso fica na região externa da micela e protege o interior composto pelas caseínas hidrofóbicas, α e β – caseína, que coagulam em contato com a água. Desta forma, o arranjo das caseínas em micela é uma forma de manter as caseínas hidrofóbicas estáveis no leite (sem aglomeração), uma vez que o mesmo é composto por mais de 80% por água. De forma resumida, o processo de coagulação pode ocorrer quando há exposição da região hidrofóbica das micelas de caseína ao contato com a água, o que ocasiona aglomeração das proteínas na superfície do leite, até formar os primeiros coágulos visíveis, caracterizando a coagulação do leite.

2.4.2. Leite Instável Não Ácido (LINA)

Fatores não microbiológicos, como predisposição genética e condições nutricionais e metabólicas das vacas leiteiras, foram relatados como as principais causas da instabilidade do leite ao etanol (MARQUES et al., 2011; BARBOSA et al., 2012; FISCHER et al., 2012). O leite instável ao etanol com valores normais de pH e acidez titulável foi denominado no Brasil como leite instável não ácido (LINA) (ZANELA et al., 2006). Tal situação foi associada à alterações nas micelas de caseína, equilíbrio salino, concentração de cátions bivalentes, fosfatos e citratos, ureia e força iônica do leite (Figura 5) (MARQUES et al., 2011; BARBOSA et al., 2012; FISCHER et al., 2013).

Figura 5 – Principais fatores associados com a estabilidade do leite ao teste do álcool

Fonte: Adaptado de Zanela, Ribeiro e Fischer (2015).

Zanela et al. (2009) relataram que de 2.396 amostras coletadas na região sul do Brasil, apenas 3,2% apresentaram baixa estabilidade associada ao elevado pH do leite (Síndrome do leite anormal - SILA), enquanto que a ocorrência de LINA foi de 55,2% do total de amostras coletadas (ZANELA et al., 2009). De forma semelhante, no estudo de Marques et al. (2007) a prevalência média anual de ocorrência de leite de LINA foi de 58%, com valores médios extremos de 31 a 78%

em diferentes épocas do ano (MARQUES et al., 2007). Neste mesmo estudo, o LINA foi mais prevalente nos produtores com menor volume diário de produção de leite. Fischer et al. (2012) relataram que os efeitos sazonais sobre a ocorrência de LINA podem ser atribuídos à escassez de alimentos em épocas de vazio forrageiro ou em regiões que compartilham as áreas de pastagem com a produção de cereais, como milho e soja. De forma semelhante, outros estudos relataram que a deficiência de nutrientes dietéticos reduziu a estabilidade do leite em vacas leiteiras, quando comparado as amostras de leite oriundas de vacas alimentadas com dietas balanceadas (ZANELA et al., 2006; BARBOSA et al., 2012; STUMPF et al., 2013). Os resultados de Barbosa et al. (2012) indicaram que as amostras instáveis ao teste do etanol apresentaram alterações na composição da micela de caseína, uma vez o leite instável teve tendência em ter menor teor de κ -caseína, em comparação com as amostras de leite estáveis ao etanol (BARBOSA et al., 2012). Ainda há poucos estudos que avaliaram o efeito isolado de cada fator que pode alterar a estabilidade do leite, o que dificulta a implantação de medidas de prevenção e correção do LINA nas fazendas leiteiras.

A principal alteração na composição do leite associada com a coagulação da micela de caseína é o aumento da concentração de cálcio livre no leite. O aumento de cálcio livre (cargas elétricas positivas) altera o equilíbrio iônico das caseínas, por reduzir as cargas negativas das micelas de caseínas e a força de repulsão eletrostática entre elas (BARROS et al., 1999), o que pode reduzir a resistência do leite em formar coágulos durante o contato com o etanol e / ou durante o aquecimento térmico (Figura 6; MARQUES et al., 2011; FISCHER et al., 2012; MARTINS et al., 2015a).

Figura 6 - Esquema de coagulação do leite bovino ao teste do etanol resultante do aumento da concentração de cálcio iônico do leite

Fonte: Adaptado de Di Martins (2011).

Além da concentração de íons e da relação de proteínas no leite, outros fatores foram associados com a estabilidade do leite ao etanol. O nitrogênio ureico do leite pode inibir a formação de ácidos e atuar sobre os grupos tiol das proteínas, contribuindo para dificultar a coagulação do leite ao etanol e/ou durante o aquecimento térmico. Adicionalmente, a ureia pode ser convertida em cianeto, que reage com a proteína e, contrariamente ao cálcio livre, aumenta as cargas negativas das micelas e a força de repulsão entre elas, e, conseqüentemente, a estabilidade do leite

(SWEETSUR e MUIR, 1981). De forma semelhante, o aumento da concentração de citrato também pode contribuir para o aumento da estabilidade do leite (MACHADO, 2010), pois pode sequestrar o cálcio livre e aumentar a força de repulsão entre as micelas de caseína (VARNAM e SUTHERLAND, 1995). Os fosfatos, de forma semelhante ao citrato, também podem atuar para manter a estabilidade do leite (HORNE E MUIR, 1990), pois contribuem para reduzir o cálcio iônico no leite. Porém, o citrato se mantém por mais tempo solúvel no leite, além de ser mais efetivo para reagir com o cálcio livre, em comparação com o fosfato (SINGH, 2004). De outra forma, a ação dos fosfatos também está associada ao pH do leite, uma vez que quando o pH do leite é reduzido, o fosfato coloidal passa à fase solúvel e desestabiliza as proteínas do leite (MACHADO, 2010; SANTOS e FONSECA, 2007). Desta forma, fatores como o tempo de lactação, mastite, ambiente, genética e nutrição das vacas lactantes estão associados com as alterações nas propriedades físico-químicas e no equilíbrio salino do leite, o que pode alterar a estabilidade do leite durante ao etanol e/ou durante o tratamento térmico.

Fatores ambientais, genéticos e nutricionais já foram relatados como possíveis causas de ocorrência de LINA. Dentre os fatores não nutricionais que podem resultar em LINA, alguns estudos indicaram que o leite de vacas com mastite ou em estágio final de lactação tem três vezes mais probabilidade de ser instáveis do que leites de vacas no meio da lactação, provavelmente devido à alteração do teor de íons e equilíbrio salino (Na, K e Cl) do leite nestas condições (FISCHER et al., 2012). Da mesma forma, vacas em estágio inicial de lactação também apresentaram maior frequência de leite instável não ácido, em comparação com estágio intermediário de lactação. Com relação à mastite, ainda não está claro seus efeitos sobre a estabilidade de leite. Alguns estudos sugerem que a mastite subclínica não apresenta efeitos diretos sobre a estabilidade do leite ao etanol. No entanto, em um estudo conduzido na região nordeste do estado de São Paulo foi observado que o leite estável apresentou menor contagem de células somáticas (CCS) que o leite instável (OLIVEIRA et al., 2011). De forma semelhante, ainda nos anos 60, um estudo foi conduzido para avaliar os efeitos da mastite subclínica sobre a estabilidade do leite durante o aquecimento térmico a 140°C (FEAGAN; GRIFFIN e LLOYD, 1966). Foram coletadas amostras de leite de quartos mamários saudáveis e infectados de vacas primíparas e multíparas nas diferentes fases de lactação, e, posteriormente, submeteram estas amostras ao aquecimento térmico a 140°C. Como resultado, o leite coletado de quartos infectados apresentou estabilidade térmica menor do que o leite oriundo dos quartos saudáveis da mesma vaca.

Desta forma, há divergência de resultados de estudos com relação aos efeitos da mastite subclínica sobre a estabilidade do leite. Esta divergência de resultados pode estar associada ao tipo de cada microrganismo causador de mastite, uma vez que as espécies de microrganismos diferem entre si quanto ao tipo de resposta inflamatória e aos efeitos sobre a composição do leite. Apesar de poder haver alguma associação entre estágio de lactação, mastite e estabilidade do leite, os fatores nutricionais são os que apresentaram maior associação com a ocorrência de LINA no Brasil (ZANELA et al., 2006; MARQUES et al., 2007; MARQUES et al., 2011; FISCHER et al., 2012). Com base nestes estudos existentes, pode ser descrito dois grupos de causas principais, de origem nutricional, que podem ser associadas com a ocorrência de LINA: deficiência de nutrientes e distúrbios digestivos e metabólicos.

2.4.1.1. Deficiência de nutrientes

As primeiras pesquisas sobre estabilidade do LINA realizadas na região sul do Brasil demonstraram que a maior frequência ocorreu principalmente em época de carência de produção de alimentos (épocas de baixa disponibilidade de forragens), o que indicou que a deficiência de nutrientes é um fator importante associado com a instabilidade do leite (ZANELA et al., 2006; MARQUES et al., 2007). Estudos induziram experimentalmente a ocorrência de LINA por meio da restrição alimentar, (ZANELA et al., 2009; BARBOSA et al., 2012; STUMPF et al., 2013), sendo que quando houve restrição no fornecimento de alimentos a ocorrência de LINA foi aumentada, quando comparada ao fornecimento à vontade de alimentos. Nestes estudos, nas amostras de LINA foi observada alterações na proporção entre as subunidades de caseína (BARBOSA et al., 2012), e também aumento no espaço entre as células do epitélio alveolar mamário (junções firmes) (STUMPF et al., 2013). Com o aumento do espaço entre as células epiteliais da glândula mamária, pode ocorrer maior passagem de íons para o leite, como o cálcio, o que pode facilitar a coagulação das proteínas, resultando em LINA. Esta última explicação é a mais plausível para explicar o efeito da deficiência no fornecimento de alimentos sobre a redução da estabilidade do leite, porém, ainda não está claro se as alterações nas proporções das subunidades de caseínas (*alpha*, *beta* e *kappa* – caseína) também podem contribuir para reduzir a

estabilidade da micela. Uma possível explicação para alterações na proporção entre as subunidades de caseína é a limitação da síntese de proteína microbiana, que pode ocorrer tanto pela deficiência de proteína quanto de carboidratos degradáveis no rumem. A proteína microbiana, entre as fontes proteicas utilizadas pelos ruminantes, é a que apresenta o perfil de aminoácidos mais próximo da proteína do leite (SANTOS et al., 1998). Portanto, limitar a produção de microrganismos no rumem, por meio de baixa disponibilidade de carboidratos e proteína degradáveis no rumem, pode ter algum efeito sobre a proporção entre as subunidades de caseínas do leite.

A deficiência de alimentos pode ocorrer com mais frequência em sistemas de pastejo, onde a disponibilidade de forragens varia ao longo do ano, e quando não ocorre planejamento no fornecimento de volumosos suplementar em épocas de carência de pastagens, pode ocorrer deficiência no fornecimento de alimentos e, conseqüentemente, carência nutricional (FISCHER et al., 2012). Desta forma, um adequado planejamento para o fornecimento de alimentos alternativos ao pasto em épocas de baixa disponibilidade de pastagens deve ser considerado para se evitar problemas de ocorrência de LINA. A estratégia mais conhecida e adotada para a suplementação de forragens em épocas de escassez de pastagens é o uso de silagens, fenos e pré-secados, o que facilmente supriria a falta da disponibilidade de alimentos gerada pela baixa oferta de forragens. Porém, somente o planejamento da demanda de forragens ao longo do ano pode ser insuficiente, pois além da disponibilidade de forragens é necessário atender as exigências nutricionais das vacas em lactação. De forma geral, a exigência mais difícil de ser atendida para vacas em lactação é a energética. Vacas de alta produção podem exigir pelo menos 3 vezes mais energia para a produção de leite do que a exigida para sua manutenção (NRC, 2001).

Alguns estudos foram conduzidos com o objetivo de recuperar a estabilidade do leite com o suprimento de energia e proteína, ou pelo suprimento apenas de proteína ou apenas de energia. Neste contexto, um estudo foi realizado durante 13 dias (SCHMIDT, 2014), no qual as vacas receberam dieta padrão (para atender as exigências de energia e proteína), e, de forma abrupta, foram induzidas ao LINA pela restrição de 50% das suas exigências diárias de energia e proteína durante um período de 4 dias. Após este período de indução ao LINA, foram testadas 3 dietas durante 7 dias com o objetivo de recuperar a estabilidade do leite: 1) atendimento de 100% das exigências de energia e proteína; 2) atendimento de 100% das exigências de energia e restrição de 50% da proteína; 3) atendimento de 100% das exigências de proteína e restrição de 50% da energia. Durante o primeiro período (dieta padrão), o nível de etanol na solução alcóolica para induzir a

coagulação foi de 74 a 74,5%. Durante o período de indução ao LINA, este nível caiu para 65,5 a 66%. No período de recuperação da estabilidade do leite, a dieta que atendeu 100% das exigências de energia e proteína (dieta 1) recuperou a estabilidade do leite para 72% de etanol na mistura alcoólica necessário para provocar coagulação; enquanto que a dieta que atendeu 100% de energia e 50% de proteína recuperou a estabilidade do leite para 68,84% de etanol necessário para coagulação, ao passo que a dieta que atendeu 100% de proteína e 50% de energia reduziu ainda mais a estabilidade do leite, onde passou de 66 (1º dia de utilização desta dieta) para 62% (7º dia de utilização desta dieta) de etanol na mistura alcoólica necessário para coagulação do leite. Desta forma, no período de indução ao LINA (4 dias de utilização de restrição de 50% da energia e da proteína) o nível de etanol na solução alcoólica necessário para induzir coagulação aparentemente estabilizou em 65,5 e 66 no terceiro e quarto dia de utilização desta dieta. Quando a dieta com adequado fornecimento de proteína associado à restrição de 50% da energia foi utilizada, a estabilidade do leite reduziu de 65,5 – 66% (observado com a restrição de proteína e energia) para em torno de 62% de etanol na mistura, o que indica que o desequilíbrio de proteína/energia, neste caso adequado fornecimento de proteína associado à deficiência de energia, também pode ser um fator que possa resultar em LINA.

De acordo com o NRC (2001), a disponibilidade de energia fermentescível no rumem afeta mais a síntese de proteína microbiana do que propriamente a degradabilidade ruminal da proteína, uma vez que em escassez de proteína dietética a reciclagem de nitrogênio via saliva é aumentada. No entanto, mais estudos precisam ser realizados para avaliar estes outros fatores que podem induzir e/ou potencializar os efeitos dietéticos sobre a estabilidade do leite, como desbalanço de proteína/energia, bem como degradabilidade ruminal destes compostos. Li et al. (2014) observaram que a degradabilidade ruminal da proteína e dos carboidratos dietéticos pode alterar a expressão de proteínas do leite. Porém, neste estudo não foi avaliado os efeitos destes fatores dietéticos sobre a estabilidade do leite. Desta forma, ainda não está claro como fatores nutricionais podem alterar a estabilidade do leite, por alterações na concentração láctea de cálcio iônico e/ou subunidades de caseína.

2.4.1.2. Distúrbios digestivos e metabólicos

Para vacas de média/alta produção de leite o fornecimento de concentrado balanceado é fundamental para atender as exigências nutricionais e prevenir problemas de LINA, além da utilização de forragens conservadas especialmente em épocas de baixa disponibilidade de pastos. Nas situações em que ocorre aumento do fornecimento de concentrado, ou então de um ingrediente específico, como milho moído, o manejo nutricional deve ser feito para atender a elevada exigência nutricional de vacas em lactação, e, consequentemente prevenir problemas com LINA. Entretanto, o aumento no fornecimento de concentrado e/ou de baixo fornecimento de FDNfe pode resultar em acidose ruminal. Associado à acidose ruminal, pode ocorrer a acidificação sanguínea, devido a alta carga de componentes ácidos gerados no rúmen, que após serem absorvidos, atingem a corrente sanguínea e reduzem o pH dos fluídos corpóreos (PONCE e HERNANDES, 2005). Além da deficiência de nutrientes, a acidificação sanguínea também foi associada com a ocorrência de LINA (MARQUES et al., 2011; MARTINS et al., 2015a,b). A acidificação do sangue estimula a síntese e a ação do hormônio da paratireoide (PTH) e da vitamina D, que são responsáveis por aumentar a absorção intestinal e a mobilização óssea de cálcio, bem como reduzir a excreção de cálcio pela urina, o que resulta em aumento da retenção de cálcio para compensar os compostos acidogênicos em excesso no sangue, que pode resultar em acidose metabólica (BLOCK, 1994). Como consequência da maior retenção de cálcio, ocorre maior secreção deste mineral no leite, uma vez que a concentração deste mineral no leite varia de acordo com a concentração no sangue (MARTINS et al., 2015b). Como o cálcio livre foi a principal alteração associada à ocorrência de LINA, a acidificação sanguínea também pode reduzir a estabilidade do leite por meio do aumento da concentração de cálcio livre no sangue, e, consequentemente, no leite (MARTINS et al., 2015a).

Desta forma, tanto o excesso, por meio da acidose metabólica decorrente da acidose ruminal, quanto à deficiência de nutrientes podem alterar a estabilidade do leite (FISCHER et al., 2012). Portanto, para prevenir a ocorrência de leite de baixa estabilidade sem acidez resultante de ação microbiana, a elevada demanda nutricional das vacas em lactação deve ser atendida com a utilização de alimentos concentrados; porém, medidas como o adequado fornecimento de FDNfe, CNF e/ou uso de tamponantes e/ou alcalinizantes na dieta das vacas leiteiras, devem ser considerados para evitar acidificação no fluído ruminal que podem resultar em desequilíbrio do

sistema ácido/base do sangue. Adicionalmente, alterações de ingredientes volumosos e/ou concentrados e/ou de suplementos minerais sem adaptação prévia também devem ser evitadas para prevenir problemas digestivos (FISCHER et al., 2012), alterações no BCAD, e, consequentemente, problemas de LINA.

Diversos fatores influenciam o pH ruminal, tais como o teor de FDN da dieta, o tamanho das partículas do volumoso (indicado pela FDN fisicamente efetiva - FDNfe), a degradabilidade ruminal dos CNF, uso de coprodutos da agroindústria ou de lipídios, as condições adequadas para ruminação (conforto), o uso de tamponantes/alcalinizantes, a qualidade da mistura (quando se fornece concentrado misturado ao volumoso) e o nível individual de consumo.

As vacas em lactação necessitam consumir diariamente quantidades mínimas de fibra para estimular a atividade de mastigação, o que mantém o fluxo de saliva relativamente adequado para evitar com que o pH ruminal permaneça baixo por longos períodos do dia (GONÇALVES, BORGES e FERREIRA, 2009). Uma vaca leiteira pode secretar 150 a 200 L de saliva diariamente, o que representa 1,8 a 2,5 kg de bicarbonato por dia, que vai auxiliar adequada manutenção de pH ruminal. A deficiência de fibra para ruminação pode limitar a produção de saliva e consequentemente o fluxo de bicarbonato, o que pode resultar em acidose ruminal. De acordo com o NRC (2001), a concentração mínima de FDN da dieta deve ser de 25% da matéria seca (MS), desde que 75% da FDN total seja oriunda da forragem (FDNf), ou seja, 19% de FDN de origem de forragem, e CNF menor que 44% da MS.

As alterações no pH sanguíneo também podem ocorrer por outros fatores dietéticos e, ainda, não dietéticos. Entre os fatores dietéticos, as alterações do balanço cátion-aniônico da dieta influenciam diretamente o pH sanguíneo. O balanço cátion-aniônico da dieta (BCAD) pode ser entendido como a diferença entre os minerais catiônicos (sódio e potássio) e os aniônicos (cloro e enxofre). Os minerais catiônicos contribuem para aumentar o pH do sangue, enquanto que os aniônicos provocam a sua redução (BLOCK, 1994). Com o objetivo de estudar o efeito da acidificação sanguínea sobre a concentração de cálcio iônico e estabilidade do leite, Marques et al. (2011) incluíram sal aniônico em dietas de vacas leiteiras em lactação mantidas em sistema de pastejo, e como resultado relataram aumento da concentração de cálcio iônico e redução da estabilidade do leite. Em um estudo recente, Martins et al. (2015b) relataram que mesmo que o BCAD permaneça positivo (com excesso de cátions em relação aos ânions), alterações no pH sanguíneo e na estabilidade do leite podem ocorrer. Ao reduzir o BCAD de 290 para 192

miliequivalente/kg de MS, o pH sanguíneo reduziu de 7,49 para 7,44, o bicarbonato sanguíneo de 30,84 para 26,34 (mmol/L), e as bases em excesso no sangue (relação cátions/ânions) de 7,63 para 3,16, enquanto que o cálcio iônico sanguíneo aumentou de 1,13 para 1,18 (mmol/L). Estas alterações sanguíneas refletiram diretamente na estabilidade do leite, uma vez que ao reduzir o BCAD de 290 para 192 miliequivalente/kg de MS, foi observado que a concentração de etanol na solução alcoólica (teste do etanol) necessária para provocar coagulação reduziu de 78 para 76%.

Este resultado indicou que grandes alterações no BCAD devem ser evitadas durante a lactação, pois cada alteração significativa resulta em necessidade da vaca em se readaptar a nova condição metabólica, o que envolve principalmente o metabolismo do cálcio, que está diretamente associado à estabilidade do leite. Normalmente, não existem dificuldades para trabalhar com dietas de BCAD elevado, principalmente em sistemas de pastejo, nas quais a concentração de potássio nas pastagens é elevada especialmente na fase inicial de sua utilização. No entanto, na medida em que as forragens se aproximam do final do ciclo produtivo, o teor de potássio é reduzido, e alterações significativas no BCAD podem ocorrer, especialmente em períodos de escassez de pastagens.

Distúrbios metabólicos que alteram o equilíbrio ácido-base do sangue também foram associados com a ocorrência de LINA. Em um estudo conduzido com 96 vacas leiteiras, de 6 fazendas diferentes localizadas no estado do Paraná, foi descrito que das amostras de LINA, 65,52% eram oriundas de vacas com algum distúrbio metabólico (FAGNANI; BELOTI; BATTAGLINI, 2014). Os distúrbios metabólicos descritos neste estudo foram: acidose respiratória, acidose metabólica, alcalose respiratória, alcalose metabólica, acidose respiratória mais alcalose metabólica, alcalose respiratória mais acidose metabólica.

Stumpf et al. (2013) conduziram estudo com o objetivo de aumentar a estabilidade do leite com a inclusão de bicarbonato de sódio (40 g/d) ou citrato de sódio (100 g/d) na dieta (70% de volumoso e 30% de concentrado) de vacas leiteiras produzindo 9,8 l/d. Como resultado, estes autores não observaram efeito dos aditivos sobre as variáveis respostas. Este resultado pode ser atribuído à elevada relação volumoso:concentrado (70:30) da dieta, uma vez que o baixo teor de CNF deve ter contribuído muito pouco com acidificação ruminal, o que não justifica o uso de aditivos para reduzir efeitos de acidificação ruminal e, conseqüentemente, metabólica.

2.4.1.3. Associação entre estabilidade térmica e alcoólica do leite

Molina et al. (2001); Chavez et al. (2004), Fischer et al. (2012) e Martins et al. (2015a) relataram que o teste do etanol apresenta baixa associação com o teste de tempo de coagulação durante o aquecimento do leite à 140°C utilizando capilares de vidros ($r = 30$ à 45). No entanto, o teste do etanol ainda é a opção mais prática e econômica de se estimar a estabilidade térmica do leite, além de que, o teste de tempo de coagulação também não é uma medida direta da estabilidade do leite durante o processamento industrial e não há estudos que determinaram o tempo mínimo para a coagulação neste teste que garanta adequado processamento do leite. Porém, a baixa associação entre os resultados do teste do etanol e a estabilidade ao leite ao tratamento térmico indica que uma parcela do leite condensado no teste do etanol poderia resistir ao tratamento térmico empregado pela indústria. Além disso, leite com baixa estabilidade térmica para processamentos intensos, como UAT, poderia ser destinado para produção de outros derivados que necessitam tratamentos térmicos menos intensos, como a pasteurização e a produção de queijos, uma vez que a uma limitação de utilização do LINA para a indústria é quanto ao grau de resistência térmica (FISCHER et al., 2012). No entanto, para isto a estabilidade do leite precisa ser estimada com alta confiabilidade.

Os primeiros estudos realizados no início do século 20 para avaliação do teste do etanol para estimar a estabilidade durante o processamento industrial já demonstraram resultados controversos. Dahlberg e Garner (1921) avaliaram 90 amostras e constataram que 45 coagularam no teste do álcool. Destas 45 que coagularam, 43 apresentaram evidências de coagulação durante o processamento de evaporação e esterilização do leite à 112,8°C, enquanto que das demais 45 que não coagularam no teste do álcool, apenas 3 apresentaram problemas de coagulação durante os processamentos de esterilização e evaporação. Contrariamente, Ramsdell et al. (1931) demonstraram que apenas metade das amostras que coagularam no TEA apresentaram algum problema durante a condensação e evaporação do leite, sugerindo subjetividade no teste do álcool para estimar a estabilidade durante o processamento (RAMSDELL et al., 1931).

Além do teste do etanol poder apresentar baixa confiabilidade para estimar a estabilidade térmica do leite, muitas indústrias utilizam elevada concentração de etanol (80 e até mesmo 84%) na solução alcoólica, com o objetivo de captar leite de “maior” estabilidade. Este procedimento

aumenta o volume de leite descartado/penalizado pela indústria, mas pode não garantir necessariamente a estabilidade desejada pela baixa correlação entre teste do etanol e estabilidade térmica (FISCHER et al., 2012). Devido ao baixo custo e facilidade de operação, o teste do etanol ainda é a única forma rápida e fácil que está disponível de mensurar a estabilidade do leite, visando garantir a adequada estabilidade, uma vez se o leite coagular durante o processamento térmico, os equipamentos precisam ser higienizados e o leite descartado. Estudos precisam ser conduzidos com o objetivo de indicar um nível de etanol na solução alcóolica como limite de corte que possa garantir um processamento adequado (pasteurização, UAT, leite em pó, etc.), ou, até mesmo, indicar métodos alternativos ao teste do etanol para estimar a estabilidade do leite de forma mais confiável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, L. J.; STEWART, A. J.; MACKINLAY, A. G.; KAPELINSKAYA, T. V.; TKACH, T. M.; GORODTSKY, S. I. Isolation and characterization of the bovine kappa-casein gene. **European Journal Biochemistry**, v. 178, n. 2, p. 395-401, 1988.
- ALLEN, M. S. Fiber requirements: finding an optimum can be confusing. **Feedstuffs**, v.67, n.19, p.13-16, 1995.
- ARMENTANO, L. E.; BERTICS, S. J.; DUCHARME, G. A. Response of lactating cows to methionine or methionine plus lysine added to high protein diets based on alfalfa and heated soybeans. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.1194–1199, 1997.
- BARBOSA, R. S.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M. E. R.; ZANELA, M.B.; STUMPF, M. T.; KOLLING, G. J.; SCHAFFHÄUSER JÚNIOR, J.; BARROS, L. E.; EGITO, A. S. Caracterização eletroforética de proteínas e estabilidade do leite em vacas submetidas à restrição alimentar. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.47, n.4, p.621-628, 2012.
- BARROS, L.; DENIS, N.; GONZALEZ, A.; NÚÑEZ, A. Prueba del alcohol em leche y relación con calcio iónico. **Revista Prácticas Veterinarias**, v.9, p.315, 1999.
- BERTHIAUME, R.; THIVIERGE, M. C.; PATTON, R. A.; DUBREUIL, P.; STEVENSON, M.; McBRIDE, B. W.; LAPIERRE, H. Effect of ruminally protected methionine on splanchnic metabolism of amino acids in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.1621–1634, 2006.

- BOBE, G.; BEITZ, D. C.; FREEMAN, A. E. et al. Effect of milk protein genotypes on milk protein composition and its genetic parameter estimates. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.12, p.2797-2804, 1999.
- BOBE, G.; FREEMAN, A. E.; LINDBERG, G. L.; BEITZ, D. C. The influence of milk protein phenotypes on fatty acid composition of milk from Holstein cows. **Milchwissenschaft**, v.59, n.1, p.3-6, 2004.
- BOTARO, B. G.; LIMA, Y. V. R.; CORTINHAS, C. S.; PRADA e SILVA, L. F.; RENNO, F. P.; SANTOS, M. V. Effect of the kappa-casein gene polymorphism, breed and seasonality on physicochemical characteristics, composition and stability of bovine milk. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.12, p.2447-2454, 2009.
- BRODERICK, G. A.; STEVENSON, M. J.; PATTON, R. A.; LOBOS, N. E.; OLMOS COLMENERO, J. J. Effect of supplementing rumen-protected methionine on production and nitrogen excretion in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.1092–1102, 2008.
- BRODERICK, G. A.; REYNAL, S. M. Effect of source of rumen-degraded protein on production and ruminal metabolism in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.2822-2834, 2009.
- BRODERICK, G. A.; STEVENSON, M. J.; PATTON, R. A. Effect of dietary protein concentration and degradability on response to rumen-protected methionine in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.6, p.2719–2728, 2009.
- CALLISON, S. L.; FIRKINS, J. L.; EASTRIDGE, M. L.; HULL, B. L. Site of nutrient digestion by dairy cows fed corn of different particle sizes or steam-rolled. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.1458–1467. 2001.
- CARMO, C. A.; BATISTEL, F.; SOUZA, J.; MARTINEZ, J. C.; CORREA, P.; PEDROSO, A. M.; SANTOS, F. A. P. Starch levels on performance, milk composition and energy balance of lactating dairy cows. **Tropical and Animal Health Production**, v.47, p.179-184, 2015.
- CHAVEZ, M. S.; NEGRI, L. M.; TAVERNA, M. A.; CUATRÍN, A. Bovine milk composition parameters affecting the ethanol stability. **Journal of Dairy Research**, v. 71, n.2, p.201-206, 2004.
- CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIET, D. **Proteínas alimentarias: bioquímica - propiedades funcionales - Valor nutritivo - Modificaciones químicas**. Zaragoza: Acribia Editorial, 1989. 346p.
- CLARK, J. H.; KLUSMEYER, T. H.; CAMERON, M. R. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.2304–2323, 1992.
- CREAMER, L. K.; PLOWMAN, J. E.; LIDDELL, M. J.; SMITH, M. H.; HILL, J. P. Micelle stability: α -casein structure and function. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 3004-3012, 1998.

CZERKAWSKI, J. W. Chemical composition of microbial matter in the rumen. **Journal of Science and Food Agriculture**, v.27, p.621–632, 1976.

CYRIAC, J.; RIUS, A.G.; MCGILLIARD, M.L.; PEARSON, R.E.; BEQUETTE, B.J.; HANIGAN, M.D. Lactation Performance of Mid-Lactation Dairy Cows Fed Ruminally Degradable Protein at Concentrations Lower Than National Research Council Recommendations. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.4704-4713, 2008.

DAHLBERG, A. O.; H. S. GARNER. The alcohol test as a means of determining quality of milk for condenseries. Bulletin No. 944, US Dept. of Agriculture. Government Printing Office, Washington, DC, 1921.

DANES, M. A. C.; CHAGAS, L. J.; PEDROSO, A. M.; SANTOS, F. A. P. Effect of protein supplementation on milk production and metabolism of dairy cows grazing tropical grass. **Journal of Dairy Science**, v.96, n.1, p.407–419, 2013.

DE KRUIF, C. G.; HUPPERTZ, T.; URBAN, V. S.; PETUKHOV, A. V. Casein micelles and their internal structure. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.71–172, p.36–52, 2012.

DI MARTINS, A. **Proteínas do leite na fabricação de queijos**. Tecnologia de Fabricação de Queijos – UEG. Publicado online em 15 de março de 2009. Disponível em: <http://tecnologiadefabricacaodequeijo.blogspot.com.br/2009/03/proteinas-do-leite-na-fabricacao-de.html>. Acessado em: 03 março 2014.

FAGNANI, R.; BELOTI, V.; BATTAGLINI, A. 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.

FEAGAN, J. T.; GRIFFIN, A. T.; LLOYD, G. T. Effects of Subclinical Mastitis on Heat Stability of Fluid Milk. **Journal of Dairy Science**, v.49, n.8, p.933-939, 1966.

FIRKINS, J. L.; EASTRIDGE, M. L.; St-PIERRE, N. R.; NOFTSGER, S. M. Effects of grain variability and processing on starch utilization by lactating dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v.79 (E- Suppl.): E218–E238, 2001.

FISCHER, V.; RIBEIRO, M. E. R.; ZANELA, M. B.; MARQUES, L. T.; ABREU, A. S.; MACHADO, S. C.; FRUSCALSO, V.; BARBOSA, R. S.; STUMPF, M. T. Leite instável não ácido: um problema solucionável? **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.13, n.3, p.838-849, 2012.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle da mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.

FOX, P. F.; O'CONNOR, T. P.; MCSWEENEY, P. L. H.; GUINEE, T. P. E.; O'BRIEN, N. M. Cheese: physical, biochemical and nutritional aspects. **Advance Food Nutrition Research**, v. 39, p. 163-328, 1996.

- GALYEAN, M. L.; TEDESCHI, L. O. Predicting microbial protein synthesis in beef cattle: relationship to intakes of total digestible nutrients and crude protein. **Journal of Anim Science**, v.92, n.11, p.5099-111, 2014.
- HALL, M. B.; LEWIS, B. A.; VAN SOEST, P. J.; CHASE, L. E. A simple method for estimation of neutral detergent-soluble fiber. **Journal of Science and Food Agriculture**, v.74, p.441-449, 1997.
- HAMBLING, S. G.; MCALPINE, A. S.; SAWYER, I. **Beta-lactoglobulin**. In: FOX, P. F. (Ed). **Advanted dairy chemistry**. London: Elsevier Applied Science, 1992. v.1, p.141-189.
- HATFIELD, R. D.; WEIMER, P. J. Degradation characteristics of isolated and in situ cell wall lucerne pectic polysaccharides by mixed ruminal microbes. **Journal of Science and Food Agriculture**, v.69, p.185-196, 1995.
- HOLT, C. An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein micelles and its application to the calculation of the partition of salts in milk. **European Biophysics Journal**, v.33, n.5, p.421-434, 2004.
- HOLT, C.; CARVER, J. A.; ECROYD, H.; THORN, D. C. Invited review: caseins and the casein micelle: their biological functions, structures, and behavior in foods. **Journal of Dairy Science**, v.96, n.10, p. 6127-6146, 2013.
- HUHTANEN, P.; VANHATALO, A.; VARVIKKO, T. Effects of abomasal infusions of histidine, glucose, and leucine on milk production and plasma metabolites of dairy cows fed grass silage diets. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.204–216, 2002.
- IPHARRAGUERRE, I. R.; CLARK, J. H. Varying Protein and Starch in the Diet of Dairy Cows. II. Effects on Performance and Nitrogen Utilization for Milk Production. **Journal of Dairy Science**. v.88, n.7, p.2556–2570, 2005.
- JEURNINK, T. J. M.; DE KRUIF, C. G. Calcium concentration in milk in relation to heat stability and fouling. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v.49, p.151–165, 1995.
- HORNE, D. Ethanol Stability and Milk Composition. In: **Advanced Dairy Chemistry**. V1B, Proteins. MAC SWEENEY, P. L. H.; O'MAHONY, J. A.; FOX, P. F. Springer Science+Business Media, New York, 2016. p.225-246
- SANTOS, F. A. P. Metabolismo de proteínas. In. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal (Brazil): Funep. 2006. p.538-601.
- JESUS, E. F.; CONTI, L. H. A.; TOMAZI, T.; MIGLIANO, M. E. D.; PRADA e SILVA, L. F.; RENNO, F. P.; SANTOS, M. V. Intake, Nutrient Digestibility and Milk Yield of Dairy Cows Fed Urea and Two Levels of Crude Protein in Diets with Sugar Cane. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.11, p.4135-4142, 2012.
- KONTOPIDIS, G.; HOLT, C.; SAWYER, L. Invited review: beta-lactoglobulin: binding properties, structure and function. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.4, p.785-796, 2004.

KNOWLTON, K. F.; GLENN, B. P.; ERDMAN, R. A. Performance, ruminal fermentation, and site of starch digestion in early lactation cows fed corn grain harvested and processed differently. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.12, p.1972-1984, 1998.

KREIKEMEIER, K. K.; HARMON, D. L.; BRANDT, R. T.; AVERY Jr., T. B.; JHONSON, D. B. Small intestinal starch digestion in steers: effect of various levels of abomasal glucose, corn starch and corn dextrin infusion on small intestinal disappearance and net glucose absorption. **Journal of Animal Science**, v.69, n.1, p.328-338, 1991.

LEE, C.; HRISTOV, A. N.; CASSIDY, T. W.; HEYLER, K. S.; LAPIERRE, H.; VARGA, G. A.; VETH, M. J.; PATTON, R. A.; PARYS, C. Rumen-protected lysine, methionine, and histidine increase milk protein yield in dairy cows fed a metabolizable protein-deficient diet. **Journal of Dairy Science**, v.95, n.10, p.6042-6056, 2012.

LI, S. S.; SHEN, J. S.; REN, D. X.; LIU, J. X. Effects of the processing methods of corn grain and soybean meal on milk protein expression profiles in dairy cows. **Animal**, v.9, n.2, p.267-274, 2014.

LOZANO, O.; THEURER, C. B.; ALIO, A.; HUBER, J. T.; DELGADO-ELORDUY, A.; CUNEO, P.; DEYOUNG, D.; SADIK, M.; SWINGLE, R. S. Net absorption and hepatic metabolism of glucose, L-lactate and volatile fatty acids by steers fed diets containing sorghum grain processed as dry-rolled or steam-flaked at different densities. **Journal of Animal Science**, v.78, n.5, p.1364-1375, 2000.

MACHADO, S. C. **Fatores que alteram a estabilidade do leite**. 2010. 191 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

MARQUES, L. T.; FISCHER, V.; ZANELA, M. B.; STUMPF JÚNIOR, W.; RIBEIRO, M. E. R.; VIDAL, L. E. B.; RODRIGUES, C. M.; PETERS, M. D. Suplementação de vacas holandesa em estágio avançado de lactação. **Ciência Rural**, v.40, n.6, p.1392-1398, 2010.

MARQUES, L. T.; FISCHER, V.; ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R.; STUMPF JUNIOR, W.; RODRIGUES, C. M. Produção leiteira, composição do leite e perfil bioquímico sanguíneo de vacas lactantes sob suplementação com sal aniônico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.5, p.1088-1094, 2011.

MARQUES, L. T.; ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R.; STUMPF JUNIOR, W.; FISCHER, V. Ocorrência do leite instável ao etanol 76% e não ácido (lina) e efeito sobre os aspectos físico-químicos do leite. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.13, n.1, p.91-97, 2007.

MARTINS, C. M. M. R.; ARCARI, M. A.; WELTER, K. C.; SARAN NETO, A.; OLIVEIRA, C. A. F.; SANTOS, M. V. Effect of dietary cation-anion difference on performance of lactating dairy cows and stability of milk proteins. **Journal of Dairy Science**, v.98, p.2650-2661, 2015a.

MARTINS, C. M. M. R.; ARCARI, M. A.; WELTER, C. K.; GONÇALVES, J. L.; SANTOS, M. V. Effect of dietary cation-anion difference on ruminal metabolism, total apparent digestibility,

blood and renal acid-base regulation in lactating dairy cows. **Animal: An International Journal of Animal Bioscience**, p.1-11. doi:10.1017/S1751731115001548. 2015b.

MIKHEEVA, A. L. M.; GRINBERG, N. V.; GRINBERG, V. Y.; KHOKHL, O. V. A. R.; De KRUIF, C. G. Thermodynamics of micellization of bovine α -casein studied by high-sensitivity differential scanning calorimetry. **Langmuir**, v.19, p.2913-2921, 2003.

MIGLIANO, M. E. D. A.; SILANO, C.; MARTINS, C. M. M. R.; ARCARI, M. A.; SANTOS, M. V. Effect of dietary nitrogen source and crude protein content on nitrogen balance and lactating performance of dairy cows. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, aceito para publicação em 18 de setembro de 2015.

MOLINA, L. H.; GONZÁLES, R.; BRITO, C.; CARRILLO, B.; PITO, M. Correlation between heat stability and alcohol test of milks at a milk collection center. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.33, p.233-240, 2001.

MURRAY, R. K. **Harper bioquímica**. 9 ed. São Paulo: Atheneu, 2001. 917p.

NEVILLE, M. C. Calcium Secretion into Milk. **Journal of Mammary Gland Biology Neoplasia**, V.10, n.2, 2005.

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

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7. rev. ed. Washington, DC.: Natl.Acad. Sci., 2001. 381p.

OBA, M.; ALLEN, M. S. Effect of corn grain conservation method on ruminal digestion kinetics for lactating dairy starch concentration. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.1, p.184-194, 2003.

OLIVEIRA, D. S.; TIMM, C. D. Instabilidade da caseína em leite sem acidez adquirida. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, n. 561-562, p. 17-22, 2007.

OLIVEIRA, C.A.F.; LOPES, L.C.; FRANCO, R.C.; CORASSIN, C.H. Composição e características físico-químicas do leite instável não ácido recebido em laticínio do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.12, n.2, p.508-515, 2011.

OLIVEIRA, C. A. F.; LOPES, L. C.; ROSIM, R. E.; FERNANDES, A. M.; CORASSIN, C. H. Composition, somatic cell count and casein fractions of ethanol unstable milks. **Acta Scientiarum. Technology**, v.35, n.1, p.153-156, 2013.

ORELLANA R., PULIDO P., BRIONES M., SARABIA A. Purine Derivatives/Creatinine Ratio as an Index of Microbial Protein Synthesis in Lactating Holstein Cows. In: Makkar H.P.S., Chen X.B. (eds). Estimation of Microbial Protein Supply in Ruminants Using Urinary Purine Derivatives. Springer, Dordrecht. 2004.

ORSKOV, E. R. Starch digestion and utilization in ruminants. **Journal of Animal Science**, 63:1624–1633. 1986.

PATTON, R. A. Effect of rumen-protected methionine on feed intake, milk production, true milk protein concentration, and true milk protein yield, and the factors that influence these effects: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.2105–2118, 2010.

PEREIRA, M. N.; VON PINHO, R. G.; BRUNO, R. G.; CELESTINE, G. A. Ruminant degradability of hard or soft texture corn grain at three maturity stages. **Scientia Agricola**, v.61, n.4, p.358-363, 2004.

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

RAMSDELL, G. A.; JOHNSON Jr, W. T.; EVANS, F. R. A test for the detection of milk unstable to heat. **Journal of Dairy Science**, v.14, p.93–106, 1931.

RECKTENWALD, D. A.; ROSS, D. A.; FESSENDEN, S. W.; WALL, C. J.; VAN AMBURGH, M. E. Urea-N recycling in lactating dairy cows fed diets with 2 different levels of dietary crude protein and starch with or without monensin. **Journal of Dairy Science**, v.97, p.1611-1622, 2014.

RIJNKELS, M. Multispecies comparison of the casein gene loci and evolution of casein gene family. **Journal of Mammary Gland Biology Neoplasia**, v.7, n.3, p.327-345, 2002.

ROBINSON, P. H. Impacts of manipulating ration metabolizable lysine and methionine levels on the performance of lactating dairy cows: A systematic review of the literature. **Livestock Science**, v.127, p.115–126, 2010.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri, SP: Manole. 2007. 314p.

SANTOS, F. A. P.; SANTOS, J. E. P.; THEURER, C. B. Effects of Rumen-Undegradable Protein on Dairy Cow Performance: A 12-Year Literature Review. **Journal of Dairy Science**, v.81, v.12, p.3182-3213, 1998.

SANTOS, F. A. P. Metabolismo de proteínas. In: **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal (Brazil): Funep. 2006. p.538-601.

SCHMIDT, F. A. **Efeito do suprimento das exigências de energia e/ou proteína na recuperação da instabilidade do leite ao teste do etanol**. 2014. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2014.

SCHMIDT, J.; SIPOCZ, P.; CENKVARI, E.; SIPOCZ, J. Use of protected methionine (Mepron M 85) in cattle. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.47, p.409–418, 1999.

SCHWAB, C. G.; HUHTANEN, P.; HUNT, C. W.; HVELPLUND, T. Nitrogen Requirements of Cattle. Pages 13–70. In: Nitrogen and Phosphorus Nutrition of Cattle and Environment. Pfeffer, E.; Hristov, A. N. Ed. CAB International, Wallingford, UK. 2005.

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

SINGH, H.; FOX, P. Heat stability of milk: role of β -lactoglobulin in the pH-dependent dissociation of micellar κ -casein. **Journal of Dairy Research**, v.54, p.509-521, 1987.

STORM, E.; ORSKOV, E. R. The nutritive value of rumen micro-organisms in ruminants. 1. Large-scale isolation and chemical composition of rumen micro-organisms. **British Journal of Nutrition**, v.50, p.463-470, 1983.

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

SWAISGOOD, H. E. **Chemistry of the caseins**. In: FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (Ed.). Advanced dairy chemistry. 3rd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, v.1 2003.

SWEETSUR, A. W. M.; MUIR, D. D. Role of cyanate ions in the urea-induced stabilization of the caseinate complex in skim-milk. **Journal of Dairy Research**, v.48, n.1, p.163-166, 1981.

TEDESCHI, L. O.; FOX, D. G.; FONSECA, M. A.; CAVALCANT, L. F. L. Invited Review: Models of protein and amino acid requirements for cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.44, n.3, p.109-132, 2015;

THEURER, C. B., J. T. HUBER, A. DELGADO-ELORDUY e R. WANDERLEY. Invited review: Summary of steam-flaking corn or sorghum grain for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.1950-1959, 1999.

VAZ PIRES, A.; SUSIN, I.; SANTOS, F. A. P.; MENDES, C. Q.; OLIVEIRA JUNIOR, R. C.; FERNANDES, J. J. R.; SIMAS, J. M. C. Efeito de fontes e formas de processamento do amido sobre o desempenho e o metabolismo do nitrogênio em vacas holandesas em lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.8, p.1456-1462, 2008.

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

WHITE, R. R.; HALL, M. B.; FIRKINS, J. L.; KONONOFF, P. J. Physically adjusted neutral detergent fiber system for lactating dairy cow rations, II: Development of feeding recommendations. **Journal of Dairy Science**, v.100, n.12, p. 9569-9584, 2017.

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

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

ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R.; FISHER, V. Leite Instável Não Ácido (LINA): Do Campo A Industria. In: VI CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE. 2015, Curitiba. Anais... Curitiba: Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite, 2015.

ZEBELI, Q.; TAJAJ, M.; STEINGASS, H.; METZLER, B.; DROCHNER, W. Effects of Physically Effective Fiber on Digestive Processes and Milk Fat Content in Early Lactating Dairy Cows Fed Total Mixed Rations. **Journal of Dairy Science**, v.89, n.2, p.651-668, 2006.

3 EFEITO DA RELAÇÃO PDR:PNDR E DO TIPO DE PROCESSAMENTO DO MILHO SOBRE O METABOLISMO DIGESTIVO, DESEMPENHO PRODUTIVO E ESTABILIDADE DO LEITE BOVINO

3.1 RESUMO

O presente estudo objetivou avaliar o efeito da relação PDR:PNDR e do tipo de processamento do milho sobre o desempenho produtivo, estabilidade do leite ao teste do etanol (TEA), tempo de coagulação (TC) do leite a 140°C, e a eficiência de utilização dos nutrientes para vacas leiteiras. Foram usadas 20 vacas Holandesas, com média de 162 ± 70 dias em lactação, 666 ± 7 kg de peso corporal e 36 ± 7.8 kg/d de produção de leite, as quais foram distribuídas em delineamento quadrado latino com 5 quadrados contemporâneos balanceados, 4 períodos de 21 d e 4 tratamentos (arranjo fatorial 2×2). O fator 1 correspondeu ao processamento do milho (moído -MM em peneira de 2 mm ou floculado - MF), e o fator 2 à relação de PDR:PNDR (Alta: 107 g de PDR/kg MS e 51 g de PNDR/kg MS, Baixa: 95 g de PDR/kg MS e 63 g de PNDR/kg MS). Houve interação entre relação PDR:PNDR e processamento do milho sobre o CMS. Quando as vacas foram alimentadas com MM e baixa relação PDR:PNDR o CMS aumentou em 1,24 kg/d em relação às vacas alimentadas com MM e alta relação PDR:PNDR. No entanto, não houve efeito da relação PDR:PNDR sobre o CMS, quando as vacas foram alimentadas com MF. Interação similar foi observada sobre a produção de leite, TC, teor de lactose do leite e excreção de N na urina. As vacas alimentadas com MM aumentaram em 2,3 kg/d a produção de leite, apresentaram maior TC e teor de lactose do leite quando a relação PDR:PNDR da dieta foi baixa, em comparação com a alta relação PDR:PNDR. No entanto, não houve efeito da relação PDR:PNDR sobre estas variáveis quando foi incluído MF nas dietas. A utilização de MF aumentou a digestibilidade da MS e do amido, resultou em maior eficiência produtiva, e reduziu o teor de β -caseína (CN) da proteína do leite, do que a utilização de MM na dieta. As vacas alimentadas com baixa relação PDR:PNDR tiveram maior teor de κ -CN glicosilada e maior estabilidade ao TEA, bem como maior teor de proteína do leite, produção de leite corrigida para gordura e eficiência de utilização do N dietético para produção de leite, do que as alimentadas com alta relação PDR:PNDR. Portanto, a redução do teor de β -CN e o aumento da proporção de κ -CN glicosilada estão associadas com o aumento da

estabilidade térmica e ao TEA, possivelmente decorrentes do total de nutrientes consumidos e da quantidade e perfil de aminoácidos disponíveis para síntese de proteínas do leite.

Palavras-chave: Caseína. Eficiência produtiva. Glicosilação. LINA. Teste do etanol.

3.2 ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the effect of rumen-degradable protein (RDP):rumen-undegradable protein (RUP) ratio and corn processing on lactating performance, milk protein composition, milk ethanol stability (MES), heat coagulation time (HCT) at 140°C and the efficiency of nutrient utilization for dairy cows. Twenty Holstein cows with an average of 162 ± 70 DIM, 666 ± 7 kg body weight and 36 ± 7.8 kg/d of milk yield (MY) were distributed in a Latin square design with five contemporaneous balanced squares, four periods of 21 d and four treatments (factorial arrangement 2×2). Factor 1 was corn processing (ground, GC or steam-flaked SFC), and factor 2 was RDP:RUP ratio (High: 107 g RDP/kg DM and 51 g RUP/kg DM or Low: 95 g RDP/kg DM and 63 g RUP/kg DM). A significant interaction was observed between RDP:RUP ratio and corn processing on dry matter intake (DMI). When cows were fed GC and low RDP:RUP ratio, DMI increased by 1.24 kg/d compared to cows fed high RDP:RUP ratio. However, RDP:RUP ratio did not change DMI when cows were fed SFC. Similar interaction was observed on MY ($P = 0.04$), HCT and lactose content. Cows fed GC increased MY by 2.3 kg/d, had higher HCT and lactose content when RDP:RUP ratio was low, compared with high RDP:RUP ratio. However, no effect of RDP:RUP ratio was observed on those variables when cows were fed SFC diets. SFC diets increased DM and starch total tract digestibility and reduced β -casein (CN) percent of total milk protein, compared with GC diets. Cows fed low RDP:RUP ratio diets had higher glycosylated κ -CN content and MES, as well as milk protein content, FCM_{3.5} and efficiency of N for milk production, than cows fed high RDP:RUP ratio diets. Therefore, the reduction of β -CN and increases of glycosylated κ -CN are associated with milk heat stability and MES, probably resulting from total nutrients intake and quantity and profile of amino acids available to milk protein synthesis.

Key-words: Casein. Productive efficiency. Glycosylation. UNAM. Ethanol test.

3.3 INTRODUÇÃO

O teste de estabilidade ao etanol (TEA ou Teste do Alizarol) é utilizado há décadas por indústrias de laticínios para estimar a estabilidade do leite durante o processamento térmico, bem como identificar problemas de acidez do leite, devido a elevado crescimento de mesófilos ou inadequado resfriamento e armazenamento do leite. Nos países que ainda utilizam o TEA como método de triagem para avaliação da qualidade do leite cru, foi relatado que a estabilidade do leite ao teste do etanol depende não apenas da acidificação do leite, pois amostras de leite com alta qualidade higiênica também podem ter problemas de estabilidade, devido a problemas nutricionais, metabólicos (FAGNANI et al., 2013; MARTINS et al., 2015a) ou genéticos das vacas leiteiras (FISCHER et al., 2012). Além disso, a instabilidade do leite também pode ser limitante para a produção de bebidas lácteas alcoólicas devido ao aparecimento de coágulos indesejáveis para comercialização da bebida (FAGNANI et al., 2016).

Entre os fatores nutricionais, a limitação do consumo de nutrientes (MARQUES et al., 2007), especialmente de energia (SCHIMIDT, 2014), reduz a estabilidade do leite ao etanol (BARBOSA et al., 2012; STUMPF et al., 2013). Stumpf et al. (2013) descreveram que com a restrição alimentar, ocorre aumento da permeabilidade das células epiteliais mamárias, o que facilita passagens de íons, como o cálcio iônico. O aumento da concentração de cálcio iônico do leite pode reduzir as cargas negativas das micelas de caseínas e a força de repulsão eletrostática entre elas, o que facilita a coagulação quando há contato da caseína com o etanol (BARROS et al., 1999).

Por outro lado, Barbosa et al. (2012) relataram que amostras de leite instáveis ao etanol tiveram menor teor de kappa-caseína (κ -CN), subunidade de caseína hidrofílica e estável ao cálcio que protege as demais caseínas hidrofóbicas e cálcio sensíveis do contato com a água e ionização com o cálcio (FISCHER et al., 2012). A expressão de subunidades de caseínas do leite pode ser alterada de acordo com a disponibilidade ruminal de amido e proteína (LI et al., 2014) e, portanto, também pode estar associada com menor disponibilidade de energia e de limitação de síntese de proteína microbiana. Desta forma, não está definido se a instabilidade do leite devido à deficiência de nutrientes ocorre em consequência da maior passagem de íons para o leite, ou pela restrição de fornecimento de substratos para a síntese de leite na glândula mamária, como aminoácidos

resultantes da síntese de proteína microbiana e de energia, ambos influenciados pela disponibilidade ruminal de amido.

De outra forma, a acidificação sanguínea (MARTINS et al., 2015a) e ruminal (FISCHER et al., 2012) estão associadas com redução da estabilidade do leite, devido ao aumento do teor de cálcio iônico no sangue e no leite, como resposta metabólica para compensar a acidificação do sangue. Sendo assim, tanto a deficiência quanto o excesso de nutrientes (e.g., amido) podem estar associados à ocorrência de instabilidade do leite ao etanol. Ainda não foram estudados se em ambos os casos (deficiência de nutrientes ou acidose metabólica) a instabilidade do leite ocorre apenas pelo aumento da passagem de cálcio iônico para o leite, ou se demais fatores, como disponibilidade de nutrientes para a glândula mamária, entre eles energia e aminoácidos, podem alterar a síntese das subunidades de caseína tornando a micela mais propensa a coagulação.

Estudos prévios descreveram que os processamentos do milho, como moagem, ensilagem e floculação, sobretudo estes dois últimos, podem aumentar a produção de ácido propiônico, e consequentemente de disponibilidade de energia e de síntese de proteína microbiana (OBA e ALLEN, 2003; VAZ PIRES et al., 2008; CARMO et al., 2015). No entanto, o excesso de fornecimento de amido digestível aumenta o risco de acidose ruminal, podendo reduzir o desempenho produtivo e sanidade do rebanho (CARMO et al., 2015). De outra forma, a relação PDR:PNDR é um dos fatores que afetam o metabolismo microbiano ruminal, sendo que a inclusão de PDR deve otimizar a síntese de proteína microbiana e a de PNDR suprir o restante da exigência de proteína metabolizável não atendido pela proteína microbiana. No entanto, ainda não foi estimada a relação ótima de PDR:PNDR para atingir este objetivo, pois depende da digestibilidade ruminal dos carboidratos, principalmente do amido (WHITE et al., 2017).

Neste estudo, nossas hipóteses foram: 1) a inclusão de milho floculado aumenta a digestibilidade do amido, o fornecimento de energia pela dieta, e com isso resulta em maior acidificação ruminal e menor estabilidade do leite; 2) A relação PDR:PNDR da dieta para otimizar síntese de proteína microbiana depende do tipo de processamento do amido, sendo que em dietas com milho moído o uso de baixa relação aumenta o fornecimento de proteína metabolizável e, consequentemente, a estabilidade do leite; 3) O uso de baixa relação PDR:PNDR, com balanço negativo de PDR no rúmen, não limita a síntese de proteína microbiana em dietas com milho moído, porém limita em dietas com milho floculado; 4) Portanto, em dietas a base de milho floculado, a relação PDR:PNDR não altera a estabilidade do leite, uma vez que a redução da síntese

de proteína microbiana pode ser compensada pelo fornecimento de PNDR, e em dietas a base de milho moído, o fornecimento de PNDR aumenta a estabilidade do leite, considerando que a síntese de proteína microbiana não será limitada neste tipo de dieta. Portanto, o presente estudo objetivou avaliar a interação entre a relação PDR:PNDR e o processamento do milho sobre o metabolismo digestivo, desempenho produtivo e estabilidade do leite de vacas leiteiras em lactação.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento e dietas experimentais

Os procedimentos experimentais com vacas em lactação ocorreram de junho a setembro de 2015, nas instalações do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL - FMVZ/USP). No início do experimento, 20 vacas da raça Holandesa, com 162 ± 70 dias em lactação, peso corporal de 666 ± 68 kg, escore de condição corporal médio de $3,15 \pm 0,48$ e produção média de $36 \pm 7,78$ kg/dia, foram distribuídas em 5 quadrados latinos contemporâneos, com 4 períodos de 21 dias e 4 tratamentos. Dos 21 dias de cada período, os primeiros 14 dias foram destinados à adaptação da dieta e os 7 últimos (período experimental), destinados à coleta de amostras. As dietas foram fornecidas em duas refeições diárias (manhã e tarde), formuladas para atender as exigências nutricionais com base nas recomendações do NRC (2001). As dietas foram compostas de silagem de milho como volumoso; farelo de soja, ureia, grão de soja cru integral, polpa cítrica, milho moído (MM), milho floculado (MF), suplemento mineral e vitamínico, e farelo de soja tratado termicamente a $96,1^{\circ}\text{C}$ por aproximadamente 40 min (SoyPass®, Cargill, Brasil; Tabela 4). O processamento de SoyPass® é baseado em reação não enzimática de Maillard resultante do aquecimento associado a adição de açúcar natural.

Para avaliar o efeito de interação entre a relação PDR:PNDR e processamento do milho sobre as variáveis respostas, utilizou-se no presente estudo 4 tratamentos em arranjo fatorial 2×2 ; fator 1: processamento do milho (MM à 2 mm com tamanho médio de partícula de $1117 \pm 1,35$ μm ou MF com densidade de 280 g/L^{-1}); fator 2: relação PDR:PNDR (Alta: 107 g de PDR/kg MS e 51 g de PNDR/kg MS, Baixa: 95 g de PDR/kg MS e 63 g de PNDR/kg MS). O tamanho de partícula do MM foi obtido por meio do uso de peneiras com 3350, 2360, 1700, 1180, 1000 e 420 μm e calculado por distribuição logarítmica de acordo com os pesos retidos em cada peneira

(BAKER e HERRMAN, 2002). Para o processamento de floculação, a tensão dos rolos e o tempo de floculação foram ajustados para produção de flocos com densidade de 280 g/L, mensurados logo após o processo. O consumo das dietas e de água foram *ad libitum*, de modo a permitir 5 a 10% de sobras das dietas. O volumoso e o concentrado foram misturados manualmente e fornecidos na forma de dieta completa.

Ensaio *in-situ* para determinar as frações de proteína dos alimentos proteicos

As frações proteicas (A, B e C; %PB) e a taxa de degradação (kd) do farelo de soja e do SoyPass® foram determinadas *in situ* (ØRSKOV e McDONALD, 1979) para calcular a relação PDR:PNDR das dietas estudadas. *Bags* de poliéster (10 cm × 20 cm com porosidade de 50-µm) contendo 5 g de cada ingrediente foram alocados em duplicata no rúmen de 2 vacas e retirados após os seguintes tempos de incubação: 0, 1,5, 3, 6, 12, 24 e 48 h. Dois *bags* vazios (branco) também foram incubados em cada tempo de retirada das amostras, com o objetivo de determinar o N residual presente nos *bags* após os processos de incubação, lavagem e secagem dos mesmos. Os *bags* foram lavados em água corrente até a retirada de todo resíduo de conteúdo ruminal dos mesmos. Após lavagem e drenagem do excesso de água, os *bags* foram secos em estufa de ar forçado à 55°C durante 48 h, e então pesados novamente. O teor de PB foi estimado através da concentração total de N × 6,25 (método 990.03; AOAC, 2000). As frações A, B e C foram calculadas por meio da massa inicial da amostra e dos resíduos em cada tempo, de acordo com as equações de Ørskov e McDonald (1979). Os valores de PDR e PNDR foram estimados por meio dos valores das frações A, B, C, e da taxa de passagem (kp) à 8%/h e kd, de acordo com o NRC (2001): $PDR = A + B \times [kd/(kd + kp)]$; e $RUP = C + B \times [kp/(kd + kp)]$.

Digestibilidade ruminal *in-vitro* do amido em 7h de incubação

Foi realizado o ensaio *in vitro* com 7-h de incubação para determinar a digestibilidade do amido (DAiv7h) do MM e MF em fermentador Ankom® (“Daisy-II Fermenter” ANKOM® Technology Corp. Fairport, New York, USA). Primeiramente, as amostras foram moídas a 1-mm e submetidas a análise química para determinar o teor de amido (EHRMAN, 1996). Amostras de MM e MF foram pesadas (0,5g) em *bags* F57 (ANKOM® Technology Corp. Fairport, New York, USA), selados e alocados em recipientes de digestão pré-aquecidos (39° C) e tampão

(MCDUGALL, 1948) com CO₂. O inóculo foi preparado pela amostragem completa (fase sólida e líquida) do fluido ruminal de uma vaca em lactação com cânula ruminal recebendo dieta completa (70% de forragem e 30% de concentrado) composta por silagem de milho, MM, farelo de soja, ureia e suplemento mineral-vitamínico. O conteúdo ruminal foi filtrado em gaze, alocado em garrafas térmicas previamente aquecidas à 39°C, que logo foi filtrado novamente e alocado em vasilhame com CO₂ à 39°C por 30 min para retirada do material flutuante. O inóculo ruminal foi adicionado da solução tampão e as amostras e, posteriormente, incubadas na fermentadora Daisy-II Fermenter por 7 h. Após término da incubação, as amostras foram lavadas com água corrente até total clareamento e secas à 55°C por 72 h. O teor de amido do resíduo de incubação foi determinado de acordo com Ehrman (1996), e o coeficiente de digestibilidade do amido baseado na diferença entre o teor de amido inicial (pré-incubação) e após a incubação.

Tabela 4 - Proporção de ingredientes e composição bromatológica das dietas para vacas leiteiras

Ingrediente, g/kg de MS	Milho Moído ¹		Milho Floculado ²	
	Alta PDR ³	Baixa PDR ⁴	Alta PDR ³	Baixa PDR ⁴
Silagem de milho	495	495	495	495
Milho moído	212	212	-	-
Milho floculado	-	-	212	212
Farelo de soja (FS)	103	91,9	103	91,9
SoyPass [®]	0	44,7	0	44,7
Grão de soja	66,9	66,9	66,9	66,9
Ureia	7,8	2,8	7,8	2,8
Polpa cítrica	84,3	56,3	84,3	56,3
Fosfato bicálcico	2,8	2,8	2,8	2,8
Bicarbonato de Na	8	8	8	8
Sal comum	3,1	3,1	3,1	3,1
Óxido de Mg	1,9	1,9	1,9	1,9
Núcleo Mineral-Vitamínico ⁵	15,1	15,1	15,1	15,1
Composição nutricional das dietas, g/kg				
MS	544	534	541	555
Amido	264	264	261	261
PB	158	157	159	160
PDR, % PB ⁶	67,5	60	67,5	60
PNDR, %PB ⁶	32,5	40	32,5	40
Prot. Metabolizável ⁶	105	115	105	115
Balanço ruminal de PDR, g/d ⁶	191	-69	186	-75
FDN	352	349	356	353
FDNfe ⁷	299	297	302	300
PIDN	19,3	27,9	19,3	27,9
PIDA	9,87	10,6	9,87	10,6
NDT ⁶	692	695	690	694
EL _L ⁶ , Mcal/kg	1,60	1,61	1,59	1,60
FDA	228	227	231	229
EE	29	30	30	31
Lignina	57	60	56	59

¹Milho moído: (DAiv7h = 31,4%). ²Milho floculado (DAiv7h = 40,5%). ³Alta PDR: alta relação de proteína degradável (PDR): não degradável (PNDR) no rúmen = 107 g de PDR/kg MS e 51 g de PNDR/kg MS. ⁴Baixa PDR: baixa relação de PDR:PNDR no rúmen = 95 g de PDR/kg MS e 63 g de PNDR/kg MS. ⁵Composição por kg de produto: 242 g Ca (min), 30 mg Co (min), 1008 mg Cu (min), 80 g S (min), 390 mg F1 (max), 39 g P (min), 60 mg I (min), 20 g Mg (min), 2998 mg Mn (min), 1100 mg monensina sódica (min), 30 mg Se (min), 4032 mg Zn (min), 400,000 UI Vit. A (min), 40,000 UI Vit. D3 (min), 1,450 UI Vit. E (min). ⁶Estimados pelo NRC (2001). ⁷FDNfe = FDN vs % partículas > 4 mm (Maulfair e Heinrichs, 2012). Relação PDR:PNDR: FS = 68:32; SoyPass[®] = 31:69; % PB.

Durante o período experimental, foram coletadas amostras de alimentos, sobras e fezes para determinação da composição bromatológica da dieta, consumo e digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes; amostras de sangue para dosagem de cálcio iônico, proteínas totais, ureia, glicose, enzimas aspartato-aminotransferase (AST) e gama glutamil-transferase (GGT); produção diária de leite e coleta de amostras de leite para determinar a composição físico-química (proteína, gordura, lactose, caseína, nitrogênio ureico – NUL, extrato seco desengordurado e sólidos totais), concentração de caseínas (α , β e κ) e de proteínas do soro (α -lactalbumina e β -lactoglobulina), concentração de cálcio iônico, e estabilidade do leite ao etanol e ao aquecimento a 140°C. Amostras de urina foram coletadas para determinação do pH urinário e do balanço diário de nitrogênio.

Metodologias de coleta de alimentos, sobras da dieta, fezes e urina

Durante os 4 primeiros dias consecutivos de cada período experimental foram coletadas amostras (aproximadamente 0,5 kg/d) dos alimentos fornecidos e sobras das dietas, que foram imediatamente armazenadas a -20°C, até a realização das análises bromatológicas. Amostras de fezes e urina foram coletadas a cada 9 horas, durante os 3 primeiros dias de cada período, totalizando em 24 horas, 8 amostras coletadas a cada 3 horas (00h; 03h; 06h; 09h; 12h; 15h; 18h; 21h): Dia 1: coletas às 09h00min e 18h00min; Dia 2: coletas às 03h00min, 12h00min e 21h00min; Dia 3: coleta às 06h00min, 15h00min e 00h00min (HARVATINE e ALLEN, 2006). Em cada tempo de coleta, aproximadamente 0,5 kg de fezes foi coletado diretamente do reto de cada animal, e imediatamente congelado a -20°C para posterior processamento e realização de análises bromatológicas. De forma semelhante, aproximadamente 200 mL de urina foram amostrados em cada tempo de coleta, por estimulação (massagem) da vulva. Nestas amostras, imediatamente após a coleta, o pH foi medido por potenciometria, e, logo, alíquotas de 20 mL de urina foram diluídas em 80 mL de ácido sulfúrico a 0,036 N e imediatamente foram congeladas a -20°C, para evitar degradação bacteriana dos derivados de purinas, precipitação do ácido úrico, e volatilização do N amoniacal.

Metodologia de análises bromatológicas em alimentos, sobras e fezes

As amostras de alimentos, sobras e fezes foram descongeladas em temperatura ambiente e posteriormente formaram amostras compostas (uma por vaca por período), as quais foram pré-secadas à 65°C em estufa com ventilação forçada, até atingirem peso constante, por no mínimo 72 horas de período de secagem. Após a secagem, as amostras foram moídas em moinho de facas tipo Willey (Marconi® - MOD - 0,48), com o uso de peneiras de crivo 2 mm e 1 mm para posteriores análises de indicador interno e composição química, respectivamente. Neste estudo, as amostras de alimentos frescos, sobras e fezes foram analisadas quanto aos teores de MS (MS; método 930.15; AOAC, 2000), matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM método 942.05; AOAC, 2000), extrato etéreo (EE; método 920.39; AOAC, 2000), proteína bruta (PB; $N \times 6,25$; método 990.03; AOAC, 2000); amido (EHRMAN 1996); fibra em detergente neutro (FDN), usando α -amilase e sem adição de sulfito de sódio ao detergente, e fibra em detergente ácido (FDA), determinados de acordo com Mertens (2002). Adicionalmente, nas amostras de alimentos foram determinados os teores de proteína insolúvel em detergente neutro (PIDN; $N \times 6,25$), proteína insolúvel em detergente ácido (PIDA; $N \times 6,25$) e lignina em detergente ácido (LDA) conforme Van Soest et al. (1991). Desta forma, foram avaliados o consumo de MS, PB, FDN, EE e amido.

Metodologia de estimativa de excreção fecal e digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes

A excreção total de fezes e a digestibilidade da MS e dos nutrientes de cada vaca foi estimada a partir da concentração de fibra em detergente neutro indigestível (FDNi). Para obtenção do teor de FDNi, amostras pré-secadas e moídas a 2 mm de alimentos, sobras e fezes, foram acondicionadas em sacos de tecido não-tecido (TNT 100g/m²), com dimensões de 5 x 5 cm, segundo a relação de até 20 mg de MS/cm² de superfície (NOCEK, 1988). Logo, os saquinhos foram incubados por 288 horas no rúmen de duas vacas da raça Holandesa, previamente adaptadas com dieta completa, com volumoso a base de silagem de milho, de acordo com a metodologia adaptada por Casali et al. (2008). Após o período de incubação, os saquinhos foram retirados do

rúmen, lavados com água corrente até a água parecer translúcida. Posteriormente, os saquinhos foram submetidos ao procedimento de determinação de FDN, utilizando sulfito de sódio.

Metodologia para estimativa da síntese de proteína microbiana

As amostras de urina compostas foram descongeladas à temperatura ambiente, homogeneizadas. Alíquotas das amostras de urina foram obtidas para determinar a concentração de creatinina e derivados de purina. As concentrações urinárias de creatinina foram determinadas em método colorimétrico com uso de kits comerciais e analisador bioquímico semi-automático (Bioclin 100®, Belo Horizonte, MG, Brasil). Para a realização dessa análise, 100 µL de urina foram diluídos em 4900 µL de água ultrapura. A excreção diária de urina foi estimada dividindo-se o valor médio de excreção diária de creatinina, adotada como 24,05 mg/kg de peso corporal (CHIZOTTI et al., 2008), pelos valores observados de concentração de creatinina nas amostras spot de urina (OLIVEIRA et al., 2001).

As concentrações urinárias de alantoína e ácido úrico, bem como alantoína do leite foram determinados por kits comerciais por análise colorimétrica por meio do uso de espectrofotômetro. O índice de derivados de purina foi calculado como: $(DP \text{ concentração molar}) / (Creatinina - \text{concentração molar}) \times kg \text{ PC}^{0,75}$ (ORELLANA et al., 2004). Adicionalmente, a eficiência de produção de DP (DP:CMSd) foi estimada como: $DP / CMSd$, em que CMSd = CMS digestível. O CMSd foi estimado como: $CMS \times \text{Coeficiente de digestibilidade da MS}$. O peso corporal foi medido com balança eletrônica no 21º dia de cada período experimental.

Metodologia de avaliação do peso, produção e composição do leite das vacas

O peso corporal das vacas foi avaliado no sétimo dia de adaptação e ao final de cada período experimental. O peso corporal foi estimado com base na média de duas pesagens sucessivas, feitas antes do fornecimento das alimentações e após as ordenhas durante dois dias. O leite foi pesado

diariamente em medidor eletrônico de fluxo (DeLaval®) da ordenha mecânica e os resultados foram anotados em planilhas. A produção de leite foi corrigida para 3,5% de gordura para posterior avaliação, segundo fórmula descrita no NRC (2001). Em cada período experimental, amostras de leite foram coletadas a partir de dispositivo de coleta de amostra de leite.

Metodologia de análises para composição físico-química do leite

Imediatamente após a coleta, foi determinada a concentração de cálcio iônico nas amostras de leite por potenciômetro com eletrodo seletivo (BARROS, 2001), e pH por potenciometria. As amostras de leite foram coletadas no 1º, 2º e 3º dia de cada período experimental, refrigeradas e conservadas com bronopol, para determinação dos teores de gordura, lactose, sólidos totais, caseína e proteína bruta por absorção infravermelha (BENTLEY 2000: Operator's Manual. Chaska, 1995), e o teor de nitrogênio ureico por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FOSS ANALYTICAL: MilkoScan 6000 FT+: Operator's manual. Foss Analytical, Hillerød, Denmark, 2008). A contagem de células somáticas foi realizada por citometria de fluxo com equipamento Somacount 500® (BENTLEY SOMACOUNT 500: Operator's manual. Chaska, 1995). O teor de extrato seco desengordurado (ESD) do leite foi obtido pela diferença do teor de gordura e de sólidos totais do leite.

Metodologia de análise da estabilidade do leite ao etanol e ao aquecimento térmico a 140°C

Foram coletadas amostras de leite de duas ordenhas diárias, durante os primeiros 2 dias consecutivos de cada período experimental, as quais foram armazenadas por 12 horas, refrigeradas a 6°C e destampadas, para ocorrer à liberação do dióxido de carbono dissolvido, para determinação da estabilidade do leite ao etanol e ao aquecimento térmico a 140°C. O TEA foi realizado nas seguintes concentrações de etanol (v/v): 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82 e 84% v/v de etanol na solução alcoólica. Foram misturados 2 mL de leite e 2 mL de etanol por alguns segundos e feita

avaliação visual da presença ou não de coágulos em placa de Petri. O resultado do TEA (precipitação) correspondeu à menor concentração de etanol em que ocorreu a precipitação da amostra de leite (MARQUES et al., 2011; ZANELA et al., 2006).

Para avaliar a estabilidade do leite ao aquecimento térmico a 140°C, utilizou-se a metodologia de tempo de coagulação (TC), de acordo com Negri et al. (2003). Capilares de vidro (7 cm de comprimento, 0,15 cm de diâmetro externo e 0,1 cm de diâmetro interno) foram preenchidos individualmente com cada amostra de leite, fechados hermeticamente com calor, e submetidos à imersão em glicerina para aquecimento a 140°C. O TC correspondeu ao período de tempo entre a introdução dos capilares no banho com glicerina e o aparecimento dos primeiros sinais de coagulação (NEGRI et al., 2003).

Metodologia de análises das subunidades de caseínas e de proteínas do soro

Foram coletadas amostras de leite representativas de duas ordenhas diárias no 3º e 4º dia de cada período experimental, as quais foram imediatamente congeladas a -20°C até a realização das análises de subunidades de caseína e de proteínas do soro. Foram determinados os teores de subunidades de caseínas (CN; α -CN, β -CN e κ -CN) e de proteínas do soro, α -lactalbumina (α -La) e β -lactoglobulina (β -Lg)), por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme metodologia proposta por Bobe et al. (1998). Para as análises de CLAE, as amostras de leite foram separadas em alíquotas de 500 μ L, as quais foram congeladas a -20° C. Antes das análises, foram acrescentados 500 μ L de solução com 0,1 M de tampão BisTris (pH 6,8), 6 M de cloridrato de guanidina, 5,37 mM de citrato de sódio e 19,5 mM de ditiotriol (pH 7), seguido de agitação por 10 segundos em temperatura ambiente, e repouso durante 1 hora. Após este período, os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 14000 rpm. A camada de gordura foi removida com espátula e o restante da amostra diluída com solução contendo 4,5 M de cloridrato de guanidina em mistura de dois solventes: solvente A (acetonitrila + água + ácido trifluoroacético – 100:900:1) e solvente B (acetonitrila + água + ácido trifluoroacético – 900:100:1).

As amostras foram previamente filtradas através de membrana PTFE (Millipore, USA) de 0,22 μ m e armazenadas a 7° C até as análises cromatográficas. Por fim, 20 μ L de amostra foram

injetados no sistema CLAE, equipado com luz UV, e com coluna Júpiter C18 (4 μ m x 4,6 x 150 mm) (Phenomenex, Torrance, USA). O procedimento de análise foi realizado em temperatura ambiente, de acordo com programa de gradiente de mistura entre os solventes A e B. O procedimento foi iniciado com a mistura do solvente A com 25% do solvente B, aumentando-se gradativamente a proporção do solvente B após injeção da amostra [34% (4 minutos), 48% (11 minutos), 50% (13 minutos) e 100% (17 minutos), e retornando-se nas condições iniciais após 2 minutos], em um fluxo de 1 mL/minuto, com comprimento de onda do detector de 220 nm.

Para interpretação dos resultados das análises de cromatografia, foram utilizadas proteínas padrão do leite purificado bovino (Sigma, USA), preparadas nas mesmas condições descritas para as amostras de leite, para construir a curva de calibração. Os padrões de proteínas foram injetados no sistema CLAE em diferentes concentrações. Para construção da curva de calibração, cada amostra padrão foi injetada 10 vezes, separadamente, no sistema CLAE. O padrão de κ -CN foi identificado em três picos sequenciais: κ -CN 1, 2 e 3, sendo: 1) κ -CN glicosilada; 2) κ -CN não glicosilada variante genético A; 3) κ -CN não glicosilada variante genético B (BOBE et al., 1998). Portanto, o teor total de κ -CN foi obtido pela soma das áreas dos três picos, e os resultados sugestivos de κ -CN glicosilada foram obtidas pelas áreas da κ -CN 1 e não glicosilada por κ -CN 2 e 3.

Metodologia de coleta e análises de variáveis sanguíneas

Foram realizadas coletas de sangue no 1º dia de cada período experimental por punção do complexo coccígeo momentos antes do fornecimento da refeição matinal (5h30min), em tubos de 10 mL com vácuo. As amostras de sangue foram imediatamente centrifugadas, a 3000 rpm durante 15 minutos, para a separação do soro. O soro centrifugado obtido foi transferido para tubos cônicos com capacidade para 2 μ L de amostra, identificados e armazenados a -20°C, até as análises laboratoriais. As análises foram realizadas por método colorimétrico utilizando kits comerciais e analisador bioquímico semi-automático (Bioclin 100®, Belo Horizonte, MG, Brasil), para determinação de proteínas totais, albumina, glicose, ureia, AST, GGT, cálcio e cálcio iônico, em leituras realizadas em analisador automático bioquímico.

Análises estatísticas

Os resultados foram analisados pelo programa computacional Statistical Analysis System® (SAS, 2001), após verificação da normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias. Com a distribuição normal dos dados, o procedimento estatístico adotado avaliou os efeitos principais dos tratamentos, pelo comando Proc-MIXED do SAS (2001), adotando-se nível de significância de 0,05, de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i (F1 + F2 + F1 \times F2) + Q_j + A_{(Q)k} + P_l + e_{ijkl},$$

em que, Y_{ijkl} = valor observado; μ = média geral; T_i = efeito fixo de tratamento i ($F1$ = fator 1 – tipo de processamento do milho; $F2$ = fator 2 – relação PDR:PNDR; $F1 \times F2$ = interação entre $F1$ e $F2$); Q_j = efeito fixo do quadrado latino j , $j = 1$ a 5 ; $A_{(Q)k}$ = efeito aleatório do animal k dentro de cada quadrado latino, $k = 1$ a 20 ; P_l = efeito fixo do período l , $l = 1$ a 4 ; e_{ijkl} = erro aleatório associado a cada observação. Os graus de liberdade foram calculados de acordo com o método Satterthwaite (DDFM = Satterth).

3.5 RESULTADOS

As dietas experimentais apresentaram 160 g/kg de PB (base na MS), 260 g/kg de amido e 350 g/kg de FDN, porém a DAiv7h do MF foi 29% maior do que no MM (31,4% e 40,5% do total de amido, respectivamente). A dieta de alta relação PDR:PNDR teve balanço ruminal estimado de PDR em torno de +188 g/d e proteína metabolizável de 105 g/kg de MS, enquanto que a dieta de baixa relação PDR:PNDR teve balanço estimado PDR em torno de -72 g/d e proteína metabolizável de 115 g/kg de MS. Houve interação entre o tipo de processamento do milho e relação PDR:PNDR sobre o CMS ($P = 0,007$), produção de leite ($P = 0,042$) e tempo de coagulação durante o aquecimento a 140°C ($P = 0,0291$). Quando as vacas foram alimentadas com MM como fonte principal de amido, houve aumento de CMS em 1,73 kg, de produção de leite em 2,3 l/d, e de TC do leite a 140°C em 4,8 min, ao utilizar baixa relação PDR:PNDR na dieta, quando comparado à alta relação PDR:PNDR. Por outro lado, quando a fonte de amido foi o MF, não houve efeito da relação PDR:PNDR sobre estas variáveis (Tabela 5).

Tabela 5 - Efeito do processamento do milho e da relação PDR:PNDR sobre o consumo, digestibilidade, produção, composição e estabilidade do leite de vacas leiteiras

Variável	Floculado		Moído		EPM ³	P-valor		
	Alta PDR ¹	Baixa PDR ²	Alta PDR ¹	Baixa PDR ²		Proc, Milho	PDR: PNDR	Proc, Milho×PDR: PNDR
Consumo	kg/d							
MS	21,8 ^b	21,6 ^b	22,2 ^b	23,5 ^a	0,494	0,003	0,178	0,049
Amido	5,34	5,27	5,42	5,79	0,158	0,007	0,169	0,045
Proteína	3,60	3,62	3,61	3,64	0,014	0,603	0,158	0,834
FDN	7,30	7,14	7,41	7,76	0,179	0,012	0,510	0,081
EE	0,63	0,64	0,63	0,68	0,014	0,309	0,025	0,103
CD	%							
MS	67,4	68,1	66,7	65,1	0,577	0,016	0,592	0,152
Amido	97,4	96,8	96,7	96,3	0,202	0,048	0,079	0,700
Proteína	72,1	71,9	69,9	69	0,808	0,013	0,562	0,685
FDN	47,2 ^a	47,2 ^a	47,5 ^a	42,04 ^b	1,285	0,068	0,041	0,041
EE	88,1	87,9	85,7	85,6	1,065	0,004	0,845	0,927
	kg/d							
PL ⁴	36,1 ^a	36,5 ^a	34,6 ^b	36,9 ^a	1,120	0,1873	0,0031	0,042
PLC, 3,5% ⁵	34,2	35,1	33,5	35,4	1,100	0,654	0,016	0,374
Gordura	1,14	1,19	1,17	1,2	0,038	0,445	0,193	0,763
Proteína	1,08	1,10	1,05	1,11	0,031	0,548	0,025	0,319
Caseína	0,80	0,82	0,78	0,83	0,024	0,494	0,029	0,374
Lactose	1,66 ^a	1,68 ^a	1,57 ^b	1,69 ^a	0,061	0,125	0,005	0,036
ESD ⁶	3,1	3,14	2,95	3,16	0,101	0,111	0,004	0,053
ST ⁷	4,24	4,33	4,09	4,35	0,137	0,260	0,005	0,150
EP ⁸ , PL/CMS	1,64	1,64	1,56	1,52	0,044	0,002	0,473	0,502
PESO, kg	690	689	692	693	7,880	0,116	0,634	0,502
	%							
Gordura	3,21	3,29	3,39	3,29	0,058	0,103	0,857	0,102
Proteína	3,03	3,08	3,04	3,05	0,036	0,458	0,046	0,327
Caseína	2,26	2,29	2,26	2,27	0,032	0,526	0,082	0,444
Lactose	4,53 ^a	4,5 ^{ab}	4,48 ^b	4,5 ^{ab}	0,033	0,087	0,624	0,034
ESD	8,51	8,54	8,47	8,49	0,036	0,053	0,241	0,813
ST	11,71	11,82	11,87	11,78	0,082	0,336	0,891	0,112
PCAS ⁹	74,27	74,38	74,34	74,16	0,219	0,454	0,736	0,133
NUL ¹⁰ , mg/dL	12,6	12,6	13,04	12,63	0,245	0,311	0,369	0,369
Cai ¹¹ , mg/L	131	131,62	131,55	133,26	3,970	0,524	0,508	0,779
TEA ¹²	73,88	75,17	74,3	75,03	0,400	0,741	0,012	0,488
TC ¹³ , min	16,62 ^{ab}	14,47 ^b	14,4 ^b	19,2 ^a	1,200	0,399	0,377	0,023
pH	6,76	6,76	6,75	6,76	0,010	0,877	0,330	0,642

¹Alta PDR: alta relação de proteína degradável (PDR) / não degradável (PNDR) no rúmen = 107 g de PDR/kg MS e 51 g de PNDR/kg MS. ²Baixa PDR: baixa relação de PDR:PNDR no rúmen = 95 g de PDR/kg MS e 63 g de PNDR/kg MS; ³EPM = Erro padrão da média; ⁴Produção de leite; ⁵Produção de leite corrigida para gordura; ⁶Extrato seco desengordurado; ⁷Sólidos totais; ⁸Eficiência produtiva; ⁹Porcentagem de caseína na proteína total; ¹⁰Nitrogênio ureico do leite; ¹¹Concentração de cálcio iônico; ¹²TEA = Teste de estabilidade ao etanol (concentração de etanol mínima na solução alcoólica necessária para ocorrer coagulação); ¹³TC= Tempo de coagulação (tempo necessário para coagulação do leite a 140°C).

Houve efeito isolado de processamento do milho sobre a digestibilidade aparente total das dietas, sendo que as vacas alimentadas com MF apresentaram maior digestibilidade da MS, amido, PB e EE do que quando alimentadas com MM. Houve interação entre processamento do milho e relação PDR:PNDR sobre a digestibilidade aparente total da FDN, sendo que quando as vacas foram alimentadas com MM e baixa relação PDR:PNDR apresentaram menor digestibilidade aparente total da FDN do que quando alimentadas com as demais dietas ($P = 0,041$).

No presente estudo, houve apenas efeito isolado da relação PDR:PNDR ($P = 0,027$) sobre o TEA, uma vez que as vacas alimentadas com baixa relação PDR:PNDR produziram leite com maior estabilidade ao etanol (75,1%) do que quando alimentadas com alta relação PDR:PNDR (74,09%). Por outro lado, não foi observado efeito de nenhum dos fatores estudados e da interação entre eles sobre as variáveis pH e concentração de Cálcio do leite.

Considerando que não houve efeito de interação (processamento de milho $\times$ relação PDR:PNDR), a relação PDR:PNDR alterou a PLC independentemente do efeito do tipo de processamento do milho. As vacas alimentadas com baixa relação PDR:PNDR na dieta produziram em média 1,36 kg/d de leite a mais que as vacas alimentadas com alta relação PDR:PNDR (35,26 kg/d vs 33,88 kg/d, respectivamente). O teor de proteína total do leite aumentou nas dietas com baixa relação PDR:PNDR (3,03% vs 3,06%; $P = 0,046$), assim como a produção total diária de proteínas (1,065 kg/d vs 1,105 kg/d; $P = 0,025$). O teor de caseínas do leite apresentou tendência ($P = 0,082$) de aumento com o uso de baixa relação PDR:PNDR em relação ao leite de vacas alimentadas com alta relação PDR:PNDR, o que resultou em maior produção diária de caseína ($P = 0,029$) com a redução da relação PDR:PNDR (Alta: 0,79 kg/dia vs baixa: 0,825 kg/dia).

Houve interação entre processamento do milho e relação PDR:PNDR sobre o teor ($P = 0,034$) e produção diária de lactose ($P = 0,036$). Quando as vacas foram alimentadas com milho moído e alta relação PDR:PNDR apresentaram menor produção de lactose, do que quando foram alimentadas com as demais dietas. Os teores de sólidos totais e extrato seco desengordurado não foram afetados pelas dietas, entretanto a produção de sólidos totais foi superior nas vacas alimentadas com dietas com maior teor de PNDR em relação às vacas alimentadas sem inclusão de fonte de PNDR (4,34 vs 4,16 kg/dia, respectivamente) ($P = 0,005$), assim como a produção diária de extrato seco desengordurado (3,15 vs 3,02 kg/dia, respectivamente) ($P = 0,004$).

Não houve interação entre processamento do milho e relação PDR:PNDR sobre o perfil de subunidades de caseínas e de proteínas do soro. Também não houve efeito isolado de

processamento do milho ou da relação PDR:PNDR sobre o teor (% do total proteínas) de α S (α S₁ e α S₂) –CN, κ -CN e α -La. Porém, quando as vacas foram alimentadas com MF houve tendência de redução do teor de β -CN ($P = 0,093$) e aumento de β –Lg ($P = 0,062$). Quando as vacas foram alimentadas com baixa relação PDR:PNDR, houve tendência ($P = 0,063$) de aumento do % de κ -CN 1 (κ -CN glicosilada), e redução do % de κ -CN 2 e 3 (κ -CNs não glicosiladas), em relação ao total de κ -CN (Tabela 6).

Tabela 6 - Efeito do processamento do milho e da relação PDR:PNDR sobre o perfil de subunidades de caseínas e teor de proteínas do soro

Proteínas	Floculado		Moído		EPM	P-valor		
	Alta PDR ¹	Baixa PDR ²	Alta PDR	Baixa PDR		Proc. Milho	PDR: PNDR	Proc. Milho×PDR: PNDR
α S ₁ -CN, % Prot ¹	27,0	27,8	27,9	28,34	1,57	0,205	0,206	0,723
α S ₂ -CN, % Prot	9,0	9,28	9,29	9,45	0,526	0,206	0,206	0,723
β -CN, % Prot	30,17	29,17	30,75	31,77	1,69	0,093	0,985	0,283
κ -CN, % Prot	22,05	21,14	21,44	22,9	1,61	0,674	0,843	0,387
κ ₁ (glicosilada)								
% κ –CN	19,58	23,53	12,82	21,63	4,51	0,202	0,063	0,473
κ ₂₊₃ (não glicosilada)								
% κ -CN	80,41	76,46	87,17	78,37	4,51	0,202	0,063	0,473
β -Lg, % PROT	6,25	6,23	5,52	5,28	0,671	0,062	0,766	0,804
α -La, % PROT	5,3	5,19	5,41	5,3	0,452	0,577	0,563	0,989

¹Alta PDR: alta relação de proteína degradável (PDR) / não degradável (PNDR) no rúmen = 107 g de PDR/kg MS e 51 g de PNDR/kg MS. ²Baixa PDR: baixa relação de PDR:PNDR no rúmen = 95 g de PDR/kg MS e 63 g de PNDR/kg MS; ²% Prot = percentual do total de proteínas identificadas por CLAE (α S₁-CN + α S₂-CN + β -CN + κ -CN + β -Lg + α -La = 100%).

Não houve efeito dos tratamentos e interações sobre o índice de DP:creatinina. Porém, a relação PD:CMSd aumentou quando as vacas foram alimentadas com milho floculado, em relação as alimentadas com milho moído. Neste estudo, não houve interação entre processamento do milho e relação PDR:PNDR sobre o consumo e secreção de N no leite. Porém, quando as vacas foram alimentadas com baixa relação PDR:PNDR tiveram maior secreção de N no leite ($P = 0,013$), bem

como maior eficiência de conversão do N dietético em N do leite (N do leite em percentual do N consumido), do que quando alimentadas com alta relação PDR:PNDR ($P = 0,022$; Tabela 7).

Tabela 7 - Efeito do processamento do milho e da relação PDR:PNDR sobre os índices de DP e eficiência de utilização do N da dieta de vacas leiteiras em lactação

Variável	Floculado		Moído		EPM ³	P_valor		
	Alta PDR ¹	Baixa PDR ²	Alta PDR	Baixa PDR		Proc. Milho	PDR: PNDR	Proc. Milho×PDR: PNDR
DP:Creat	2,67	2,65	2,59	2,52	0,113	0,481	0,743	0,868
DP:Creat × PC ^{0,75}	355	353	347	337	14,11	0,508	0,752	0,824
DP:CMSd	1,60	1,56	1,44	1,31	0,067	0,021	0,323	0,601
	g N/dia							
Consumo	575,8	580,8	577,2	581,4	3,048	0,709	0,100	0,884
Leite	172,93	178,00	168,05	177,38	6,276	0,324	0,013	0,442
	% do consumido							
Leite	29,85	30,69	29,04	30,58	1,051	0,358	0,022	0,483

¹Alta PDR: alta relação de proteína degradável (PDR) / não degradável (PNDR) no rúmen = 107 g de PDR/kg MS e 51 g de PNDR/kg MS; ²Baixa PDR: baixa relação de PDR:PNDR no rúmen = 95 g de PDR/kg MS e 63 g de PNDR/kg MS; ³EPM = Erro padrão da média; Creat = Creatinina (mmol/l); DP = Derivados de purina (mmol/l); PC = Peso corporal; CMSd = CMS digestível.

Não houve efeito de interação entre processamento do milho e relação PDR:PNDR sobre as variáveis metabólicas sanguíneas. Porém, as vacas alimentadas com milho moído apresentaram maior concentração sanguínea de AST ($P = 0,0003$; Tabela 8) do que as alimentadas com milho floculado, enquanto que as vacas alimentadas com baixa relação PNDR/PNDR apresentaram maior concentração de proteínas totais do que quando alimentadas com alta relação PDR:PNDR. Não houve efeito dos fatores estudados sobre a concentração de ureia sanguínea, porém houve aumento de 40% da concentração de ureia sanguínea ($P < 0,001$) em amostras coletadas 4 horas após a alimentação, em relação às amostras coletadas antes da alimentação matinal (Figura 7).

Tabela 8 - Efeito do processamento do milho e da relação PDR:PNDR sobre variáveis sanguíneas de vacas leiteiras

Item	Floculado		Moído		EPM ³	P_valor		
	Alta PDR ¹	Baixa PDR ²	Alta PDR	Baixa PDR		Proc. Milho	PDR: PNDR	Proc. Milho×PDR: PNDR
Glicose, mg/dl	73,37	72,16	70,93	71,32	1,736	0,234	0,762	0,557
Ca, mg/dl	10,65	10,61	9,46	9,94	0,649	0,157	0,741	0,690
Cai, mg/dl	6,37	6,24	5,62	5,78	0,385	0,123	0,960	0,708
GGT, U/l	30,33	30,29	30,54	30,69	1,264	0,712	0,942	0,910
AST, U/l	62,35	63,65	68,17	70,12	2,327	<0,001	0,303	0,836
Prot. totais, g/l	6,63	6,84	6,62	6,89	0,120	0,803	0,025	0,767
Albumina, g/l	2,57	2,64	2,63	6,76	0,070	0,100	0,069	0,569

¹Alta PDR: alta relação de proteína degradável (PDR): não degradável (PNDR) no rúmen = 107 g de PDR/kg MS e 51 g de PNDR/kg MS; ²Baixa PDR: baixa relação de PDR:PNDR no rúmen = 95 g de PDR/kg MS e 63 g de PNDR/kg MS; ³EPM = Erro padrão da média; Cai = Cálcio iônico. AST = Aspartato aminotransferase; GGT = Gama glutamil transpeptidase.

Figura 7 - Efeito do processamento do milho e da relação PDR:PNDR sobre a concentração de ureia sanguínea antes (T0) e 4 horas após a alimentação (T4)

P-valor: Proc. milho = 0,587; PDR:PNDR = 0,927; Proc. milho×PDR:PNDR = 0,188; Tempo < 0,001; Proc. milho×Tempo = 0,994; PDR:PNDR×Tempo = 0,421; Proc. milho×PDR:PNDR×Tempo = 0,319. MF = Milho floculado; MM = Milho moído; Alta PDR: alta relação de proteína degradável (PDR): não degradável (PNDR) no rúmen = 107 g de PDR/kg MS e 51 g de PNDR/kg MS; Baixa PDR: baixa relação de PDR:PNDR no rúmen = 95 g de PDR/kg MS e 63 g de PNDR/kg MS.

3.6 DISCUSSÃO

Consumo e Digestibilidade

Os efeitos do processamento do milho e da relação PDR:PNDR da dieta sobre o CMS, produção de leite e estabilidade do leite durante o aquecimento a 140°C foram interdependentes, sendo que em dietas a base de milho floculado, a relação PDR:PNDR não alterou as respostas citadas, porém, em dietas a base de milho moído, o uso de baixa relação PDR:PNDR aumentou o

CMS, produção e estabilidade térmica do leite. Estudos prévios relataram que tanto o processamento do milho (ALLEN, 2000), visando o aumento de digestibilidade, quanto o uso de alta relação PDR:PNDR, especialmente pela inclusão de ureia para aumentar a PDR (BRODERICK *et al.*, 2009), podem reduzir o CMS. Os resultados do presente estudo sugerem que a maior digestibilidade do amido em dietas com milho floculado reduziu o CMS antes de qualquer efeito depressor do CMS causado pelo aumento da relação PDR:PNDR, sendo este último observado quando as vacas receberam milho moído, com menor digestibilidade do amido. Estas alterações de CMS estão associadas às respostas de desempenho produtivo e de estabilidade do leite observadas no presente estudo.

A redução do CMS em razão do aumento da digestibilidade ou da quantidade de fornecimento do amido, já foi previamente relatada (ALLEN, 2000). No presente estudo, as vacas alimentadas com milho floculado tiveram maior digestibilidade aparente total do amido, de MS, da proteína e do EE do que quando alimentadas com milho moído. A redução do CMS em resposta do aumento da digestibilidade do amido foi associada com a maior produção de ácido propiônico no rúmen, que ao ser oxidado no fígado estimula o centro da saciedade, reduzindo o CMS (teoria da oxidação hepática – HOT). A inclusão na dieta de grãos com maior fermentabilidade ruminal reduz em média 13% o CMS (ALLEN, 2000). De acordo com Oba e Allen (2003), fontes de amido com maior digestão ruminal reduzem a duração das refeições em 17%, o que resultou em 8% de decréscimo no CMS. A infusão intravenosa do propionato na veia portal de ovinos resultou em maior efeito hipofágico do que a infusão de acetato e butirato (ANIL e FORBES, 1980). Quando o propionato foi infundido na veia mesentérica houve menor CMS, enquanto que a infusões similares de acetado não alteraram o CMS (ELLIOT *et al.*, 1985).

Além do processamento do milho, no presente estudo a menor relação PDR:PNDR aumentou o CMS em vacas alimentadas com milho moído, o que pode ser associado a menor inclusão de ureia na dieta com o objetivo de reduzir a relação PDR:PNDR. A inclusão de ureia em dietas de vacas leiteiras reduz linearmente o CMS, em dietas com substituição do farelo de soja por ureia (BRODERICK *et al.*, 2009).

Índice de DP:Creatinina e eficiência de uso de N para produção de leite

Neste estudo, não houve efeito da relação PDR:PNDR ou de interação sobre o índice de DP:creatinina, o qual é indicativo da síntese de proteína microbiana ruminal. Os resultados de índice de DP:creatinina indicaram que as dietas com baixa relação PDR:PNDR não limitaram a síntese de proteína microbiana, mesmo que a estimativa do NRC (2001) de balanço de N no rúmen tenha sido negativo (-75 g/d).

Um estudo recente avaliou o modelo do NRC (2001) e propôs novas equações para recomendações de PDR e PNDR para otimizar a síntese de N microbiano e o aporte de aminoácidos para as vacas (WHITE et al., 2017). Foi observado que o modelo do NRC (2001) superestimou o fluxo de N não microbiano (NNM) em 18% e subestimou o N microbiano em 14%, sendo que ambas estimativas tiveram grandes variações (*slope bias* de 22% do RMSE). Para aumentar a acurácia das equações do NRC (2001), White et al. (2017) desenvolveram novos modelos baseados no aparecimento pós-ruminal das frações A, B e C de acordo com cada ingrediente avaliado, o que reduziu os erros de predições de taxa de passagem (kp) e de digestibilidade (kd). As novas equações melhoraram o ajuste dos modelos (RMSE e CCC), e as recomendações de PDR na dieta para otimizar síntese de proteína microbiana foram reduzidas. White et al. (2017) sugeriram que o teor de N microbiano precisaria exceder em 145% o teor de PDR para se tornar limitante, o que é similar ao limite previamente predito do NRC (2001) de 85%. Apesar das estimativas de exigência de PDR do modelo de White et al. (2017) ser menor em relação ao NRC (2001), poucos estudos levaram em consideração o balanço de N, e maiores informações precisam ser estabelecidas neste contexto.

De forma geral, os resultados do presente estudo sugerem que a redução da relação PDR:PNDR não limitou a síntese de proteína microbiana. Não houve efeito do processamento do milho sobre o índice de DP:creatinina, porém a eficiência de produção de DP (DP:CMSd) aumentou quando as vacas foram alimentadas com milho moído, em comparação com as alimentadas com milho floculado. De acordo com Galyeane e Tedeschi (2014), a matéria orgânica total digestível no rúmen é o principal fator associado com a síntese de proteína. O modelo do NRC (2001) estima a síntese de proteína microbiana (em kg/d) é 13% do total de NDT consumido. Adicionalmente, o NRC (2001) ajusta a síntese de proteína metabolizável a partir da proteína degradável no rúmen (PDR): quando PDR é 1,18 vezes menor que a síntese de proteína microbiana,

estima-se a proteína microbiana em 85% da PDR, e não mais 13% do consumo de NDT. No entanto, os resultados do presente estudo indicaram que, independentemente do processamento do milho, a redução da relação PDR:PNDR em até 60:40 (% da PB) pode aumentar o fornecimento de aminoácidos para as vacas em lactação, e, de acordo com White et al. (2017), o N microbiano precisa exceder 145% o teor de PDR para o mesmo se tornar limitante, e não 85% como estabelecido pelo NRC (2001).

Hristov et al. (2004) utilizaram N marcado (N_{15}) para estimar síntese de proteína microbiana e fluxo de N_{15} para o leite em dietas com dois teores de PDR: 9,4% vs 11,6% (PB de 158% e 18,3%, respectivamente), porém com o mesmo teor de proteína metabolizável (10,8%). De forma semelhante ao nosso estudo, Hristov et al. (2004) descreveram que os teores de PDR avaliados não alteraram a síntese de proteína microbiana, mas houve aumento das excreções de N na urina com o aumento do fornecimento de PDR na dieta. A eficiência de conversão de N para o leite também foi reduzida com o aumento do fornecimento de PDR. A proporção de proteína do leite originada da síntese de proteína microbiana não alterou de acordo com as dietas estudadas, sendo que 61% da proteína do leite foi derivada de proteínas microbianas.

Em estudo de meta-análise, Ipharraguerre e Clark (2014) descreveram que quando as fontes de PNDR substituíram demais fontes de PB da dieta houve redução do fluxo de N microbiano. Os resultados de Ipharraguerre e Clark (2014) sugerem que esta redução pode ter ocorrido por limitações de substratos energéticos e de AA, e não de limitação de N amoniacal disponível no rúmen para o crescimento microbiano.

Miyaji et al. (2014) relataram que é possível aumentar a eficiência de uso do N mesmo em dietas com fonte de amido de elevada digestibilidade ruminal. A substituição de milho floculado por arroz floculado (*Oryza sativa* L) em dietas de vacas leiteiras aumentou a eficiência de uso do N dietético para produção de leite, porém houve também redução do CMS, da digestibilidade da fibra e do desempenho produtivo, indicando acidificação excessiva deste tipo de dieta (MIYAJI et al., 2014). Neste mesmo estudo foi utilizado teor de PB (18,5%) acima do valor utilizado em nosso estudo (16%), o que pode explicar o aumento da eficiência de conversão N dietético para produção de leite ao substituir milho floculado por arroz floculado. Apesar de haver evidências de que as recomendações de PDR do NRC (2001) podem estar superestimadas (WHITE et al., 2017), nossos resultados também indicam que a recomendação de PDR em dietas de vacas leiteiras deve ser

associada com a digestibilidade ruminal dos carboidratos para otimizar o desempenho produtivo e minimizar a excreção de nutrientes.

De forma semelhante ao presente estudo, Savari et al. (2017) não observaram efeito do processamento do milho (MF vs MM) sobre a secreção de N no leite e eficiência de conversão do N dietético em N lácteo. Porém, Savari et al. (2017) observaram maior eficiência de uso do N dietético ao utilizar alta relação PDR:PNDR, devido a maior secreção de N no leite. Os resultados divergentes entre os estudos indicam que a determinação da relação ótima de PDR:PNDR de acordo com a fermentabilidade ruminal de carboidratos depende da digestibilidade intestinal da fonte de PNDR utilizada, teor e composição da PDR, bem como vitreosidade e digestibilidade ruminal das fontes de amido.

Desempenho produtivo

A interação entre processamento do milho e relação PDR:PNDR sobre o CMS afetaram o desempenho produtivo das vacas. Houve redução da produção de leite nas vacas alimentadas com milho moído e alta relação PDR:PNDR. O consumo de nutrientes para síntese de leite foi menor nas dietas com inclusão de milho moído e alta relação PDR:PNDR, devido ao menor CMS, comparado a inclusão de milho moído e baixa relação PDR:PNDR. Por outro lado, o consumo de nutrientes digestíveis foi maior nas dietas com milho floculado, devido à maior digestibilidade da MS, PB, EE e amido, independentemente da relação PDR:PNDR das dietas. Apesar das dietas com alta relação PDR:PNDR terem menor concentração de proteína metabolizável do que as com baixa relação de PDR:PNDR, em dietas com milho floculado não houve efeito da relação PDR:PNDR sobre o desempenho produtivo, indicando que a redução do desempenho produtivo de vacas alimentadas com milho moído e alta relação PDR:PNDR ocorreu em resposta ao menor CMS. Porém, houve aumento da produção de proteína total e de caseína do leite com a redução da relação PDR:PNDR, independentemente do tipo de processamento do milho. Este resultado sugere que a menor disponibilidade de proteína metabolizável em dietas com alta relação PDR:PNDR reduziu a disponibilidade de aminoácidos precursores das proteínas do leite (SANTOS et al., 1998), uma

vez que a síntese de proteína microbiana não deve ter sido limitada pelas dietas com baixa relação PDR:PNDR.

Os resultados do presente estudo ratificam que as recomendações de utilização de PDR:PNDR da dieta do atual modelo do NRC (2001), indicando que o balanço de N no rúmen estimado pelo modelo pode estar superestimado. Sendo assim, aumentar a relação PDR:PNDR de 60:40 para 68:32 % PB não apresenta benefícios sobre síntese de proteína microbiana e desempenho produtivo, porém aumenta as excreções de N na urina em dietas a base de milho moído como fonte de amido. Shen et al. (2015) descreveram que não há interação entre processamento do milho (moído ou floculado) e tipo de farelo de soja (extrusado ou extraído com solvente, baixa e alta degradabilidade ruminal, respectivamente) sobre o CMS e o desempenho produtivo. No mesmo estudo, as vacas alimentadas com milho floculado também tiveram maior eficiência alimentar. Porém, a síntese de proteína microbiana foi limitada quando as vacas foram alimentadas com farelo de soja extrusado, e, portanto, não houve efeito entre os tipos de farelo de soja sobre o desempenho produtivo das vacas. No estudo de Shen et al. (2015), as relações de PDR:PNDR estudadas foram: 60:40 vs 50:50 % PB, cujo valor da maior relação estudada foi equivalente a menor do presente estudo.

Um estudo recente avaliou o efeito da relação PDR:PNDR (60:40 vs 65:45) e do processamento do milho (floculado 390 g/L⁻¹ vs moído) sobre o desempenho produtivo de vacas leiteiras, mas não houve efeito de interações entre estes fatores sobre todas as variáveis estudadas (SAVARI et al., 2017). Porém, diferentemente do nosso estudo, Savari et al. (2017) observaram que as vacas alimentadas com a maior relação PDR:PNDR (65:45) produziram 1,2 kg/d a mais de leite e tiveram maior eficiência de uso do N dietético do que quando alimentadas com a menor relação PDR:PNDR (60:40). A menor relação PDR:PNDR (60:40) pode ter limitado a síntese de proteína microbiana ou a fonte de PNDR pode ter apresentado baixa digestibilidade intestinal (FS tratado com xilose), comparado a fonte de PDR (FS) utilizado.

Estabilidade do leite

No presente estudo, a estabilidade do leite ao etanol aumentou com a redução da relação PDR:PNDR. Quando as vacas foram alimentadas com baixa relação PDR:PNDR, provavelmente

o aporte de proteína metabolizável no intestino foi aumentado, especialmente em dietas a base de milho moído, uma vez que o excesso de N disponível do rúmen não contribui para as exigências de aminoácidos do animal. Além da produção de leite, estudos prévios indicaram que a estabilidade do leite está positivamente associada com o consumo de nutrientes. Porém, no presente estudo, houve apenas aumento da estabilidade do leite ao etanol nas dietas com aumento da relação PDR:PNDR, independente da fonte de amido. Por outro lado, o uso de dietas com alta relação PDR:PNDR, especialmente a base de milho moído, pode aumentar o custo energético para eliminação de ureia, uma vez que para formação da glutamina o N-NH_3 precisa reagir com o α -cetoglutarato, composto intermediário do ciclo de Krebs (ciclo do ácido cítrico), resultando em menos substrato para geração de energia para a vaca (GARCIA-BOJALIL, 1998).

A disponibilidade de nutrientes e energia já foi associada positivamente com a estabilidade do leite ao teste do etanol (STUMPF et al., 2013), porém, diferentemente do presente estudo, Stumpf et al. (2013) observaram aumento das concentrações de cálcio iônico do leite, o qual é o principal componente lácteo associado com instabilidade do leite. As condições avaliadas por Stumpf et al. (2013) foram de restrição de 50% da oferta da dieta, o que resultou em aumento do espaço entre as junções firmes do epitélio mamário, facilitando a passagem de íons. A redução do consumo energético em 50% simula uma condição extrema, muito maior do que poderia ocorrer por redução da digestibilidade do amido, CMS ou do custo energético da ureia resultante do aumento da relação PDR:PNDR em dietas a base de milho moído como fonte de amido.

Schmidt (2014) avaliaram a recuperação da estabilidade do leite por meio de diferentes dietas durante 13 dias de estudo. Em um primeiro momento, as vacas receberam dieta padrão (para atender as exigências de energia e proteína), e, de forma abrupta, foram induzidas ao LINA pela restrição de 50% das suas exigências diárias de energia e proteína durante um período de 4 dias. Após este período de indução ao LINA, foram testadas 3 dietas durante 7 dias com o objetivo de recuperar a estabilidade do leite: 1) atendimento de 100% das exigências de energia e proteína; 2) atendimento de 100% das exigências de energia e restrição de 50% da proteína; 3) atendimento de 100% das exigências de proteína e restrição de 50% da energia. Durante o primeiro período, com utilização da dieta padrão, o teor de etanol na solução alcóolica para induzir a coagulação foi de 74 a 74,5%. Durante os 4 dias de indução ao LINA, este teor caiu para 65,5 a 66%. No período de recuperação da estabilidade do leite, a dieta que atendeu 100% das exigências de energia e proteína (dieta 1) recuperou a estabilidade do leite para 72% de etanol na mistura alcóolica necessária para

causar coagulação; enquanto que a dieta que atendeu 100% de energia e 50% de proteína recuperou a estabilidade do leite para 68,84% de etanol necessário para coagulação. Já a dieta que atendeu 100% de proteína e 50% de energia reduziu ainda mais a estabilidade do leite, onde passou de 66 (1º dia de utilização desta dieta) para 62% (7º dia de utilização desta dieta) de etanol na mistura alcoólica necessário para coagulação do leite. Desta forma, o desbalanço de fornecimento de energia e proteína, especialmente em dietas deficientes em energia associada ao maior nível de proteína, também podem potencializar a ocorrência de LINA. Este resultado foi similar ao observado no presente estudo, pois a utilização de alta relação PDR:PNDR reduziu a estabilidade do leite ao etanol, e ao aquecimento térmico ao utilizar milho moído como fonte de amido.

De outra forma, Marques et al. (2011), e Martins et al. (2015a), relataram que a acidificação sanguínea aumenta a concentração de cálcio iônico do leite e, conseqüentemente, reduz a estabilidade. A acidose metabólica pode ser decorrente da acidose ruminal; pela redução do balanço cátion-aniônico da dieta; ou mesmo pela alta taxa metabólica de vacas leiteiras. Martins et al. (2015a,b) observaram que pequenas alterações no pH sanguíneo e/ou urinário podem alterar a concentração de cálcio iônico do leite e reduzir a estabilidade do leite. Fagnani; Beloti e Battaglini (2014) relataram que em amostras de LINA, 65,52% foram oriundas de vacas com distúrbios metabólicos, tais como: acidose respiratória, acidose metabólica, alcalose respiratória, alcalose metabólica, acidose respiratória mais alcalose metabólica, alcalose respiratória mais acidose metabólica. No presente estudo, apesar do milho floculado ter maior digestibilidade do amido e, portanto, maior risco de ocorrência de acidose ruminal subclínica, o mesmo reduziu o CMS, o que reduziu o risco de acidificação ruminal.

No presente estudo não houve efeito das dietas sobre a digestibilidade da FDN. Adicionalmente, resultados de fermentação ruminal deste estudo (FONSECA, 2018) indicaram que não houve redução do pH ruminal com o uso de milho floculado, confirmando nossa hipótese de que não houve acidificação ruminal e nem a acidose sanguínea, necessária para desencadear mecanismos de compensação da acidose metabólica e aumentar a concentração de cálcio iônico do sangue e do leite, o que poderia reduzir a estabilidade do leite.

Subunidades de caseínas e proteínas do soro

O resultado do presente estudo de aumento da estabilidade do leite ao teste do álcool de acordo com a redução da relação PDR:PNDR sugere que outros fatores, além do teor de cálcio iônico, afetam a estabilidade do leite. Alterações na proporção entre as subunidades de caseínas ou de proteínas do soro podem ocorrer em decorrência da quantidade e/ou qualidade dos aminoácidos direcionados à síntese de proteínas na glândula mamária, e resultar em alterações da estabilidade da micela de caseína (BARBOSA et al., 2012).

No presente estudo, a inclusão de milho floculado aumentou a proporção de β -Lg e reduziu a de β -CN, em comparação com as vacas alimentadas com milho moído. Porém, não foi observado efeito do processamento do milho sobre a estabilidade do leite ao teste do álcool. As caseínas α e β são hidrofóbicas e cálcio sensíveis, enquanto que a κ -caseína é hidrofílica e não reage com o cálcio, localizando-se na superfície externa da micela de caseína, o que protege o interior hidrofóbico composto por α e β -caseína (WALSTRA, 1999).

Barbosa et al. (2012), descreveram que amostras de leite instáveis ao etanol tiveram maior teor de β -caseína ($P = 0,04$) e proteínas totais ($P = 0,031$), e tendência de menor teor de κ -caseína, quando comparada a amostras de leite estáveis ao etanol. No presente estudo, o processamento do milho e/ou a relação PDR:PNDR não alteraram o teor de κ -CN, porém, com a redução da relação PDR:PNDR houve aumento da proporção de κ -CN 1 (κ -CN glicosilada) e redução do % de κ -CN 2 e 3 (κ -CNs não glicosiladas), em relação ao total de κ -CN. A κ -CN é a única caseína que pode ser glicosilada, em geral por três monossacarídeos (galactose, N-acetil-galactosamina ou ácido N-acetil neuramínico) ligados aos resíduos de treonina 131, 133, 135 ou 136, constituindo a parte glicosídica da micela (FOX e McSWENNEY, 1998). O aumento da taxa de glicosilação da κ -CN já foi associada com a formação de micelas de CN de menor tamanho (BIJLA et al., 2014), as quais apresentaram maior tempo para coagulação e formação de coágulos mais firmes, durante o processo industrial de produção de queijos (GLANTZ et al., 2010).

Fatores nutricionais e o metabolismo da glicose na glândula mamária, podem alterar a taxa de glicosilação da κ -CN. Lavialle e Chanat (2008) demonstraram experimentalmente com ratas em lactação, que dietas com restrição lipídicas reduziram a taxa de glicosilação da κ -CN. O suprimento de nutrientes para glândula mamária, sobretudo energia e de aminoácidos, pode ser fator

determinante da taxa de glicosilação da κ -CN, podendo aumentar a estabilidade do leite ao teste do álcool. No entanto, o presente estudo é a primeira evidência de que a redução da relação PDR:PNDR pode estar associada com a proporção de κ -CN glicosilada, provavelmente pelo aumento do aporte de aminoácidos para a glândula mamária. Adicionalmente, apesar de não haver interação ($P > 0,05$) entre processamento do amido e relação PDR:PNDR sobre a composição da κ -CN (glicosilada vs não glicosilada), em dietas a base de milho moído, a baixa relação PDR:PNDR aumentou o CMS em 1,73 kg/d e provavelmente a disponibilidade de nutrientes para a glândula mamária. A baixa relação PDR:PNDR aumentou a proporção (% do total de κ -CN) de κ -CN 1 (glicosilada) em 70% em dietas com milho moído e em 30% em dietas com milho floculado, em comparação com a alta relação PDR:PNDR em ambos os processamentos do milho.

Apesar da baixa relação PDR:PNDR aumentar a estabilidade do leite ao teste do álcool, este aumento foi modesto, de apenas 1 unidade percentual, em relação a alta relação PDR:PNDR, sugerindo que a glicosilação da κ -CN pode contribuir positivamente para a estabilidade do leite ao teste do álcool, porém outros fatores estão associados com ocorrência de leite instável ao teste do álcool. O teor de Cai foi previamente relatado como o principal fator de redução da estabilidade da micela de caseína. O aumento da concentração de cálcio iônico do leite (cargas elétricas positivas) altera o equilíbrio iônico das caseínas, por reduzir as cargas negativas das micelas de caseínas e a força de repulsão eletrostática entre elas (BARROS et al., 1999), o que pode reduzir a resistência do leite em formar coágulos durante o contato com o etanol e / ou durante o aquecimento térmico. Porém, apesar de Barbosa et al. (2012) encontrarem alterações nas frações de caseína do LINA em relação ao leite estável, ainda não foi determinado se as alterações nas proporções das subunidades de caseínas (α , β e κ -caseína) também podem contribuir, de forma isolada ou em interação com o teor de cálcio, para reduzir a estabilidade da micela.

As interações entre glicosilação da κ -CN, teor de Cai, bem como a proporção de demais subunidades de caseínas da micela sobre a estabilidade do leite ainda não foram esclarecidas. No presente estudo, a estabilidade térmica do leite foi alterada de acordo com a interação de processamento do milho e da relação PDR:PNDR. Não houve efeito da relação PDR:PNDR sobre a estabilidade térmica do leite quando as vacas foram alimentadas com milho floculado. Quando as vacas foram alimentadas com milho moído, a baixa relação de PDR:PNDR aumentou a estabilidade térmica do leite em comparação as vacas alimentadas com as dietas com milho moído associado à alta relação PDR:PNDR e milho floculado associado a baixa relação PDR:PNDR.

Estes resultados sugerem efeito de sincronia de nutrientes no rúmen para otimizar o aporte de nutrientes para a glândula mamária, sobretudo energia e aminoácidos, sobre a capacidade do leite em resistir o aquecimento térmico. Portanto, os efeitos dietéticos sobre a estabilidade do leite ao aquecimento a 140°C também dependem não apenas de alterações das concentrações de cálcio iônico do leite. Este resultado ratifica a hipótese de que a glicosilação da κ -CN pode ter sido mais acentuada pela redução da relação PDR:PNDR em dietas a base de milho moído, devido ao aumento do consumo de nutrientes observado nestas dietas, em relação a alta relação PDR:PNDR. Adicionalmente, as vacas alimentadas com milho floculado apresentaram menor teor de β -CN (% da proteína do leite), proteína hidrofóbica e instável ao cálcio, o que pode ter contribuído para reduzir a estabilidade da micela de caseína durante o aquecimento térmico.

Estudos prévios já indicaram que a restrição severa do CMS (BARBOSA et al., 2012) e a acidificação sanguínea (MARQUES et al., 2011; MARTINS et al., 2015) aumentam a concentração de cálcio iônico do leite, e reduzem a estabilidade ao etanol e ao aquecimento a 140°C. Porém, até o presente momento não é conhecido se outros fatores também ocorrem de forma adicional ao aumento do Cai para reduzir a estabilidade do leite em decorrência da restrição do consumo de nutrientes ou em casos de acidificação sanguínea. O presente estudo indicou que, sem alterar a concentração de cálcio iônico do leite, alterações na composição da micela de caseína e na taxa de glicosilação de κ -CN podem estar associados com a estabilidade do leite, apesar desta mudança de estabilidade do leite ter sido moderada, quando comparado a outros estudos com redução da estabilidade do leite devido ao aumento de Cai resultante de restrição no consumo de alimentos ou de acidificação sanguínea.

Desta forma, os resultados do presente estudo sugerem que outros fatores podem estar associados com a ocorrência de instabilidade do leite, o que demanda estudos posteriores sobre medidas de prevenção e correção da estabilidade do leite na fazenda. Com base nos resultados do presente estudo, em conjunto com os estudos prévios, podemos sugerir como os principais fatores associados com a instabilidade do leite, nesta ordem: a) deficiências nutricionais, sobretudo baixo consumo de MS e de energia (MARQUES et al., 2007; BARBOSA et al., 2012; STUMPF et al., 2013; SCHMIDT, 2014); b) Desbalanço no atendimento das exigências de proteína e energia (causado pela deficiência de energia; SCHMIDT, 2014); c) acidificação sanguínea (MARQUES et al., 2011, MARTINS et al., 2015); d) alta relação PDR:PNDR, especialmente em dietas a base de milho moído como fonte de amido (dados do presente estudo). Portanto, para produção de leite

com alta estabilidade ao etanol e aquecimento térmico, além dos requerimentos nutricionais de proteína e energia, deve-se balancear as dietas nas relações de PDR:PNDR com o objetivo de otimizar síntese de proteína microbiana e atender exigências de proteína metabolizável. Esta estratégia minimiza o teor de PDR em excesso no rúmen e favorece a manutenção da saúde ruminal para evitar distúrbios digestivos, como acidose.

3.7 CONCLUSÃO

Os efeitos de processamento do milho e relação PDR:PNDR sobre o CMS, produção de leite e estabilidade térmica do leite são interdependentes. A relação PDR:PNDR não altera o desempenho produtivo e a estabilidade do leite em dietas a base de milho floculado, porém, quando as vacas são alimentadas com milho moído, a utilização de baixa relação PDR:PNDR aumenta o CMS, a produção e a estabilidade térmica do leite, mas não reduz o índice de DP:creatinina, em comparação com a utilização de alta relação PDR:PNDR. A baixa relação PDR:PNDR aumenta a estabilidade do leite ao teste do etanol, bem como a produção diária de proteína, caseína e proporção de κ -CN₁ (κ -CN glicosilada). Por outro lado, a inclusão de milho floculado reduz a proporção de β -CN, em relação a dietas com milho moído. Estas mudanças na composição da proteína do leite alteraram a estabilidade ao teste do álcool e ao aquecimento a 140° C, provavelmente como resposta a alterações do fluxo de nutrientes e valor biológico para produção de leite (como a disponibilidade e o perfil biológico dos aminoácidos absorvidos). O uso de dietas a com milho floculado aumenta a digestibilidade aparente total da MS, amido, PB e EE, bem como a eficiência de utilização do N dietético para produção de leite. Desta forma, para otimizar o desempenho produtivo e eficiência de utilização do N, as recomendações da relação PDR:PNDR para vacas em lactação variam de acordo com a digestibilidade da fonte primária de amido da dieta.

REFERÊNCIAS

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 17th edition. Gaithersburg, MD, USA, Association of Analytical Communities, 2000.

ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.7, p.1598-1624, 2000.

ARC. AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL. **The Nutrient Requirements of Ruminant Livestock**. Technical Review by an Agricultural Research Council Working Party, Commonwealth Agricultural Bureau, Farnham Royal, UK. 1980.

BARBOSA, R. S.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M. E. R.; ZANELA, M.B.; STUMPF, M. T.; KOLLING, G. J.; SCHAFHÄUSER JÚNIOR, J.; BARROS, L. E.; EGITO, A. S. Caracterização eletroforética de proteínas e estabilidade do leite em vacas submetidas à restrição alimentar. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.47, n.4, p.621-628, 2012.

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

BARROS, L. **Transtornos metabólicos que afetam a qualidade do leite**. In: GONZÁLES, F. H. D.; DURR, J. W.; FONTANELLI, R. S. (Eds.). **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre: 2001. p.44-57.

BIJLA, E.; DE VRIES, R.; VALENBERG, H. V.; HUPPERTZ, T.; HOOIJDONK, T. V. Factors influencing casein micelle size in milk of individual cows: Genetic variants and glycosylation of κ -casein. **International Dairy Journal**, v. 34, n. 1, p. 135–141, 2014.

BOBE, G.; BEITZ, D. C.; FREEMAN, A. E. et al. Separation and quantification of bovine milk proteins by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.458-463, 1998.

BRODERICK, G. A.; REYNAL, S. M. Effect of source of rumen-degraded protein on production and ruminal metabolism in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.2822-2834, 2009.

CARMO, C. A.; BATISTEL, F.; SOUZA, J.; MARTINEZ, J. C.; CORREA, P.; PEDROSO, A. M.; SANTOS, F. A. P. Starch levels on performance, milk composition and energy balance of lactating dairy cows. **Tropical and Animal Health Production**, v.47, p.179-184, 2015.

CASALI, A. O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C.; PEREIRA, J. C.; HERIQUES, L. T.; FREITAS, S. G.; PAULINO, M. F. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimentos in situ. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.37, n.2, p.335-342, 2008.

CHIZZOTTI, M. L.; VALADARES FILHO, S. C.; VALADARES, R. F. D.; CHIZZOTTI, F. H. M.; MARCONDES, M. I.; FONSECA, M. A. Intake, digestibility and nitrogen metabolism in Holstein cows with different milk production levels. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.1, p. 138-146, 2007.

ELLIOT, J. M.; SYMONDS, H. W.; PIKE, B. Effect on feed intake of infusing sodium propionate or sodium acetate into a mesenteric vein of cattle. **Journal of Dairy Science**, v.68, p.1165–1170, 1985.

FAGNANI, R.; BELOTI, V.; BATTAGLINI, A. 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.

FAGNANI, R.; BATTGLINI, A. P. P.; BELOTI, V.; UBERBANO, A.; BRONZOL, J. C. Alcohol Stability of Milk from the Perspective of X-Ray Diffractometry. *Food Biophysics*, v.11, n.2, p.198-205, 2016.

FISCHER, V.; RIBEIRO, M. E. R.; ZANELA, M. B.; MARQUES, L. T.; ABREU, A. S.; MACHADO, S. C.; FRUSCALSO, V.; BARBOSA, R. S.; STUMPF, M. T. Leite instável não ácido: um problema solucionável? **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.13, n.3, p.838-849, 2012.

FONSECA, D. C. M. **Metabolismo digestivo e estabilidade do leite de vacas alimentadas com fontes de carboidratos não fibrosos e diferentes degradabilidade ruminal da proteína**. 2018. 115 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, 2018.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Londres: Thomson Science, 1998, 396p.

GALYEAN, M. L.; TEDESCHI, L. O. Predicting microbial protein synthesis in beef cattle: relationship to intakes of total digestible nutrients and crude protein. **Journal of Anim Science**, v.92, n.11, p.5099-111, 2014.

GARCIA-BOJALIL, C.M; STAPLES, C.R; RISCO, C.A; SAVIO, J.D; THATCHER, W.W. Protein degradability and calcium salts of long-chain fatty acids in the diets of lactating dairy cow: productive responses. **Journal of Dairy Science**. v.81, p. 1374-1384. 1998.

GLANTZ, M.; DEVOLD, T. G.; VEGARUD, G.E.; LINDMARK MÅNSSON, H.; STÅLHAMMAR, H.; PAULSSON, M. Importance of casein micelle size and milk composition for milk gelation. **Journal of Dairy Science**, v.93, n.4, p.1444–1451, 2010.

EHRMAN, T. 6 Determination of Starch in Biomass Samples by Chemical Solubilization and Enzymatic Digestion. LAP-016 U.S. **Department of Energy National Bioenergy Center**, Washington, D.C. 1996.

HARVATINE, K.J.; ALLEN, M.S. 2006. Effects of fatty acid supplements on milk yield and energy balance of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 89:1081-1091.

HRISTOV, A. N.; ETTER, R. P.; ROPP, J. K.; GRANDEEN, K. L. Effect of dietary crude protein level and degradability on ruminal fermentation and nitrogen utilization in lactating dairy cows. **Journal of Animal Science**, v.82, p.3219–3229, 2004.

IPHARRAGUERRE AND CLARK. A Meta-analysis of Ruminal Outflow of Nitrogen Fractions in Dairy Cows. **Journal Advances in Dairy Research**, v.2, n.2, 2014.

LAVIALLE, F.; CHANAT, E. Lipid-deprived diet perturbs O-glycosylation of secretory proteins in rat mammary epithelial cells. *Animal*, v.2, n.4, p. 491-499, 2008.

LI, S. S.; SHEN, J. S.; REN, D. X.; LIU, J. X. Effects of the processing methods of corn grain and soybean meal on milk protein expression profiles in dairy cows. **Animal**, v.9, n.2, p.267-274, 2014.

MARQUES, L. T.; FISCHER, V.; ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R.; STUMPF JUNIOR, W.; RODRIGUES, C. M. Produção leiteira, composição do leite e perfil bioquímico sanguíneo de vacas lactantes sob suplementação com sal aniônico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.5, p.1088-1094, 2011.

MARTINS, C. M. M. R.; ARCARI, M. A.; WELTER, K. C.; SARAN NETO, A.; OLIVEIRA, C. A. F.; SANTOS, M. V. Effect of dietary cation-anion difference on performance of lactating dairy cows and stability of milk proteins. **Journal of Dairy Science**, v.98, p.2650-2661, 2015.

MAULFAIR, D. D.; HEINRICHS, A. J. 2012. REVIEW: Methods to measure forage and diet particle size in the dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v.28, p.489–493, 2012.

MERTENS, D. R. 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.

MIYAJI, M.; MATSUYAMA, H.; HOSODA, K. Effect of substituting brown rice for corn on lactation and digestion in dairy cows fed diets with a high proportion of grain. **Journal of Dairy Science**, v.97, n.2, p.952-960. 2013.

NEGRI, L.; CHAVES, M.; TAVERNA, M.; CUATRIN, A.; RUBIOLO, A. Determinación de las variables que afectan la estabilidad térmica de la leche utilizando un método capilar para evaluar el tiempo de coagulación por calor. **Revista Argentina de Lactología**, n.22, p.33-44, 2003.

NOCEK, J.E. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility. A review. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.2051-2069, 1988.

OBA, M.; ALLEN, M. S. Effect of corn grain conservation method on ruminal digestion kinetics for lactating dairy starch concentration. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.1, p.184-194, 2003.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7. rev. ed. Washington, DC.: Natl.Acad. Sci., 2001. 381p.

OLIVEIRA, A. S.; VALADARES, R. F. D.; VALADARES FILHO, S. C.; CECON, P. R.; RENNÓ, L. N.; QUEIROZ, A. C.; CHIZZOTTI, M. L. Microbial protein production, purine derivatives and urea excretion estimate in lactating dairy cows fed isoprotein diets with different non protein nitrogen compounds levels. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.5, p.1621-1629, 2001.

ORELLANA R., PULIDO P., BRIONES M., SARABIA A. Purine Derivatives/Creatinine Ratio as an Index of Microbial Protein Synthesis in Lactating Holstein Cows. In: Makkar H.P.S., Chen X.B. (eds). Estimation of Microbial Protein Supply in Ruminants Using Urinary Purine Derivatives. Springer, Dordrecht. 2004.

OLIVEIRA, C.A.F.; LOPES, L.C.; FRANCO, R.C.; CORASSIN, C.H. Composição e características físico-químicas do leite instável não ácido recebido em laticínio do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.12, n.2, p.508-515, 2011.

ØRSKOV, E. R.; MCDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage *Journal of Agricultural Science Cambridge* 92: 499-503. 1979.

SANTOS, F. A. P.; SANTOS, J. E. P.; THEURER, C. B. Effects of Rumen-Undegradable Protein on Dairy Cow Performance: A 12-Year Literature Review. **Journal of Dairy Science**, v.81, v.12, p.3182-3213, 1998.

SAS. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **Statistical analysis user's guide**. Version 8.2. Cary: SAS, 2001. 1686 p.

SAVARI, M.; KHORVASH, M.; AMANLOU, H.; GHORBANI, G. R.; GHASEMI, E.; MIRZAEI, M. Effects of rumen-degradable protein: rumen -undegradable protein ratio and corn processing on production performance, nitrogen efficiency, and feeding behavior of Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.101, p. 1111–1122, 2017.

SCHIMIDT, F. A. **Efeito do suprimento das exigências de energia e/ou proteína na recuperação da instabilidade do leite ao teste do etanol**. 2014. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2014.

SHEN, J. S.; SONG, L. J.; SUN, H. Z.; WANG, B.; CHAI, Z.; CHACHER, B.; LIU, J. X. Effects of Corn and Soybean Meal Types on Rumen Fermentation, Nitrogen Metabolism and Productivity in Dairy Cows. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v.28, n.3, p.351–359, 2015.

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

VAZ PIRES, A.; SUSIN, I.; SANTOS, F. A. P.; MENDES, C. Q.; OLIVEIRA JUNIOR, R. C.; FERNANDES, J. J. R.; SIMAS, J. M. C. Efeito de fontes e formas de processamento do amido sobre o desempenho e o metabolismo do nitrogênio em vacas holandesas em lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.8, p.1456-1462, 2008.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3583-3597, 1991.

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

WHITE, R. R.; ROMAN-GARCIA, Y.; FIRKINS, J. L.; KONONOFF, P.; VANDEHAAR, M. J.; TRAN, H.; MCGILL, T.; GARNETT, R.; HANIGAN, M. D. Evaluation of the National Research Council (2001) dairy model and derivation of new prediction equations. 2. Rumen degradable and undegradable protein. **Journal of Dairy Science**, v.100, n.5, p.3611–3627, 2017.

4 INCLUSÃO DE POLPA CÍTRICA E DE TAMPONANTE/ALCALINIZANTE NA DIETA DE VACAS LEITEIRAS NÃO ALTERAM A ESTABILIDADE DO LEITE

4.1 RESUMO

A hipótese do presente estudo foi: a substituição parcial de milho moído (MM) por polpa cítrica (PC) e a inclusão de tamponante/alcalinizante (TAC) em dietas de vacas leiteiras não altera o desempenho produtivo mas reduz a concentração de cálcio iônico (Cai) do leite, o que aumenta a estabilidade do leite ao etanol e ao aquecimento a 140°C (Tempo de coagulação – TC). O presente estudo objetivou avaliar o efeito da substituição parcial de MM por PC e a inclusão de TAC na dieta de vacas leiteiras sobre o metabolismo digestivo, produção e estabilidade do leite. Dezesesseis vacas Holandesas (média de 28 l de leite/d $\pm$ 4,8 e de 130 $\pm$ 81 dias em lactação; média $\pm$ DP) foram distribuídas em delineamento Quadrado Latino com quatro quadrados contemporâneos balanceados, quatro períodos de 21 d (14 d para adaptação e 7 d para coletas) e quatro tratamentos em arranjo fatorial 2 $\times$ 2. O fator 1 foi a substituição parcial (33%) de MM por PC. O fator 2 foi a inclusão de TAC (0,7% de bicarbonato de Na e 0,24% de óxido de Mg; base na MS); em dietas com 40:60 de relação volumoso:concentrado (base na MS). As vacas alimentadas com PC reduziram o consumo de MS (CMS) em 1,36 kg/d, mas tiveram aumento da digestibilidade aparente total da MS e FDN e da concentração ruminal dos ácidos acético e butírico, porém não houve alteração da produção de leite, o que resultou em maior eficiência produtiva das vacas alimentadas com PC. A substituição parcial de MM por PC reduziu a concentração ruminal dos ácidos iso-butírico e iso-valérico, a concentração de nitrogênio ureico do leite e teor de caseína e tendeu em reduzir o TC. Não houve efeito isolado da inclusão de PC e de TAC ou de interação entre eles sobre a concentração de Cai e estabilidade do leite ao teste do etanol. As vacas aumentaram o consumo de água em 29% quando alimentadas somente com MM em comparação com as alimentadas com PC. As vacas reduziram o tempo de ruminação em 6,6 min/kg de FDN ingerido quando foram alimentadas com inclusão de TAC nas dietas, comparado com aquelas alimentadas sem inclusão de TAC. Adicionalmente, a inclusão de TAC aumentou o teor de gordura do leite e o pH urinário, o que sugere que a inclusão de TAC contribuiu para reduzir a acidificação

ruminal e sanguínea. No entanto, não houve efeito das dietas sobre a estabilidade do leite ao etanol, mas houve tendência de redução do TC nas vacas alimentadas com inclusão de PC na dieta.

Palavras-chave: Acidose metabólica. Amido. Acidose ruminal. Cálcio iônico. LINA.

4.2 ABSTRACT

The hypothesis of present study was: partial replacement of ground corn (GC) with citrus pulp (CP) and the inclusion of buffering/alkalinizing (BA) in the diets of lactating cows does not change the lactating performance but reduces the milk concentration of ionic calcium (iCa), which increases the milk ethanol stability (MES) and heating at 140°C (Heat Coagulation Time – HCT). The present study aimed to evaluate the effect of partial replacement of GC with CP and BA inclusion in the diet of lactating cows on digestive metabolism, milk yield and milk stability. Sixteen Holstein cows (averaging 28 l of milk/d $\pm$ 4,8 and 130 $\pm$ 81 days in milk; mean $\pm$ SD) were distributed in a Latin Square design with four balanced contemporaneous squares, four periods of 21 d (14 d for adaptation and 7 d for sampling) and four treatments in a factorial arrangement 2 $\times$ 2. Factor 1 was the partial replacement of GC with CP (33% of replacement). Factor 2 was the inclusion of BA (0.7% of Na bicarbonate and 0.24% Mg Oxide; DM basis); in diets with 40:60 of forage:concentrate ratio (DM basis). Cows fed CP reduced DMI by 1.36 kg/d, but increased DM and NDF digestibility and ruminal concentration of acetic and butyric acids, however did not change the milk yield, which resulted in a higher productive efficiency of cows fed CP. The partial replacement of GC with CP reduced the ruminal concentration of iso-butyric and iso-valeric acids, the milk urea nitrogen concentration and the casein content and tended to reduce the HCT. There was no isolated effect of CP or BA inclusion or their interaction on iCa and the milk stability at the ethanol test. Cows increased the water intake time by 29% when they were fed diets only with GC in relation to those fed diets with CP inclusion. Cows reduced the rumination time by 6.6 min/kg of NDF ingested when were fed diets with BA inclusion, compared to those fed diets without inclusion of BA. In addition, BA inclusion increased milk fat content and urinary pH, which suggested that BA inclusion contributed to reduce the ruminal and blood acidification. However,

MES not changed in response to treatments, but HCT tended to be reduced in cows fed diets with inclusion of CP.

Key-Words: Metabolic acidosis. Starch. Ruminant acidosis. Ionic calcium. UNAM.

4.3 INTRODUÇÃO

Em muitos países o teste de estabilidade ao etanol (TEA) ou teste do Alizarol ainda é o principal teste de triagem para avaliação da qualidade do leite cru, para detectar problemas de instabilidade da caseína e de acidez do leite. Estudos no Brasil indicaram que a ocorrência de leite ácido é baixa, porém há alta frequência de amostras de leite não-ácidas, mas instáveis ao etanol. A ocorrência de leite instável não-ácido causa prejuízos à cadeia agroindustrial do leite devido às aos riscos de coagulação durante os processamentos térmicos industriais, gerando descartes de leite ou penalização do pagamento ao produtor (FISCHER et al., 2012).

Os principais fatores associados com a instabilidade do leite são nutricionais, metabólicos e genéticos (FISCHER et al., 2012). Dentre os fatores nutricionais, a deficiência de nutrientes é um dos mais estudados. Por exemplo, a deficiência nutricional aumenta o espaço entre as células epiteliais da glândula mamária, facilitando a entrada de íons do sangue para o leite (STUMPF et al., 2013). Além disso, o principal íon associado à instabilidade do leite é o cálcio iônico (Cai), pois o aumento da concentração de Cai no leite reduz as cargas negativas das micelas de caseína, o que facilita a coagulação das mesmas devido a menor força de repulsão eletrostática entre elas (BARROS et al., 1999).

Por outro lado, a ocorrência de acidose metabólica está associada à instabilidade do leite, devido ao aumento da concentração de cálcio iônico no sangue e no leite, como mecanismo compensatório da redução do pH sanguíneo (MARQUES et al., 2011; MARTINS et al., 2015a). Portanto, distúrbios digestivos, como a acidose ruminal, também podem estar associadas com a ocorrência de leite instável não-ácido (FISCHER et al., 2012). Adicionalmente, a acidose ruminal pode resultar em efeitos secundários que contribuem com a instabilidade do leite, como a redução do CMS e da digestibilidade de nutrientes (BAUCHEMIN e PENNER, 2014).

Nos atuais sistemas de produção de leite, especialmente em dietas totalmente misturadas (TMR), a ocorrência de acidose aguda é muito baixa, mas a ocorrência de acidose ruminal subaguda (SARA) pode ser elevada. A acidose subaguda é causada por acúmulo de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), cuja produção excede a absorção ruminal (BAUCHEMIN e PENNER, 2014). A ocorrência de acidose ruminal subaguda está associada à alta inclusão de amido na dieta e/ou baixa inclusão de FDN fisicamente efetiva, além de outros fatores relacionados a “efetividade” da dieta. Adicionalmente, o uso de tamponantes e alcalinizantes também foram associados com aumento do pH ruminal e prevenção de acidose ruminal subclínica (CRUYWAGEN et al., 2015).

O uso de estratégias para minimizar a acidificação ruminal sobre o teor de gordura do leite já foram bem definidos (BAUMAN e GRIINARI, 2003). No entanto, há escassez de informações sobre os efeitos destas estratégias nutricionais utilizadas para prevenir acidose ruminal subclínica sobre a estabilidade das proteínas do leite ao teste do etanol e ao aquecimento térmico. Portanto, o presente estudo avaliou as seguintes hipóteses: a substituição parcial de milho moído (MM) por polpa cítrica (PC) e o uso de tamponante/alcalinizante (TAC; bicarbonato de sódio associado à óxido de magnésio), em dietas com relação volumoso:concentrado de 40:60, reduzem a acidificação ruminal e sanguínea e aumentam a estabilidade do leite. Para testar estas hipóteses, o presente estudo objetivou avaliar o efeito da substituição parcial do milho por polpa cítrica peletizada e da inclusão de TAC na dieta de vacas leiteiras sobre o metabolismo digestivo, desempenho produtivo e estabilidade do leite bovino.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido de setembro a dezembro de 2016 no Setor de Bovinocultura Leiteira do Campus da USP Fernando Costa, Pirassununga-SP. Dezesesseis vacas da raça Holandesa, peso corporal de $600 \text{ kg} \pm 62$ (Média $\pm$ DP), produção de leite média de $28,05 \text{ L/d} \pm 4,79$ e dias em lactação médio = 130 ± 81 , foram distribuídas em delineamento do tipo quadrado latino com total de 4 quadrados contemporâneos balanceados, 4 períodos de 21 dias e 4 tratamentos em arranjo fatorial 2×2 (Tabela 9): o fator 1 correspondeu à substituição parcial (33%) de MM por PC peletizada e o fator 2 à inclusão de TAC. Dos 21 dias de cada período, os primeiros 14 dias foram

destinados à adaptação à dieta e os últimos 7 dias destinados à coleta de dados e de amostras. As dietas foram fornecidas em duas refeições diárias (manhã e tarde), formuladas para atender as exigências nutricionais de acordo com o NRC (2001). O acesso às dietas e a água foi *ad libitum*, de modo a permitir 5 a 10% de sobras.

Tabela 9 - Proporção de ingredientes e composição bromatológica das dietas para vacas leiteiras

Ingrediente, g/kg de MS	Com PC ¹		Sem PC	
	Com TAC	Sem TAC	Com TAC	Sem TAC
Silagem de milho	400	400	400	400
Milho moído	269	274	407	417
Polpa Cítrica	134	138	0	0
Farelo de soja	160	159	149	149
Ureia	7	7	7,8	7,8
Calcário calcítico	0	0	5,7	5,7
Bicarbonato Na	7,1	0	7,1	0
Sal comum	4,2	4,2	4,2	4,2
Óxido de Mg	2,4	0	2,4	0
Núcleo Mineral-Vitamínico ²	16,5	16,5	16,5	16,5
Composição nutricional das dietas, g/kg				
PB	165	165	166	167
Amido	251,4	254,6	325,2	331,2
FDN	304	306	267	269
FDNfe ³	177	196	137	132
FDA	212	213	177	177
NIDN	40,8	41,0	38,6	38,9
NIDA	33,2	33,5	29,7	29,9
EE	31,2	31,6	34,3	34,7
MM	43,0	43,4	34,6	34,7
Lignina	24,9	25,0	24,3	24,3
CNF	440	445	476	482
TDN	752	755	766	769
NEL, Mcal/kg	1,72	1,73	1,78	1,79

¹Dietas com ou sem inclusão de polpa cítrica (PC) em substituição parcial ao MM; ²Composição por kg de produto: 242 g Ca (min), 30 mg Co (min), 1008 mg Cu (min), 80 g S (min), 390 mg F1 (max), 39 g P (min), 60 mg I (min), 20 g Mg (min), 2998 mg Mn (min), 1100 mg monensina sódica (min), 30 mg Se (min), 4032 mg Zn (min), 400,000 UI Vit. A (min), 40,000 UI Vit. D3 (min), 1,450 UI Vit. E (min); ³FDNfe = FDN vs % partículas > 4 mm (Maulfair e Heinrichs, 2012).

Para compor as dietas experimentais, os seguintes ingredientes foram utilizados: silagem de milho como volumoso; farelo de soja e ureia como fontes de proteína bruta; MM e PC como fonte de CNF; suplemento mineral vitamínico, e bicarbonato de sódio e óxido de magnésio como fonte dietética de tamponante e alcalinizante, respectivamente.

Durante o período experimental foi mensurada a composição bromatológica da dieta, sobras e fezes; o consumo e a digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes; variáveis de metabolismo sanguíneo; produção de leite, a composição físico-química do leite (gordura, proteína, lactose, caseína, NUL, extrato seco desengordurado e sólidos totais), concentração de caseínas (α , β e κ) e de proteínas do soro (α -lactalbumina e β -lactoglobulina), concentração de cálcio iônico, teste de estabilidade ao etanol (TEA) e tempo de coagulação a 140°C (TC). As metodologias de coletas e análises utilizadas neste experimento foram realizadas de acordo a descrição na seção de metodologias do capítulo 3 (EFEITO DA RELAÇÃO PDR:PNDR E DO TIPO DE PROCESSAMENTO DO MILHO SOBRE O METABOLISMO DIGESTIVO, DESEMPENHO PRODUTIVO E ESTABILIDADE DO LEITE DE VACAS LEITEIRAS). Adicionalmente, amostras de líquido ruminal foram realizadas por meio de sonda esofágica 4 horas após o fornecimento da alimentação matinal. Aproximadamente, 300 mL de líquido ruminal inicialmente coletados foram descartados, e imediatamente o pH foi mensurado utilizando um potenciômetro. As amostras foram centrifugadas (50 mL/animal) e congeladas à -20° C para posteriores análises de NH-H₃ e AGCC. As concentrações de AGCC no fluido ruminal foi determinada por cromatografia em fase gasosa (GC-2014, Shimadzu, Japão), com coluna capilar (Stabilwax®, Restek, EUA; 30m de comprimento/ 0.53mm de diâmetro interno) a 145°C (isotérmica) e injetor split/splitless e detector dual FID a 250°C, utilizando o método descrito por Erwin, Marco e Emery (1961). A concentração de nitrogênio amoniacal foi determinada pelo método espectrofotométrico segundo Chaney e Marbach (1962).

Durante o 17º, 18º e 19º dias de cada período experimental foi avaliado o comportamento ingestivo com observações visuais a cada 5 minutos durante 48 horas, conforme metodologia adaptada de Büger et al. (2000). As variáveis analisadas foram tempo de alimentação (TAL, min), tempo de ruminação (TRU, min), tempo de mastigação total (TAL + TRU), tempo de ócio (TOC, min), e tempo gasto com outras atividades (TOU, min) (POLLI et al., 1996). Foi realizado o cálculo do índice de seleção de acordo com metodologia descrita por Leonardi e Armentano (2003), utilizando a estratificação de partículas das dietas e das sobras por meio da “*Penn State Particle*

Size Separator”, de acordo com a abertura das peneiras de: 19 mm (P1); 8 mm (P2), 4 mm (P3) e sem abertura (P4). O índice de seleção foi estimado pela diferença da retenção de partículas das dietas e das sobras em cada peneira vezes 100%, sendo o perfil da dieta adotado como o padrão. Portanto, valores < 100% indicaram rejeição do alimento e > 100% consumo preferencial.

Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo programa computacional Statistical Analysis System® (SAS, 2001), após verificação da normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias. Com a distribuição normal dos dados, o procedimento estatístico adotado foi de acordo com os efeitos principais dos tratamentos, pelo comando Proc-MIXED do SAS (2001), adotando-se nível de significância de 0,05, de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i (F1 + F2 + F1 \times F2) + Q_j + A_{(Q)k} + P_l + e_{ijkl},$$

em que, Y_{ijkl} = é o valor observado; μ = média geral; T_i = efeito fixo de tratamento i ($F1$ = Fator 1 – inclusão de TA na dieta; $F2$ = Fator 2 – substituição parcial de MM por PC; $F1 \times F2$ = interação entre os fatores $F1$ e $F2$); Q_j = efeito fixo do quadrado latino j , $j = 1$ a 4; $A_{(Q)k}$ = efeito aleatório do animal k dentro de cada quadrado latino, $k = 1$ a 16; P_l = efeito fixo do período l , $l = 1$ a 4; e_{ijkl} = erro aleatório associado a cada observação. Os graus de liberdade foram calculados de acordo com o método Satterthwaite ($DDFM = Satterth$). As médias foram ajustadas pelo LSMEANS do procedimento MIXED do SAS (2001) e comparadas pela opção DIFF. Para todas análises estatísticas, significância foi declarada quando $P \leq 0,05$ e tendência quando $P > 0,05$ e $\leq 0,10$.

4.5 RESULTADOS

No presente estudo, não houve interação entre substituição de MM por PC e inclusão de TAC na dieta sobre o consumo e a digestibilidade dos nutrientes. Porém, houve efeito da substituição de MM por PC sobre o CMS ($P = 0,001$), consumo de PB (CPB; $P = 0,0002$), eficiência

produtiva ($P = 0,001$), e coeficiente de digestibilidade da matéria seca (CDMS; $P = 0,012$) e da FDN (CDFDN; $P = 0,013$). A substituição parcial de MM por PC reduziu CMS em 1,36 kg/d, porém aumentou o CDMS, CDFDN e a eficiência de produção de leite.

Não houve interação ou efeito isolado das dietas sobre a produção de leite (PL), teor de Cai, TEA e teor de lactose do leite. Porém, houve tendência de redução da estabilidade do leite ao aquecimento a 140° C com a substituição parcial de MM por PC ($P = 0,067$). A inclusão de TAC na dieta aumentou ($P = 0,016$) o teor médio de gordura do leite de 3,19% para 3,38%. Houve efeito de interação entre substituição parcial de MM por PC e a inclusão de TAC na dieta apenas sobre o teor de proteína do leite ($P = 0,01$). Em dietas com PC em substituição parcial de MM por PC, a inclusão de TAC reduziu o teor de proteína do leite, porém não houve efeito da inclusão de TAC em dietas somente a base MM. Houve tendência ($P = 0,080$) de interação entre os fatores sobre o teor de caseína do leite.

De forma semelhante ao teor de proteína total do leite, o teor de caseína foi reduzido com a inclusão de TAC em dietas contendo PC. A substituição parcial de MM por PC reduziu em média o teor de NUL de 16,5 para 13,4 mg/dL ($P < 0,001$) e o teor de ESD de 8,53 para 8,48% ($P = 0,008$), enquanto que a inclusão de TAC aumentou ($P = 0,003$) o teor de ST do leite de 11,71 para 11,94%. Porém, não houve efeito das dietas e da interação sobre a produção diária, kg/d, de proteína, caseína, lactose, ST e ESD, sendo que houve apenas tendência de aumento da secreção de gordura com a inclusão de TAC (Tabela 10).

Tabela 10 - Efeito da substituição parcial de milho moído por polpa cítrica (PC) e inclusão de tamponante/alcalinizante (TAC) sobre o consumo, digestibilidade de nutrientes e desempenho produtivo em vacas da raça Holandesa

Variável	Com PC		Sem PC		EPM	P-valor		
	Com TAC	Sem TAC	Com TAC	Sem TAC		PC	TAC	PC× TAC
Consumo e Digestibilidade Aparente Total								
CMS ¹ , kg/d	20,6	20,2	22,1	21,3	0,384	0,001	0,134	0,585
CFDN ² , kg/d	5,51	5,42	5,69	5,46	0,099	0,312	0,121	0,508
CPB ³ , kg/d	3,44	3,41	3,74	3,65	0,066	0,001	0,344	0,629
CDMS ⁴ , %	69,96	69,96	68,09	66,77	0,99	0,012	0,476	0,477
CDFDN ⁵ , %	42,68	42,46	41,03	37,62	1,415	0,013	0,163	0,218
CDPB ⁶ , %	75,57	76,56	75,35	74,47	0,848	0,138	0,927	0,210
Produção, composição e estabilidade do leite								
PL ⁷ , kg/d	28	28,6	28	28,2	0,800	0,525	0,287	0,529
EP ⁸ , PL/CMS	1,36	1,42	1,25	1,32	0,023	0,001	0,040	0,941
PLC _{3,5%} ⁹ , kg/d	27,4	27,2	27,2	26,4	0,885	0,202	0,312	0,584
Gordura, kg/d	0,947	0,906	0,914	0,872	0,05	0,162	0,089	0,982
Proteína, kg/d	0,834	0,861	0,867	0,857	0,021	0,257	0,503	0,149
Caseína, kg/d	0,617	0,644	0,646	0,645	0,017	0,172	0,245	0,202
Lactose, kg/d	1,26	1,27	1,24	1,29	0,041	0,968	0,121	0,314
ESD ¹⁰ , kg/d	2,37	2,42	2,4	2,4	0,061	0,853	0,43	0,503
ST ¹¹ , kg/d	3,34	3,32	3,33	3,26	0,082	0,454	0,377	0,587
Gordura, %	3,43	3,25	3,34	3,14	0,184	0,181	0,016	0,899
Proteína, %	2,98 ^b	3,07 ^a	3,09 ^a	3,08 ^a	0,056	0,003	0,074	0,013
NUL ¹² , mg/dL	13,2	13,8	16,5	16,3	0,567	<0,001	0,681	0,392
Lactose, %	4,51	4,49	4,5	4,51	0,040	0,714	0,822	0,514
Caseína, %	2,21 ^b	2,30 ^a	2,30 ^a	2,32 ^a	0,050	0,002	0,005	0,079
ESD, %	8,44	8,52	8,55	8,56	0,076	0,008	0,053	0,1325
ST, %	11,97	11,77	11,91	11,66	0,210	0,238	0,003	0,7388
TEA ¹³ , %	74,7	74,1	75,9	74,1	0,990	0,396	0,115	0,381
TC ¹⁴ , min	23,9	22	33,3	26,6	4,060	0,067	0,262	0,512
Cai ¹⁵ , mg/L	162	162	162	169	6,631	0,389	0,417	0,447

¹CMS = Consumo de MS; ²CFDN = Consumo de FDN; ³CPB = Consumo de PB; ⁴CDMS = Coeficiente de digestibilidade da MS; ⁵CDFDN = Coeficiente de digestibilidade da FDN; ⁶CDPB = Coeficiente de digestibilidade da PB; ⁷PL = Produção de leite; ⁸EP = Eficiência produtiva; ⁹PLC_{3,5%} = Produção de leite corrigida para 3,5% de gordura; ¹⁰ESD = Extrato seco desengordurado; ¹¹ST = Sólidos totais; ¹²NUL = Nitrogênio Ureico do Leite; ¹³TEA = Teste de estabilidade ao etanol; ¹⁴TC = Tempo para coagulação a 140°C; ¹⁵Cai = Cálcio iônico.

Houve interação entre fonte de carboidrato não fibroso (CNF) e a inclusão de TAC sobre o tempo de alimentação (P = 0,0125) e sobre o tempo de alimentação/kg MS ingerida (P = 0,012).

Em média, quando as vacas foram alimentadas com PC e com TAC tiveram 41 min a mais de tempo de alimentação do que quando alimentadas com as demais dietas. Adicionalmente, o tempo de alimentação/ kg de MS também foi alterada pelas dietas experimentais, sendo que quando as vacas foram alimentadas com a dieta com inclusão de PC e TAC, houve gasto de 2,3 min a mais de tempo de alimentação/ kg de MS ingerida do que quando alimentadas com as demais dietas.

Adicionalmente, as vacas apresentaram maior tempo de alimentação/kg de MS ingerida quando foram alimentadas com dieta com inclusão de PC e sem TAC do que quando alimentadas sem inclusão de PC e com TAC. As dietas não alteraram o tempo total de ruminação, porém as vacas alimentadas sem inclusão de TAC na dieta tiveram maior tempo de ruminação/kg de FDN ingerido ($P = 0,039$) do que quando alimentadas com a inclusão de TAC na dieta. As vacas alimentadas somente com MM aumentaram o tempo de consumo de água ($P = 0,008$) em 40%, em relação quando foram alimentadas com PC. Houve interação entre inclusão de PC na dieta e de TAC sobre o tempo gasto com outras atividades, sendo que as vacas tiveram maior tempo com outras atividades quando foram alimentadas com dieta somente a base de MM e inclusão de TAC (Tabela 11).

Tabela 11 - Efeito da substituição parcial de milho moído por polpa cítrica (PC) e da inclusão de tamponante/alcalinizante (TAC) sobre o comportamento ingestivo de vacas leiteiras

Item	Com PC		Sem PC		EPM	P-valor		
	Com TAC	Sem TAC	Com TAC	Sem TAC		PC	TAC	PC×TAC
TAL, min ¹	303 ^a	266 ^b	248 ^b	271 ^b	12,88	0,020	0,516	0,005
TAL/kg CMS ²	14,7 ^a	12,9 ^b	11,3 ^c	12,8 ^{bc}	0,410	0,003	0,814	0,005
TRU, min ³	477	493	490	513	18,19	0,286	0,200	0,827
TRU/kg CFDN ⁴	88,2	92,9	87,4	95,9	2,440	0,710	0,039	0,542
TRU/kg CMS ⁵	23,7	24,9	22,5	24,5	0,630	0,316	0,061	0,631
TMT, min ⁶	762	752	738	784	22,09	0,795	0,331	0,125
TAG, min ⁷	25,1	25,8	34,4	36,3	4,220	0,008	0,724	0,863
TOC, min ⁸	579	596	591	557	22,69	0,459	0,639	0,161
TO, min ⁹	56,5 ^c	63,3 ^b	70,6 ^a	60,4 ^{bc}	3,030	0,023	0,479	<0,001
TD, min ¹⁰	778	785	809	787	22,56	0,340	0,653	0,382
TP, min ¹¹	283	304	273	284	22,06	0,374	0,360	0,762

¹TAL: tempo de alimentação (TAL, min/dia); ²TAL: tempo de alimentação (TAL/ kg de MS ingerida); ³TRU: tempo de ruminação (TRU, min/dia); ⁴Tempo de ruminação (TRU/ kg de FDN ingerido); ⁵Tempo de ruminação (TRU/ kg de MS ingerida); ⁶TMT: tempo de mastigação total (TMT, min/dia); ⁷TAG: tempo de ingestão de água (TAG, min/dia); ⁸TOC: tempo de ócio (TOC, min/dia); ⁹TO: tempo despendido em outras atividades (TO, min/dia); ¹⁰TD: tempo em posição deitada (TD, min/dia); ¹¹TP: tempo em posição em pé (TP, min/dia).

Não houve interação entre as dietas avaliadas sobre o índice de seleção de partículas das dietas. Houve tendência de rejeição de partículas longas (> 19 mm; $P = 0,082$) e de preferência por partículas entre > 4 mm e < 8 mm ($P = 0,052$) quando as vacas foram alimentadas sem inclusão de TAC, do que quando alimentadas com a inclusão de TAC. Quando as vacas foram alimentadas com inclusão de PC na dieta, independentemente da inclusão ou não de TAC, tiveram maior consumo de partículas médias (> 8 mm e < 19 mm; $P = 0,001$) e menor consumo de partículas pequenas (< 4 mm; $P = 0,006$), do que quando alimentadas sem inclusão de PC (Tabela 12).

Tabela 12 - Efeito da substituição parcial de milho moído por polpa cítrica (PC) e inclusão de tamponante/alcalinizante (TAC) sobre o índice de seleção de partículas da dieta de vacas leiteiras em lactação

Item	Com PC		Sem PC		EPM	P-valor		
	Com TAC	Sem TAC	Com TAC	Sem TAC		PC	TAC	PC×TAC
$> 19,0$ mm ¹	93,4	91,3	94,3	88,5	3,271	0,683	0,082	0,427
19,0 a 8,0 mm ²	99,8	99,9	97,8	96	0,806	$<0,001$	0,224	0,155
8,0 a 4 mm ³	100	101	100	101	0,684	0,999	0,056	0,905
< 4 mm ⁴	100	100	102	102	0,793	0,006	0,724	0,778

¹Partícula retida na peneira com abertura até 19 mm (P1); ²Partícula retida na peneira com abertura até 8 mm (P2);

³Partícula retida na peneira com abertura até 4 mm (P3); ⁴Partícula retida na peneira sem abertura (P4).

Houve interação entre a substituição parcial de MM por PC e inclusão de TAC sobre a concentração ruminal de N-NH₃ ($P = 0,047$). Quando as vacas foram alimentadas somente com MM e com TAC, foi observada maior concentração ruminal de N-NH₃ do que quando alimentadas com substituição parcial de MM por PC, independente da inclusão de TAC. Porém, não houve efeito da inclusão de TAC quando as vacas foram alimentadas com dietas sem PC. De outra forma, não houve interação entre substituição parcial de MM por PC e inclusão de TAC sobre a concentração e proporção dos AGCC.

A substituição parcial de MM por PC aumentou a concentração (Mmol/L) de ácido acético em 7,4% ($P = 0,007$), butírico em 14,6% ($P < 0,001$), a relação ácido acético:propiónico em 9,7% ($P = 0,042$), e reduziu a concentração dos ácidos iso-butírico em 26,6% ($P < 0,001$) e iso-valérico em 28,1% ($P < 0,001$); porém não alterou a concentração de ácido propiónico ($P = 0,942$), valérico

($P = 0,624$) e de total de AGCC ($P = 0,123$). De forma semelhante, a substituição parcial de MM por PC aumentou a proporção (% do total de AGCC) de ácido acético, butírico e reduziu a proporção dos ácidos iso-butírico, iso-valérico e propiônico. A inclusão de TAC reduziu a concentração de ácido propiônico ($P = 0,008$) e valérico ($P = 0,003$), apresentou tendência de aumento da concentração de ácido acético ($P = 0,093$), e aumentou a relação ácido acético:propiônico ($P = 0,004$).

Apesar da substituição parcial de MM por PC e da inclusão de TAC resultarem em alterações na concentração e proporção dos AGCC, não houve efeito dos fatores estudados, ou de suas interações, sobre o pH ruminal 4 horas após a alimentação matinal. Porém, houve interação entre as dietas sobre o pH urinário ($P = 0,027$). Em dietas com inclusão de TAC não houve diferença entre as dietas com ou sem substituição de MM por PC. Em dietas sem inclusão de TAC, a substituição parcial de MM por PC aumentou o pH urinário em relação a dieta sem PC, porém o pH urinário ainda foi menor que as dietas com TAC (Tabela 13).

Tabela 13 - Efeito da substituição parcial de milho moído por polpa cítrica (PC) e inclusão de tamponante/alcalinizante (TAC) sobre o pH urinário e metabolismo ruminal

Variável	Com PC		Sem PC		EPM	P-valor		
	Com TAC	Sem TAC	Com TAC	Sem TAC		PC	TAC	PC× TAC
pH urina	7,80a	7,00b	7,66a	6,38c	0,114	0,001	<0,001	0,027
pH ruminal	6,48	6,46	6,60	6,55	0,065	0,1	0,607	0,830
N-NH ₃ , mg/dl	8,09b	9,72b	14,64a	11,41ab	0,789	0,001	0,503	0,047
			Mmol/L					
Acético (C2)	51,91	50,36	48,99	46,23	1,132	0,007	0,093	0,625
Propiônico (C3)	18,37	20,17	16,98	21,72	0,749	0,942	0,008	0,212
Butírico (C4)	11,52	11,52	10,05	10,05	0,290	<0,001	0,998	0,990
Valérico	1,14	1,32	1,10	1,45	0,060	0,624	0,003	0,339
Iso-Butírico	0,529	0,491	0,732	0,658	0,022	<0,001	0,029	0,474
Iso-Valérico	1,10	1,03	1,53	1,39	0,057	<0,001	0,183	0,682
C2:C3	2,83	2,60	2,71	2,24	0,076	0,042	0,004	0,291
AGCC total	88,22	82,90	83,58	79,90	1,850	0,123	0,074	0,739
			% Total de AGCC					
C2	61,17	60,78	58,69	57,87	0,653	0,001	0,442	0,783
C3	22,00	22,76	24,61	25,14	0,738	0,037	0,582	0,924
C4	13,69	13,69	12,71	12,31	0,214	0,002	0,565	0,556
Valérico	1,30	1,39	1,45	1,36	0,082	0,425	0,994	0,274
Iso-Butírico	0,708	0,660	0,830	0,839	0,027	0,003	0,689	0,549
Iso-Valérico	1,37	1,35	1,76	1,80	0,069	0,002	0,928	0,796

4.6 DISCUSSÃO

Estabilidade do leite e desempenho produtivo

Os resultados deste estudo indicaram que, apesar do uso de PC e TAC na dieta alterarem variáveis como CMS, pH da urina, e índice de seleção de partículas, porém não afetaram a produção e a estabilidade do leite. Nas dietas sem inclusão de TAC, houve redução do pH urinário, especialmente nas dietas sem inclusão de PC em substituição parcial ao MM. Adicionalmente,

houve redução do teor de gordura do leite em dietas sem inclusão de TAC. Estes resultados indicaram que houve maior acidificação ruminal e sanguínea em dietas somente a base de MM e sem inclusão de TAC, fatores que foram previamente associados com redução da estabilidade do leite, em razão do aumento da concentração de cálcio iônico no leite em resposta compensatória à acidificação do sangue (BARROS, 2001; MARTINS et al., 2015a,b). Martins et al. (2015a) relataram que a redução do pH sanguíneo aumentou a concentração de cálcio iônico do leite, devido a redução das cargas negativas das micelas de caseína e a força de repulsão eletrostática entre elas, facilitando a coagulação do leite durante o teste do etanol ou aquecimento a 140°C. Porém, contrariamente a nossa hipótese, no presente estudo não houve alteração da concentração de cálcio iônico do leite e da estabilidade ao etanol devido a inclusão de TAC e PC em substituição ao MM.

Uma das possíveis explicações para resultados divergentes sobre acidificação sanguínea e concentração de cálcio iônico e estabilidade do leite, pode ser a intensidade da acidificação do leite e outros fatores relacionados com instabilidade do leite, como redução do consumo e digestibilidade de nutrientes (FISCHER et al., 2012). Nos estudos de Marques et al. (2011) e Martins et al. (2015), foram utilizados sais aniônicos na dieta para induzir a acidose metabólica, o que pode ter simulado condições de acidificação que só ocorreriam em condições mais extremas de acidose ruminal, como a acidose ruminal aguda.

Houve tendência da substituição parcial de MM por PC reduzir a estabilidade do leite a 140°C. Este resultado também contrariou nossa hipótese, mas pode estar relacionado ao menor consumo observado nas vacas alimentadas com estas dietas. No presente estudo, as vacas alimentadas com dietas que continham PC tiveram menor CMS, provavelmente em razão da menor palatabilidade da PC (CARMO et al., 2015). O consumo de nutrientes já foi relatado como um dos principais fatores associados positivamente com a estabilidade do leite (STUMPF et al. 2013), o que indica que o consumo e a digestibilidade dos nutrientes podem ser ainda mais limitante para a estabilidade do leite do que a acidificação ruminal e sanguínea em casos de acidose ruminal subaguda. Mesmo sendo observada redução no pH urinário em dietas sem PC, o aumento do consumo destas dietas pode ter sido fundamental para indicar tendência de aumento da estabilidade térmica do leite.

Portanto, os resultados do presente estudo indicaram que a associação entre acidose ruminal subaguda/acidificação sanguínea com estabilidade do leite devem serem avaliados com cautela, uma vez que os efeitos negativos de dietas com elevado teor de amido sobre a estabilidade do leite

podem variar de acordo com a intensidade de alterações do pH ruminal e sanguíneo, bem como de outras variáveis como o consumo e a digestibilidade de nutrientes.

A ocorrência de acidose ruminal subaguda pode reduzir o CMS e digestibilidade da fibra, causando variações de consumo e produção de leite. A acidose ruminal subaguda é caracterizada por quedas de pH ruminal, porém o pH é reestabelecido após cada redução. Estima-se que períodos longos (> 3-4h) de queda de pH reduzem a digestão da fibra (RUSSELL e WILSON, 1996) e a capacidade de absorção do epitélio ruminal (HARMON et al., 1985). Lesões no trato gastrointestinal podem facilitar a entrada de bactérias, aminas e toxinas (lipopolissacarídeos) para a circulação portal, causando abscessos hepáticos e respostas inflamatórias (GOHZO et al., 2005).

Todos estes fatores somados (redução do CMS, digestibilidade da FDN, capacidade absorptiva do epitélio ruminal, e da função hepática) podem reduzir o aporte energético ao metabolismo, o que poderia reduzir a estabilidade do leite. Stumpf et al. (2013) relatou que a restrição de nutrientes aumenta a permeabilidade do epitélio mamário, e facilita a passagem de íons, como o cálcio, reduzindo a estabilidade do leite ao etanol. Portanto, a associação negativa entre acidose ruminal e estabilidade do leite relatada em estudos prévios (MARQUES et al., 2011; FISCHER et al., 2012; MARTINS et al., 2015a) pode ocorrer em casos de maior intensidade de acidose ruminal subaguda ou aguda, e parcialmente com a redução do aporte energético à glândula mamária, potencializando o aumento de cálcio iônico e redução da estabilidade da micela de caseína.

A produção de leite não foi alterada pelas dietas avaliadas, o que fez com que as vacas alimentadas com PC tivessem maior eficiência alimentar devido ao menor CMS. Adicionalmente, apesar da inclusão de PC ter aumentado a digestibilidade da MS e da FDN, não houve efeito sobre o teor de gordura do leite. Os resultados da inclusão de PC sobre o desempenho produtivo de vacas em lactação são divergentes. De forma contrária ao presente estudo, Leiva et al. (2000) relatou que o uso de PC (20,5% da MS da dieta) reduziu a produção de leite e de proteína, porém aumentou o teor de gordura e de nitrogênio ureico do leite, em relação ao uso de MM. Em estudo com nível de inclusão de PC na dieta (20% da MS) semelhante ao do presente estudo, não houve efeito sobre o CMS e desempenho produtivo, porém houve aumento do teor de gordura do leite (BELIBASAKISA e TSIRGOGIANNI, 1996).

Carmo et al. (2015) avaliaram o aumento do teor de amido dietético, de 15 para 30% da MS, em substituição a PC. Houve aumento linear do CMS, de 20 para 22,9 kg/d, de acordo com a

inclusão de amido; enquanto que o teor de gordura do leite, a produção de leite e produção de leite corrigida para 3,5% de gordura aumentaram de forma quadrática, sendo a melhor resposta observada com 25% de amido na dieta. Entretanto, o teor e a produção diária de proteína bruta aumentaram linearmente com a inclusão de amido na dieta, o que sugere maior síntese de proteína microbiana pela maior disponibilidade de carboidratos fermentescíveis no rúmen.

No presente estudo, as vacas alimentadas somente com MM também apresentaram maior teor de proteína do leite, indicando maior síntese de proteína microbiana, provavelmente pelo maior teor de amido na dieta. Como houve interação entre substituição parcial do amido por PC e inclusão de TAC na dieta, vacas alimentadas com PC e sem TAC tiveram maior teor de proteína do leite, enquanto nas dietas sem PC não houve diferença entre a inclusão ou não de TAC. Resultados semelhantes foram observados por Cruywagen et al. (2015), que avaliaram dietas com alto teor de inclusão de MM (40% da MS da dieta), mas não houve efeito da inclusão de bicarbonato de sódio ou algas calcárias sobre o teor de proteína do leite. Adicionalmente, o uso de bicarbonato de sódio reduziu em 4,3 h o tempo de permanência do pH ruminal abaixo de 5,5, enquanto que o uso de algas calcárias reduziu em 8,7 h, em relação ao controle. Como resposta de maior do controle das condições ruminais, a inclusão de tamponantes aumentou a produção de leite e teor de gordura do leite (CRUYWAGEN et al. 2015).

Comportamento ingestivo e fermentação ruminal

Apesar de observarmos neste estudo alterações das concentrações e proporções de AGCC e de redução do pH urinário em vacas alimentadas sem PC e/ou sem TAC, não houve efeito das dietas sobre o pH ruminal 4 horas após a alimentação matinal. Uma limitação do presente estudo foi de que a coleta de líquido ruminal foi realizada com uso de sonda esofágica, o que pode superestimar os valores de pH ruminal devido a possível contaminação com saliva (SALLES et al., 2015). Adicionalmente, nossos resultados prévios indicaram que os valores mais baixos de pH ruminal foram encontrados entre 10 – 12 horas após a alimentação matinal (FONSECA, 2018), mas nós não conseguimos estimar o tempo em que o pH ruminal permaneceu abaixo de 5,5 ou 6,

que seria uma forma mais precisa de estimar a ocorrência de acidose ruminal subaguda (CRUYWAGEN et al., 2015)

Os resultados do presente estudo sobre comportamento ingestivo indicaram que as vacas podem alterar o comportamento ingestivo na tentativa de minimizar a redução do pH ruminal em razão dos efeitos dietéticos na produção e tamponamento de ácidos orgânicos. Quando houve inclusão de TAC nas dietas, as vacas ruminaram menos 6,6 min/kg de FDN ingerido. Dijkstra et al (2012) estimou que o uso de 170 g/d de bicarbonato de sódio é equivalente a produção de 23 L/d de saliva, o que pode ter compensado a redução do tempo de ruminação/kg de FDN ingerido observada no presente estudo, e ter contribuído com controle da acidificação, pois apesar de não ter ocorrido alteração do pH ruminal, ocorreu aumento do pH urinário.

Além do risco de superestimar os valores de pH ruminal devido à contaminação por saliva em coleta com sonda esofágica, as amostras de líquido ruminal foram coletadas apenas 3 horas após a alimentação matinal, e outras variáveis como tempo de pH < 5,8 e demais tempos de coletas ao longo do dia não foram medidos. Os principais indicativos de que o uso de TAC pode ter contribuído para mitigar a acidificação ruminal foi o aumento do pH urinário e do teor de gordura do leite, uma vez que este último está positivamente associado com o pH ruminal. Com a redução do pH ruminal, ocorrem alterações de rotas de biohidrogenação e produção de ácidos graxos *trans* (CLA trans10, cis12), previamente associados com redução do teor de gordura do leite (BAUMAN e GRIINARI, 2003).

A substituição parcial de MM por PC aumentou a concentração e a proporção dos ácidos acético e butírico e a relação acetato:propionato, o que pode ter ocorrido devido ao aumento da digestibilidade da FDN. Hristov e Ropp (2003) avaliaram dois tipos de dietas: 1) com alto teor de carboidratos não estruturais fermentescíveis (cevada + melaço) e 2) com alto teor de fibra altamente fermentescível (milho + PC e grãos de destilaria). De forma semelhante ao presente estudo, não houve efeito das dietas avaliadas sobre o pH ruminal médio ao longo do dia e sobre a digestibilidade aparente do total da MS e da FDN, produção de N microbiano e desempenho produtivo das vacas.

Quando as vacas foram alimentadas sem inclusão de PC, houve aumento de seleção de partículas pequenas e o tempo de consumo de água em 40%, sugerindo aumento considerável no consumo de água. Além do tamanho de partícula da fibra da dieta (FDNfe), demais fatores relacionados a “efetividade da fibra” também contribuem para manutenção do pH ruminal e

prevenção de acidose ruminal subclínica. Outros fatores de “efetividade da fibra” podem ser relacionados à cinética ruminal, como taxa de passagem de líquidos, passagem de partículas pequenas, diluição de amido e de ácidos orgânicos.

O rúmen está em gradiente osmótico com o sangue, e, portanto, o sangue regula o volume de líquido do rúmen. Com a maior passagem de água do sangue para o rúmen, ocorrem estímulos de sede para aumento do consumo de água pela vaca para evitar desidratação (DOBSON, 1984). Fraley et al. (2015) observou que o aumento do consumo de água em 27 L/d foi associado ao aumento da taxa de passagem de líquidos de 0 à 9 h após a alimentação, o que resultou em menor peso total da digesta ruminal, sugerindo que o consumo de água pode aumentar a passagem da fase líquida e com ela partículas pequenas, resultando no efeito “washout” que minimiza a redução de pH ruminal. Portanto, o aumento do consumo de água pode contribuir para reduzir os efeitos da produção de ácidos durante a fermentação, facilitando a passagem dos mesmos para os demais compartimentos, bem como de partículas pequenas, podendo ser considerado um mecanismo de resposta para minimizar a acidificação ruminal.

O volume ruminal de líquidos apresenta grande variação (até 134%) ao longo do dia, com o menor valor observado antes da alimentação. Este aumento de volume líquido no rúmen foi associado com aumento de taxa de passagem, bem como de partículas de menor tamanho e de ácidos presentes no fluído ruminal. Esta associação sugeriu que a taxa de passagem de líquidos pode ser variável ao longo do dia, e aumentada após picos de fermentação ruminal, sendo um mecanismo de controle de pH ruminal que precisa ser melhor estudado (GASA et al., 1991).

No presente estudo, não houve efeito da substituição parcial de MM por PC sobre o tempo total de ruminação/kg de FDN ingerido. Porém, as vacas alimentadas com PC peletizada aumentaram o tempo de alimentação e a taxa de consumo (tempo de alimentação/CMS), indicando que as vacas se alimentaram por mais tempo e em menor quantidade, o que contribui para redução da acidificação ruminal (CROSSLEY et al., 2017). Diferentemente do presente estudo, Beauchemin et al. (1991) relataram aumento do tempo de ruminação/kg de FDN ingerido ao substituir fonte de amido (cevada) por polpa de beterraba ou casca de aveia.

Estudos recentes relataram que o tempo total de mastigação e de ruminação variaram amplamente, de 396 à 973 min/d e de 236 à 610 min/d, respectivamente (médias = 717 e 436 min/d, respectivamente; WHITE et al., 2017) e de 425 à 969 min/d e 151 à 632 min/d, respectivamente (Média = 691 e 434 min/d, respectivamente; ZEBELI et al., 2006). As médias observadas de tempo

de mastigação e ruminação total nos estudos de White et al. (2017) e Zebeli et al. (2006) foram similares aos observados no presente estudo, sugerindo que apesar da utilização de dietas com relação volumos:concentrado de 40:60, as mesmas alteraram as atividades de mastigação e ruminação.

As vacas alimentadas somente com MM apresentaram maiores concentrações ruminais de N-NH₃ e de iso-ácidos (iso-butírico e iso-valérico), o que pode indicar maior deaminação de aminoácidos pela microbiota ruminal. Como consequência, também houve aumento da concentração de NUL quando não houve inclusão de PC na dieta. A produção de isoácidos pela fermentação ruminal de aminoácidos varia de acordo com a disponibilidade de proteína degradável no rumen e/ou do crescimento microbiano (LEEK, 2006). O aumento da concentração de iso-ácidos pode indicar maior síntese microbiana em dietas somente com MM, o que provavelmente também está associado ao aumento do teor e da produção de proteína do leite.

4.7 CONCLUSÃO

A substituição parcial de MM por PC reduziu o CMS, porém esta redução não foi suficiente para afetar o desempenho produtivo das vacas, o que resultou em maior eficiência produtiva quando a PC foi incluída na dieta. A substituição parcial de MM por PC aumenta a digestibilidade da FDN e a concentração dos ácidos acético e butírico, reduz a concentração de AGCC de cadeia ramificada e a concentração de NUL, porém reduz o teor e produção de caseína do leite e não altera o teor de gordura. A inclusão de TAC na dieta aumenta o teor de gordura do leite e o pH urinário. A inclusão de 60 % de concentrado na dieta e uso de somente MM como fonte energética do concentrado não foram suficientes para alterar a estabilidade do leite. Portanto, os efeitos de acidificação ruminal sobre a estabilidade do leite dependem da intensidade de alterações do pH ruminal, sendo que no presente estudo, houve leve redução do pH urinário em dietas somente com MM e sem inclusão de TAC, o que não foi suficiente para aumentar o teor de cálcio iônico do leite e reduzir a estabilidade do leite. A redução do consumo de nutrientes, observada pela inclusão de PC na dieta, indicou possível redução da estabilidade do leite a 140°C, mesmo sem ter sido observada redução na produção de leite. Portanto, a redução de consumo, sobretudo de consumo

de energia, parece afetar mais a estabilidade do leite do que o aumento de acidificação ruminal e sanguínea em dietas com alto teor de concentrado.

4.8 REFERÊNCIAS

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 17th edition. Gaithersburg, MD, USA, Association of Analytical Communities, 2000.

BARROS, L. **Transtornos metabólicos que afetam a qualidade do leite**. In: GONZÁLES, F. H. D.; DURR, J. W.; FONTANELLI, R. S. (Eds.). *Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras*. Porto Alegre: 2001. p.44-57.

BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Review of Nutrition**, v.23, p.203–227. 2003.
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.nutr.23.011702.073408>.

BEAUCHEMIN, K and PENNER, G. 2014. New Developments in Understanding Ruminal Acidosis in Dairy Cows. Extension. USDA National Institute of Food and Agriculture, New Technologies for Ag Extension project. Disponível em: <http://articles.extension.org/pages/26022/new-developments-in-understanding-ruminal-acidosis-in-dairy-cows>

BEAUCHEMIN, K. A.; FARR, B. I.; RODE, M. Enhancement of the Effective Fiber Content of Barley-Based Concentrates Fed to Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.9, p.3128-3139, 1991.

BELIBASAKISA, N. G.; TSIRGOGIANNIB, D. Effects of dried citrus pulp on milk yield, milk composition and blood components of dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v.60, n.1-2, p.87-92, 1996.

BENTLEY INSTRUMENTS. **Bentley 2000**: operator's manual. Chaska: Bentley Instruments, 1995a.

BENTLEY INSTRUMENTS. **Chemspeck 150**: user's guide. Chaska: Bentley Instruments, 1998.

BENTLEY INSTRUMENTS. **Somacount 300**: operator's manual. Chaska: Bentley Instruments, 1995b.

BÜRGER, P. J.; PEREIRA, J. C.; QUEIROZ, A. C.; SILVA, J. F. C.; VALADARES FILHO, S. C.; CECON, P. R.; CASALI, A. D. P. Comportamento Ingestivo em Bezerros Holandeses Alimentados com Dietas Contendo Diferentes Níveis de Concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 1, p. 236-242, 2000.

CARMO, C. A.; BATISTEL, F.; SOUZA, J.; MARTINEZ, J. C.; CORREA, P.; PEDROSO, A. M.; SANTOS, F. A. P. Starch levels on performance, milk composition and energy balance of lactating dairy cows. **Tropical and Animal Health Production**, v.47, p.179-184, 2015.

CASALI, A. O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C.; PEREIRA, J. C.; HERIQUES, L. T.; FREITAS, S. G.; PAULINO, M. F. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimentos in situ. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.37, n.2, p.335-342, 2008.

CHANEY, A. L.; MARBACH, E. P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, v.8, p.130-132, 1962.

CROSSLEY, R. E.; HARLANDER-MATAUSCHEK, A.; DEVRIES, T. J. Mitigation of variability between competitively fed dairy cows through increased feed delivery frequency. **Journal of Dairy Science**, v.101, n.1, p.518-529, 2018.

CRUYWAGEN, C. W.; TAYLOR, S.; BEYA, M. M.; CALITZ, T. The effect of buffering dairy cow diets with limestone, calcareous marine algae, or sodium bicarbonate on ruminal pH profiles, production responses, and rumen fermentation. *Journal of Dairy Science*, v.98, p.5506–5514, 2015.

DIJKSTRA, J. et al. Ruminal pH regulation and nutritional consequences of low pH. *Animal Feed Science and Technology*, v.172, p.22-33, 2012. Available from: <[http://www.animalfeedscience.com/article/S0377-8401\(11\)00494-9/pdf](http://www.animalfeedscience.com/article/S0377-8401(11)00494-9/pdf)>. Accessed: Jan. 30, 2014. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2011.12.005.

DOBSON, A. 1984. Blood flow and absorption from the rumen. *Q. J. Exp. Physiol.* 69:599–606.

EHRMAN, T. 6 Determination of Starch in Biomass Samples by Chemical Solubilization and Enzymatic Digestion. LAP-016 U.S. **Department of Energy National Bioenergy Center**, Washington, D.C. 1996.

LEEK, B. F. Digestão no estômago do ruminante. In: REECE, W. O. Dukes. *Fisiologia dos animais domésticos*. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 404-437, 2006.

ERWIN, E. S.; MARCO, G. J.; EMERY, E. M. Volatile fatty acid analyzes of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v.44, n.9, p.1768-1771, 1961.

FISCHER, V.; RIBEIRO, M. E. R.; ZANELA, M. B.; MARQUES, L. T.; ABREU, A. S.; MACHADO, S. C.; FRUSCALSO, V.; BARBOSA, R. S.; STUMPF, M. T. Leite instável não ácido: um problema solucionável? **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.13, n.3, p.838-849, 2012.

FONSECA, D. C. M. **Metabolismo digestivo e estabilidade do leite de vacas alimentadas com fontes de carboidratos não fibrosos e diferentes degradabilidade ruminal da proteína**. 2018.

115 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, 2018.

FOSS ANALYTICAL. **MilkoScan 6000 FT+**: operator's manual. Dinamarca, 2008.

FRALEY, S. E.; HALL, M. B.; NENNICH, T. D. Effect of variable water intake as mediated by dietary potassium carbonate supplementation on rumen dynamics in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.98, n.5, p.3247-3256, 2015.

GASA, J.; HOLTENIUS, K.; SUTTON, J. D.; DHANOA, M. S. Rumen fill and digesta kinetics in lactating Friesian cows given two levels of concentrates with two types of grass silage ad lib. **Brit. J. Nutri.**, v.66, n.3, p.381-398, 1991.

GOZHO, G.N., J.C. PLAIZIER, D.O. KRAUSE, A.D. KENNEDY; K.M. WITTENBERG. 2005. Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. **Journal of Dairy Science**, 88:1399.

HARMON, D. L., R. A. BRITTON, R. L. PRIOR, AND R. A. STOCK. 1985. Net portal absorption of lactate and volatile fatty acids in steers experiencing glucose-induced acidosis or fed 70% concentrate diet ad libitum. **Journal of Anim. Science**, 60:560.

HARVATINE, K.J.; ALLEN, M.S. 2006. Effects of fatty acid supplements on milk yield and energy balance of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89:1081-1091. (7) Addition of unsaturated fatty acids improves digestion of mid lactating dairy cows. Available from: https://www.researchgate.net/publication/275673480_Addition_of_unsaturated_fatty_acids_improves_digestion_of_mid_lactating_dairy_cows [accessed Jun 14 2018].

HRISTOV, A. N.; ROPP, J. K. Effect of dietary carbohydrate composition and availability on utilization of ruminal ammonia nitrogen for milk protein synthesis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.86, n.7, p.2416-2427, 2003.

MAULFAIR, D. D.; HEINRICHS, A. J. 2012. REVIEW: Methods to measure forage and diet particle size in the dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v.28, p.489–493, 2012.

LEIVA, E.; HALL, M. B.; VAN HORN, H. H. Performance of dairy cattle fed citrus pulp or corn products as sources of neutral detergent-soluble carbohydrates. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.12, p.2866-2875, 2000.

LEONARDI, C; ARMENTANO, L. E. Effect of quantity, quality and length of alfalfa hay on selective consumption by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 557 – 564, 2003.

MARQUES, L. T.; FISCHER, V.; ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R.; STUMPF JUNIOR, W.; RODRIGUES, C. M. Produção leiteira, composição do leite e perfil bioquímico sanguíneo de vacas lactantes sob suplementação com sal aniônico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.5, p.1088-1094, 2011.

MARTINS, C. M. M. R.; ARCARI, M. A.; WELTER, C. K.; GONÇALVES, J. L.; SANTOS, M. V. Effect of dietary cation-anion difference on ruminal metabolism, total apparent digestibility,

blood and renal acid-base regulation in lactating dairy cows. **Animal: An International Journal of Animal Bioscience**, p.1-11. doi:10.1017/S1751731115001548. 2015a.

MARTINS, C. M. M. R.; ARCARI, M. A.; WELTER, K. C.; SARAN NETO, A.; OLIVEIRA, C. A. F.; SANTOS, M. V. Effect of dietary cation-anion difference on performance of lactating dairy cows and stability of milk proteins. **Journal of Dairy Science**, v.98, p.2650-2661, 2015b.

MERTENS, D. R. 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.

NEGRI, L.; CHAVES, M.; TAVERNA, M.; CUATRIN, A.; RUBIOLO, A. Determinación de las variables que afectan la estabilidad térmica de la leche utilizando un método capilar para evaluar el tiempo de coagulación por calor. **Revista Argentina de Lactología**, n.22, p.33-44, 2003.

NOCEK, J.E. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility. A review. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.2051-2069, 1988.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7. rev. ed. Washington, DC.: Natl. Acad. Sci., 2001. 381p.

NEGRI, L.; CHAVES, M.; TAVERNA, M.; CUATRIN, A.; RUBIOLO, A. Determinación de las variables que afectan la estabilidad térmica de la leche utilizando un método capilar para evaluar el tiempo de coagulación por calor. **Revista Argentina de Lactología**, n.22, p.33-44, 2003.

POLLI, V. A.; RESTLE, J.; SENNA, D. B.; ALMEIDA, S. R. S. Aspectos relativos à ruminação de bovinos e bubalinos em regime de confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.25, n.5, p.987 – 993, 1996.

RUSSELL, J. B.; D. B. WILSON. 1996. Why are cellulolytic bacteria unable to digest at low pH? **Journal of Dairy Science**, 79:1503-1509.

SALLES, A.; RIBEIRO, T. M. C.; SARAN NETO, A.; DEL CLARO, G. R. Metabolic changes in ruminant calves fed cation-anion diets with different proportions of roughage and concentrate. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, p.414-420, 2012.

SAS. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **Statistical analysis user's guide**. Version 8.2. Cary: SAS, 2001. 1686 p.

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

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3583-3597, 1991.

WHITE, R. R.; HALL, M. B.; FIRKINS, J. L.; KONONOFF, P. J. Physically adjusted neutral detergent fiber system for lactating dairy cow rations, II: Development of feeding recommendations. **Journal of Dairy Science**, v.100, n.12, p. 9569-9584, 2017.

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

ZEBELI, Q.; TAJAJ, M.; STEINGASS, H.; METZLER, B.; DROCHNER, W. Effects of Physically Effective Fiber on Digestive Processes and Milk Fat Content in Early Lactating Dairy Cows Fed Total Mixed Rations. **Journal of Dairy Science**, v.89, n.2, p.651-668, 2006.

5 CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS E REOLÓGICAS DO LEITE INSTÁVEL NÃO-ÁCIDO PASTEURIZADO

5.1 RESUMO

O presente estudo objetivou avaliar o efeito da estabilidade do leite ao teste do etanol sobre o processamento de pasteurização, viscosidade aparente durante a vida de prateleira e avaliação sensorial do leite pasteurizado. Vinte e duas vacas em lactação (média de produção de leite = 23.7 L/d $\pm$ 7,7 e dias em lactação = 288 $\pm$ 94; Média $\pm$ DP) foram bloqueadas por número de lactação e balanceadas de acordo com produção e a estabilidade do leite antes do início do período experimental em uma das seguintes dietas: 1) não-acidogênica, com inclusão de bicarbonato de sódio ou 2) acidogênica, com inclusão de cloreto de amônio. O experimento teve duração de 56 dias, sendo que durante os 14 primeiros todas as vacas receberam a dieta controle (período de covariável; d -14 a d 0), os 21 dias seguintes foram destinados à adaptação das vacas às dietas experimentais (período de adaptação; d +1 a d +21), os outros 7 dias seguintes foram destinados a coleta de amostras e de dados individuais de leite para avaliação da produção e composição do leite (d +22 a d +28; período experimental), e os últimos 7 dias para realização da pasteurização do leite (d +29 a d +35). O leite submetido à pasteurização foi obtido de três vacas de cada grupo, selecionadas de acordo com produção e composição do leite semelhantes, mas com diferentes estabilidades do leite: 1) controle (estabilidade do leite ao etanol $\geq$ 80%;) e 2) instável (estabilidade do leite ao etanol $\leq$ 72). O leite total foi obtido durante duas ordenhas diárias e em dois dias (d1 e d2), refrigerado à 2-4° C por 24 horas, homogeneizado e pasteurizado a 75° C/ 20 sec: 1 - Controle d1; 2 - Instável d1; 3 - Controle d2; 4 - Instável d2). O leite de cada subgrupo em cada dia de ordenha/processamento foi envasado em embalagens plásticas translúcidas que foram armazenadas com proteção da luz ambiente e conservadas à 0,5° C. Seis dias após o primeiro processamento (d1) e 4 dias após o segundo (d2), foi realizado painel sensorial com 112 provadores não treinados. Adicionalmente, aos 0, 7, 14, 21 e 42 dias após processamento foram avaliadas a presença de precipitação (em escala de 1 à 5) e a viscosidade aparente. O pH urinário das vacas reduziu de 8 (dieta não-acidogênica) para 5,8 (dieta acidogênica), indicando acidificação sanguínea nesses animais. No entanto, não houve efeito das dietas sobre a produção e composição do leite, as

subunidades de caseínas (CN; α s1-CN, α s2-CN, β -CN e κ -CN), o teor de cálcio iônico e a estabilidade do leite ao etanol e ao aquecimento a 140°C. Houve tendência de redução do teor de β -lactoglobulina (Lg; $P = 0,098$) em 48% com a utilização da dieta aniônica. A estabilidade do leite ao etanol ($\geq 80\%$ vs ≤ 72) não alterou as características sensoriais de cheiro e aparência, mas houve tendência ($P = 0,09$) de aumento do escore de aceitação para sabor do leite instável, em relação ao leite estável ao etanol 80%. Entretanto, a estabilidade do leite não alterou a intenção de compra dos avaliadores. Adicionalmente, durante os 42 dias de armazenamento não foram observadas presença de precipitações, e a viscosidade do leite não foi afetada pela estabilidade do leite ao etanol. Portanto, após a pasteurização, o leite com baixa estabilidade ao etanol não tem aumento de viscosidade ou piora da percepção sensorial dos consumidores durante a vida de prateleira, quando comparado ao leite estável ao etanol 80%.

Palavras-Chave: Análise sensorial. Caseínas. LINA. Pasteurização. Vida de prateleira.

5.2 ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the effect of milk ethanol stability on pasteurization stability, apparent viscosity through shelf-life and sensorial analysis of pasteurized milk. Twenty-two lactating dairy cows (average milk yield = $23.7 \text{ l/d} \pm 7.7$ and days in milk = 288 ± 94 ; Mean $\pm$ DP) were blocked by number of lactation and balanced according to milk yield and stability before the beginning of the trial into one of following diets: 1) non-acidogenic, with inclusion of sodium bicarbonate or 2) acidogenic, with inclusion of ammonia chloride. The trial had 56 days, as the first 14 days all cows received the control diet (co-variable period; d -14 to d 0), the following 21 days were designate to cow's adaptation of experimental diets (adaptation period; d +1 to d +21), the following 7 days were designate to data registers and samplings (d +22 to d + 28), and last 7 days designate to milk pasteurization (d +29 to d+35). Milk submitted to pasteurization was obtained from three cows of each group, selected according to milk yield and composition, and designate to following subgroups according to milk ethanol stability: 1) control (milk ethanol stability $\geq 80\%$) and 2) unstable (milk ethanol stability ≤ 72). Total milk was obtained from two daily milking through two days (d1 and d2), chilled at 2-4 ° C for 24 h, homogenized and pasteurized at 75° C/

20 sec: 1 – Control d1; 2 – unstable d1; 3 – control d2; 4 – unstable d2). Milk from each subgroup in each day of milking/processing were packaging in translucent plastic bottles that were storage under light protection at 0,5 ° C. Six days after the first processing (d1) and 4 days after second (d2), a sensorial analysis was performed with 112 tasters not-trained. Additionally, at 0, 7, 14, 21 and 42 days after pasteurization the presence of clots (scale from 1 to 5) and apparent viscosity. Urinary pH reduced from 8 (non-acidogenic diet) to 5.8 (acidogenic diet), indicating blood acidification. However, there was no diet effect on milk yield, composition and casein subunits (CN; α s1-CN, α s2-CN, β -CN and κ -CN), ionic calcium content and milk stability at ethanol and heating at 140°C. There as a tendency of β -lactoglobulin (Lg; $P = 0,098$) be reduced with anionic diet. Milk ethanol stability ($\geq 80\%$ vs ≤ 72) did not change milk sensorial characteristics of smell and aspect, but there as a tendency ($P = 0.09$) of increase the acceptance of taste for unstable milk, compared to milk stable at ethanol 80%. However, milk stability did not change the buy intention of tasters. Additionally, through 42 days of storage there was no presence of clots, and apparent viscosity was not affected by milk stability. Milk ethanol-unstable can be pasteurized without increase apparent viscosity through shelf-life and without impair sensorial perceptions of consumers compared to milk stable at ethanol 80%. Therefore, after pasteurization, milk with low ethanol stability does not has increased viscosity or worsening of sensorial perceptions through shelf-life, when compared with milk stable at ethanol 80%.

Key-words: Sensorial analysis. Caseins. UNAM. Pasteurization. Shelf-life.

5.3 INTRODUÇÃO

O teste de estabilidade ao etanol (TEA) é o principal teste de triagem para avaliação da qualidade do leite cru dentro da fazenda anteriormente da coleta do leite pelo caminhão tanque. A instabilidade do leite ao etanol pode ocorrer não apenas por alta acidez do leite, mas também por fatores associados às características das dietas, do manejo nutricional, da saúde da glândula mamária, de distúrbios metabólicos e da genética dos animais (FISCHER et al., 2012). A incidência de leite instável sem acidez no Brasil é alta (ZANELA et al, 2006; FISCHER et al., 2012), e apesar deste leite não apresentar riscos para a saúde humana, a resistência térmica durante processos

industriais do leite é limitada. Nos últimos anos, a ocorrência de leite instável sem acidez adquirida tem resultado em prejuízos econômicos à cadeia agroindustrial do leite, uma vez que o leite com reação positiva ao TEA não é captado pela indústria ou o produtor pode sofrer alguma penalização no pagamento. Adicionalmente, muitas empresas aumentaram o teor de etanol no TEA, visando obter aumento da estabilidade leite para o processamento, o que agravou ainda mais os prejuízos a cadeia láctea (FISCHER et al., 2012).

Apesar da baixa relação entre estabilidade do leite ao etanol e resistência ao teste da fervura e ao aquecimento à 140°C (FISCHER et al., 2012; MARTINS et al., 2015), o TEA ainda é empregado devido sua praticidade e rapidez de resultados. O leite instável não ácido apresenta estabilidade térmica para produção de iogurte batido (RIBEIRO et al., 2006) e queijos de massa firme (COSTABEL et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011). Porém, ainda não foi avaliada a estabilidade destes derivados durante a vida de prateleira e as características sensoriais, especialmente para a produção de leite fluído.

O principal componente lácteo associado negativamente com a estabilidade do leite é o teor de cálcio iônico (Cai). O aumento do teor de Cai reduz as cargas negativas das micelas de caseínas e a força de repulsão eletrostática entre elas, facilitando a coagulação quanto em contato com o etanol ou durante o aquecimento térmico. No entanto, há indícios de que o teor de Cai se correlaciona positivamente com a estabilidade do leite ao etanol, porém não apresenta correlação ao aquecimento térmico (MARTINS et al., 2015a), o que sugere limitações do TEA para estimar da estabilidade térmica do leite, quando outros fatores além da acidez do leite estão associados. Ainda, os principais fatores nutricionais associados com aumento de teor de Cai do leite, como a deficiência nutricional e a acidose metabólica, podem reduzir a estabilidade ao TEA e ao tempo de aquecimento a 140°C. Portanto, mecanismos adicionais podem afetar a estabilidade do leite não-ácido, como a proporção entre subunidades de caseínas na micela (MARTINS et al., 2015a).

As hipóteses do presente estudo foram de que a acidificação sanguínea, induzida pelo fornecimento de dieta acidogênica aumenta o teor de Cai e reduz a estabilidade do leite ao TEA e ao aquecimento térmico. Adicionalmente, o leite instável não-ácido apresenta estabilidade térmica adequada ao processamento por pasteurização, sem alterações reológicas e sensoriais durante a vida de prateleira. Para testar as hipóteses, o presente estudo objetivou avaliar o efeito da acidose metabólica induzida pelo uso de dieta acidogênica para vacas em lactação sobre a composição e a

estabilidade do leite e avaliar as características reológicas e sensoriais do leite instável não-ácido pasteurizado durante a vida de prateleira.

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

O Experimento 3 foi dividido em duas etapas: **Etapas 1:** Foram utilizadas 22 vacas da raça Holandesa, com produção média de $23,7 \text{ L/d} \pm 7,7$ (Média $\pm$ DP), 288 ± 94 dias em lactação e $640 \text{ kg} \pm 75$ de peso corporal, alojadas em sistema do tipo “free-stall”, e distribuídas em delineamento em blocos ao acaso (número de lactações: primíparas e multíparas). As vacas foram distribuídas de forma balanceada (de acordo com a produção de leite e a estabilidade ao TEA) para receber duas dietas: 1) não-acidogênica, com inclusão de bicarbonato de sódio ou 2) acidogênica, com inclusão de cloreto de amônio (Tabela 14).

O fornecimento de dieta acidogênica objetivou a indução de produção de leite instável, conforme descrito por Marques et al. (2011) e Martins et al. (2015a). O experimento teve duração de 56 dias, sendo que durante os 14 primeiros todas as vacas receberam a dieta não-acidogênica (período de co-variável; d -14), os 21 dias seguintes foram destinados à adaptação das vacas às dietas controle ou acidogênica (período de adaptação; d +21), os outros 7 dias seguintes foram destinados à coleta de amostras para avaliar a composição do leite (d +22 à d +28; período experimental), de dados individuais de produção de leite e os últimos 7 dias para realização da pasteurização do leite.

Tabela 14 - Proporção de ingredientes e composição bromatológicas das dietas para vacas leiteiras

Ingrediente, g/kg de MS	Dietas	
	Não-acidogênica	Acidogênica
Silagem de milho	609	609
Milho moído	165	165
Farelo de soja	130	135
Ureia	6,3	0
Sal comum	2,4	3,6
Bicarbonato de Na	9,7	0,7
Cloreto de amônio	0	9,7
Toxfin ¹	1,0	1,0
Núcleo Mineral-Vitamínico ²	18,8	18,8
Composição nutricional das dietas, g/kg		
PB	145	145
FDN	345	345
FDA	242	242
NIDN	4,07	4,09
NIDA	3,63	3,68
EE	33,4	33,5
MM	35,6	35,9
Lignina	24,5	24,6
CNF	362,5	363,9
BCAD ³ , mEq/kg MS	295	-9

¹Toxfin = Sequestrante de micotoxinas, Kemin®. ²Composição por kg de produto: 242 g Ca (min), 30 mg Co (min), 1008 mg Cu (min), 80 g S (min), 390 mg Fl (max), 39 g P (min), 60 mg I (min), 20 g Mg (min), 2998 mg Mn (min), 1100 mg monensina sódica (min), 30 mg Se (min), 4032 mg Zn (min), 400,000 UI Vit. A (min), 40,000 UI Vit. D3 (min), 1,450 UI Vit. E (min). ³BCAD = Balanço cátion-aniônico.

A produção média diária foi registrada em balanças eletrônicas do sistema de ordenha durante os dias: -5 a -1 (período de covariável); e +22 a +28 do período de experimental. As amostras de leite foram coletadas durante as duas ordenhas diárias, durante os dias -2 a -1 (período de covariável) e +27 a +28 d do período de experimental, e mantidas refrigeradas destampadas (para ocorrer liberação de dióxido de carbono) por até 24 h para as análises da concentração de Cai, pH e TEA e ao aquecimento a 140°C. Também durante os dias -2 a -1 (período de covariável) e +27 a +28 do período experimental, amostras de leite individuais foram coletadas em cada ordenha e imediatamente congeladas a -20° C, para realização das análises de subunidades de caseína e de proteínas do soro. Durante os dias -3 a -1 (período de covariável) e +26 a +28 do período experimental, amostras de leite foram coletadas e conservadas com bronopol, para

determinação dos teores de gordura, lactose, sólidos totais, extrato seco desengordurado, caseína e proteína bruta. Por fim, amostras de alimentos e sobras de cada bloco foram coletadas semanalmente e congeladas para posteriores análises bromatológicas. As metodologias de coleta e análises das amostras de leite, dietas e sobras foram realizadas de acordo com o descrito no capítulo 3 (EFEITO DA RELAÇÃO PDR:PNDR E DO TIPO DE PROCESSAMENTO DO MILHO SOBRE O METABOLISMO DIGESTIVO, DESEMPENHO PRODUTIVO E ESTABILIDADE DO LEITE DE VACAS LEITEIRAS).

Etapa 2: Como não houve efeito das dietas experimentais sobre a produção, composição e estabilidade do leite (Tabela 17), foram selecionadas três vacas amostras por tratamento para coleta de amostras de leite a ser submetido à pasteurização. Na etapa 2, as vacas foram selecionadas com base na produção, composição e estabilidade TEA semelhantes para formação dos dois subgrupos: baixa estabilidade (TEA ≤ 72) e alta estabilidade (TEA: $\geq 80\%$; Tabela 15). O leite total de cada subgrupo foi obtido durante as duas ordenhas diárias em dois dias (d1 e d2): +33 e +35. Após cada ordenha nos d +33 e d +35, o volume total de leite ordenhado foi refrigerado a 2-4°C por 24 horas, de acordo com a estabilidade (baixa e alta), e posteriormente homogeneizado e pasteurizado a 75° C/ 20 s, em duas repetições (d1 e d2).

Tabela 15 - Composição do leite instável ou controle destinados ao processamento de pasteurização

Composição	LINA (Estabilidade $\leq 72\%$)		CONTROLE (Estabilidade $\geq 80\%$)	
	Média	DP	Média	DP
			%	
Gordura	4.0	0.1	4.1	0.1
Proteína	3.6	0.1	3.7	0.1
Lactose	4.4	0.0	4.6	0.0
Sólidos totais	13.0	0.1	13.4	0.1
Sólidos não gordurosos	8.9	0.0	9.3	0.1
Nitrogênio ureico, mg/dL	15.5	1.0	15.4	1.3
Caseína	2.7	0.1	2.9	0.1
Caseína, % Proteína	76.8	0.2	77.0	0.8

Para a pasteurização, o leite foi homogeneizado à 200 Bar em homogeneizador com vazão nominal de 150 L/h (Artepeças P&B, Brasil), e a pasteurização realizada a 75° C durante 20

segundos, em trocador de calor a placas elétrico com vazão nominal de 150 L/h, equipado com válvula pneumática de retorno de produto não pasteurizado (Sumá Ind. e Com. Ltda). Para a embalagem do leite, garrafas plásticas translúcidas com 500 mL de capacidade foram previamente descontaminadas por imersão completa em ácido peracético 0,05% (v/v) a 50° C, durante 30 minutos, e, posteriormente, novamente descontaminadas por aspersão com ácido peracético no interior das embalagens. As garrafas foram mantidas na cabina para drenagem da solução excedente, e posteriormente, as tampas das garrafas plásticas foram alocadas em sacos plásticos e autoclavadas à 120° durante 1 hora, para uso em no máximo 24 horas após desinfecção. O envase do leite nas garrafas plásticas foi por meio do uso de dosadora gravimétrica microprocessada semi-automática (Polienva-Movitron, São Paulo, SP), alocada em cabina de fluxo de ar unidirecional (Veco do Brasil; Figura 8). Após o envase, as embalagens foram lacradas com seladora por indução e, finalmente, tampadas. As embalagens foram armazenadas com proteção da luz ambiente e armazenadas à 0,5° C (Figura 9). As amostras de leite antes e após o processamento de pasteurização foram coletadas para análises de contagem de coliformes totais, *E. coli*, microrganismos aeróbios e psicrotróficos (Tabela 16) utilizando meios de cultura do tipo Petrifilm™ (3M Microbiology, St. Paul, MM, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante (3M/BR, 2006, 2007, 2009).

Figura 8 - Planta piloto de pasteurização e envase: A) Trocador de calor em placas (figura à esquerda); B) Cabine de segurança de fluxo de ar vertical (imagem do centro); C) seladora por indução (imagem à direita da figura)

Figura 9 - Embalagem selada com seladora por indução e armazenamento do leite pasteurizado à 0,5° C, protegida da luz ambiente

Tabela 16 - Contagem de microrganismos do leite antes e após a pasteurização, de acordo com a estabilidade ao etanol

	Baixa estabilidade (TEA ≤ 72%)	Alta estabilidade (TEA ≥ 80%)
DIA 1	Leite Cru	
Coliformes totais	$1,8 \times 10^{-4}$	$3,2 \times 10^{-2}$
Aeróbios Totais	$1,5 \times 10^{-5}$	$5,4 \times 10^{-5}$
<i>Escherichia coli</i>	Ausente	Ausente
Psicrotróficos	Ausente	Ausente
	Leite Pasteurizado	
Coliformes totais	Ausente	$1,9 \times 10^{-1}$
Aeróbios	$4,3 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^{-2}$
<i>Escherichia coli</i>	Ausente	Ausente
Psicrotróficos	Ausente	Ausente
DIA 2	Leite Cru	
Coliformes totais	$3,2 \times 10^{-4}$	3×10^{-4}
Aeróbios	$5,4 \times 10^{-5}$	$3,0 \times 10^{-5}$
<i>Escherichia coli</i>	$1,0 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-4}$
Psicrotróficos	Ausente	Ausente
	Leite Pasteurizado	
Coliformes totais	Ausente	Ausente
Aeróbios	Ausente	$5,2 \times 10^{-2}$
<i>Escherichia coli</i>	Ausente	Ausente
Psicrotróficos	Ausente	Ausente

As variáveis respostas avaliadas após o processamento foram: precipitação proteica, em escala de 1 a 5 (1 - leite estável sem precipitação; 2 - precipitação leve, areia; 3 – precipitação média, grumos pequenos; 4 - precipitação intensa, grumos grandes; e 5 - precipitação muito intensa, semelhante a uma rede; ZANELA et al., 2006) e viscosidade aparente. Esta última foi determinada com viscosímetro digital programável (Brookfield, mo-delo DV-II+), com sonda cilíndrica n° 2 e velocidade de 60 rpm, a 20° C. Os resultados de viscosidade foram expressos em Centipoise (cP), registrados a cada 10 segundos durante o período necessário para estabilizar os valores, sendo cada análise conduzida por período mínimo de 5 minutos. Essas três variáveis foram repetidas por cinco vezes ao longo dos 42 dias de armazenamento: 0 (após pasteurização); 7, 14, 21 e 42 dias após pasteurização. Adicionalmente, 6 dias após a pasteurização, foi realizado painel sensorial de degustação de 4 amostras de leite (2 amostras por tratamento e por repetição, total de 4 amostras).

Para as análises sensoriais, foram selecionados 112 provadores não treinados, os quais atribuíram notas em escala de 1 a 9 para cada amostra de leite de acordo com o grau de aprovação ou desaprovação: 1 = Desgostei muitíssimo e 9 = Gostei muitíssimo. Também foi avaliada a intenção de compra das amostras (certamente compraria; provavelmente compraria; talvez compraria, talvez não; provavelmente não compraria; certamente não compraria). Os testes sensoriais foram realizados de acordo com os procedimentos descritos por Stone e Sidell (1985), nos quais as amostras foram servidas monadicamente (cerca de 30 mL) a temperatura próxima à 7° C (Figura 10).

Figura 10 - Determinação da viscosidade aparente do leite com um viscosímetro digital programável (Brookfield, modelo DV-II+), utilizando-se sonda cilíndrica n 4 e velocidade de 50 rpm

Análises estatísticas

Os resultados foram analisados pelo programa computacional Statistical Analysis System® (SAS, 2001), após verificação da normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias. Com a distribuição normal dos dados, o procedimento estatístico adotado foi de acordo com os efeitos principais dos tratamentos, pelo comando Proc-MIXED do SAS (2001), adotando-se nível de significância de 0,05. A avaliação do efeito das dietas experimentais sobre a produção, composição e estabilidade do leite, foi de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ij} = \mu + \text{Trat}_i + \text{Bloco}_j + \text{Cov}_k + e_{ij},$$

em que Y_{ij} = é o valor observado; μ = média geral; Trat_i = efeito fixo de tratamento i ; Bloco_j = efeito aleatório do bloco; Cov_k = Efeito fixo da covariável em questão; e_{ij} = erro aleatório associado a cada observação. Os graus de liberdade foram calculados de acordo com o método Satterthwaite (DDFM = Satterth).

O efeito da estabilidade do leite ao etanol (estável ou instável) sobre a viscosidade aparente e características sensoriais do leite pasteurizado foi avaliado de acordo com o seguinte modelo foi adotado:

$$Y_{ijk} = \mu + \text{Trat}_i + \text{Bloco}_j + \text{Tempo}_k + \text{Trat}_i * \text{Tempo}_k + e_{ij},$$

em que Y_{ijk} = é o valor observado; μ = média geral; Trat_i = efeito fixo de tratamento (estabilidade ao álcool $\leq 72\%$ vs $\geq 80\%$) i ; Bloco_j = efeito aleatório do bloco; Tempo_k = Efeito fixo do tempo de prateleira; $\text{Trat}_i * \text{Tempo}_k$ = efeito fixo de interação entre tempo de prateleira e tratamento; e_{ij} = erro aleatório associado a cada observação. Os graus de liberdade foram calculados de acordo com o método Satterthwaite (DDFM = Satterth).

As análises realizadas durante o período de estocagem do leite foram analisadas como medidas repetidas no tempo, sendo o efeito de tempo, bem como suas interações com os demais efeitos fixos do modelo, avaliados na sub-parcela. Diversas estruturas de erros foram investigadas, e a estrutura escolhida foi de acordo com o critério de informação Bayseano (BIC).

5.5 RESULTADOS

Etapa 1 – pH urinário, produção e composição do leite

O pH urinário das vacas reduziu de 8 (dieta não acidogênica) para 5,8 (dieta acidogênica; $P < 0,001$; Figura 11). No entanto, não houve efeito das dietas sobre a produção (Figura 12) e composição do leite, estabilidade do leite ao TEA e ao aquecimento a 140°C, e concentração de Cai. De forma semelhante, não houve efeito das dietas experimentais sobre o teor de α s1-CN ($P = 0,406$), α s2-CN ($P = 0,998$), β -CN ($P = 0,794$), κ -CN ($P = 0,680$) e α -La ($P = 0,456$) e proporção de κ -CN glicosilada ($P = 0,775$) e não glicosilada ($P = 0,958$). Porém, houve tendência de redução do teor de β -Lg ($P = 0,098$) em 48% com a utilização da dieta acidogênica em comparação à dieta não-acidogênica (Tabela 17).

Figura 11 - Efeito das dietas (acidogênica e não-acidogênica) sobre o pH urinário de vacas leiteiras em lactação

Figura 12 - Produção de leite de acordo com dieta (acidogênica e não-acidogênica) e os dias de experimento

Tabela 17 - Efeito das dietas sobre a composição e estabilidade do leite

Variável	não-acidogênica	Acidogênica	EPM	P-Valor
TEA ¹ , %	77,7	77,9	1,8	0,931
TC ² , min	32,3	32,5	8,64	0,986
Cai ³ , mg/L	161	157	6,62	0,722
pH	6,7	6,7	0,025	0,822
Gordura, %	3,6	3,9	0,165	0,146
Proteína, %	3,52	3,54	0,052	0,755
Lactose, %	4,43	4,48	0,036	0,366
Nitrogênio ureico, mg/dl	15,4	16,9	1,34	0,462
Caseína, %	2,68	2,7	0,047	0,746
Sólidos não gordurosos, %	8,9	8,99	0,07	0,365
Sólidos totais, %	12,6	13	0,21	0,208
α ₁ -CN, %Proteínas ⁴	25,87	26,65	1,8	0,406
α ₂ -CN, %Proteínas	8,6	8,62	0,6	0,998
β -CN, %Proteínas	28,97	28,04	2,468	0,794
κ -CN, %Proteínas	22,68	24,04	2,3	0,68
κ ₁ (glicosilada), % κ -CN	18,9	16,41	6,01	0,775
κ ₂₊₃ (não glicosilada), % κ -CN	81,10	80,65	5,99	0,958
β -Lg ⁵ , %Proteínas	8,63	4,49	1,66	0,098
α -La ⁶ , %Proteínas	5,23	6,39	1,06	0,456

¹TEA = Teste de estabilidade ao etanol (% de etanol na mistura para provocar coagulação do leite). ²TC = Tempo de coagulação a 140°C. ³Cai = Cálcio iônico. ⁴Subunidades de caseínas (CN) em percentual do total de proteínas identificadas por CLAE (α ₁-CN + α ₂-CN + β -CN + κ -CN + β -Lg + α -La = 100%). ⁵ β -Lg = β -lactoglobulina. α -La = α – lactalbumina.

Etapas 2 – Pasteurização, análise sensorial e características reológicas

Após a pasteurização, amostras de ambos tratamentos apresentaram adequada resistência térmica, sem a formação de coágulos visíveis. Neste estudo, o leite instável não-ácido (LINA) não apresentou alterações nas características sensoriais, cheiro e aparência em relação ao leite estável ao etanol 80%. Porém, de acordo com a percepção dos 112 painelistas não treinados, o leite instável a 72% teve tendência ($P = 0,09$) de maior nota no quesito sabor (7,33) contra 7,11 para o leite estável a 80%. Em uma escala de 1 à 9, os provadores classificaram, em média, o sabor, cheiro e aparência do leite pasteurizado em 7,22, 6,45 e 7,78, respectivamente (Tabela 18).

Tabela 18 - Avaliação sensorial do leite estável ao teste do etanol 80% ou instável ao teste do etanol 72%

Avaliação sensorial	Estabilidade ao teste do etanol		EPM	P - valor
	$\geq 80\%$	$\leq 72\%$		
Sabor	7,11	7,33	1,039	0,095
Cheiro	6,43	6,48	1,023	0,419
Aparência	7,79	7,78	1,019	0,786

De forma geral, a estabilidade do LINA ao teste do etanol não alterou a intenção de compra dos avaliadores, porém houve tendência de redução do percentual de provadores que certamente não comprariam o leite instável a 72%, em relação ao leite estável a 80%. Dois por cento dos provadores declararam que certamente não comprariam amostras de leite estável ao etanol 80%, e apenas 0,4% declararam que não comprariam amostras de leite instável ao etanol 72% ($P = 0,09$). Em média, pelo menos 67% dos provadores declararam que provavelmente comprariam leite pasteurizado com as características das amostras avaliadas no presente estudo (Tabela 19). Não houve efeito da estabilidade do leite sobre a viscosidade aparente do leite pasteurizado refrigerado durante 42 dias de armazenamento (Figura 13), bem como não houve aumento de viscosidade do leite pasteurizado até 21 dias de armazenamento.

Tabela 19 - Intenção de compra (%) do leite estável ao teste do etanol 80% ou instável ao teste do etanol 72%, realizada com 112 avaliadores não treinados

Intensão de Compra	Estabilidade ao teste do etanol		EPM	P - valor
	$\geq 80\%$	$\leq 72\%$		
Certamente compraria	31,1	33,7	4,7	0,602
Provavelmente compraria	35,2	35,7	4,9	0,921
Talvez compraria/talvez não compraria	17,4	18,3	3,7	0,806
Provavelmente não compraria	6,7	5,1	2,1	0,436
Certamente não compraria	2,23	0,37	1,2	0,094

Figura 13 - Viscosidade aparente do leite pasteurizado e armazenada durante 42 dias de acordo com a estabilidade ao teste do etanol realizada antes do processamento

5.6 DISCUSSÃO

Estabilidade do leite

Os resultados deste estudo indicaram que a utilização de dieta acidogênica não alterou a estabilidade do leite, apesar de ter reduzido o pH urinário, o que sugere a acidificação sanguínea. Martins et al. (2015) também descreveram que a utilização de dieta acidogênica por meio da redução do balanço cátion-aniônico (BCAD) reduz o pH sanguíneo e urinário. Porém, no estudo de Martins et al. (2015) houve redução da estabilidade do leite ao etanol e ao aquecimento a 140° C. Diferentemente do presente estudo, Martins et al. (2015) utilizaram sulfato de amônio para redução do BCAD em substituição ao bicarbonato de sódio, e também observaram redução do CMS e da produção de leite de vacas alimentadas com dieta acidogênica, o que pode sugerir que houve redução da disponibilidade de nutrientes para glândula mamária, fator este associado com a instabilidade do leite (FISCHER et al., 2012). No presente experimento, foi utilizado cloreto de amônio em substituição ao bicarbonato de sódio para reduzir o BCAD, e não foram observadas

alterações na produção de leite em relação a dieta não acidogênica, o que pode indicar que o CMS pode também não ter sido alterado ou as alterações não foram suficientes para causar alguma deficiência nutricional e limitar a síntese de leite. Desta forma, pode-se sugerir que no estudo de Martins et al. (2015), a redução no CMS pode ter contribuído para redução da estabilidade do leite. A restrição no consumo de nutrientes aumenta a concentração de Cai e reduz a estabilidade do leite, por meio de aumento da permeabilidade entre as junções firmes do epitélio da glândula mamária, facilitando a passagem de íons do sangue para o leite (STUMPF et al., 2013).

No estudo de Marques et al. (2011), foi observada que a adição de 250 g/d de cloreto de amônio reduziu a estabilidade do leite ao TEA e não alterou a produção de leite, porém foi observado aumento do teor de nitrogênio ureico do leite e redução do teor total de proteína. Em nosso estudo, foram incluídos 200 g/d de cloreto de amônio (20% a menos do que no estudo de Marques et al., 2011) em substituição à ureia, para manter teores similares de PB e PDR nas dietas. No experimento descrito no Capítulo 3 (EFEITO DA RELAÇÃO PDR:PNDR E DO TIPO DE PROCESSAMENTO DO MILHO SOBRE O METABOLISMO DIGESTIVO, DESEMPENHO PRODUTIVO E ESTABILIDADE DO LEITE DE VACAS LEITEIRAS), foi observado que o aumento da relação PDR:PNDR da dieta reduziu a estabilidade do leite ao etanol. Portanto, os efeitos da acidificação ruminal e sanguínea sobre a estabilidade do leite podem depender da intensidade com que as mesmas ocorrem, e também estarem associados com redução do CMS e com a digestibilidade dos nutrientes em casos de acidificações mais intensas.

No presente estudo, não houve efeito das dietas sobre o teor de subunidades de caseínas do leite, porém as vacas alimentadas com dieta acidogênica tiveram tendência de ter maiores teores de β -Lg na proteína total do leite. Apesar desta alteração, não houve efeito das dietas sobre a estabilidade do leite. De forma semelhante ao presente estudo, Martins et al. (2015) descreveram relação linear positiva do aumento do balanço cátion-aniônico da dieta e o teor de β -Lg do leite.

Processamento de pasteurização

Os resultados da pasteurização indicaram que o leite com baixa estabilidade ($TEA \leq 72\%$) apresentou estabilidade térmica e características sensoriais e reológicas similares ao leite estável

ao etanol 80%, com tendência de preferência de sabor do leite instável em relação ao estável. Desta forma, com base nos resultados deste estudo, o leite instável ao etanol 72% pode ser utilizado para produção de leite pasteurizado, o que poderia reduzir os descartes de leite por problemas de instabilidade ao etanol.

Estudos prévios já relataram potencial de uso do leite instável não ácido (LINA) para produção de iogurte batido (RIBEIRO et al.; 2006), queijos de massa firme (OLIVEIRA et al., 2011; COSTABEL et al., 2009) e queijo tipo prato (ABREU, 2015). Porém, não há estudos sobre o efeito do processamento de LINA sobre as deposições de resíduos sólidos de leite nas placas de troca de calor do pasteurizador e nos sistemas de processamento por ultra alta temperatura (UAT), o que pode causar interrupções adicionais para limpeza do sistema e reduzir eficiência de processamento da planta.

Estudos anteriores (MARTINS et al., 2015; FISCHER et al., 2012) descreveram ausência de associação entre a estabilidade do leite ao etanol e o teste de aquecimento do leite a 140°C por imersão em banho de glicerina (HCT – Tempo de coagulação ao aquecimento), o que indicou que o leite instável poderia suportar temperaturas de 140°C. Porém, ainda faltam estudos que avaliam o efeito da estabilidade ao TEA sobre a resistência térmica com processamentos industriais de UAT. Considerando os dois sistemas básicos de processamento por UAT (troca de calor em placas ou injeção direta de vapor), no primeiro caso, o aquecimento do leite ocorre de forma mais lenta, o que pode favorecer a complexação de β -lactoglobulina com κ -caseína, aumentando a estabilidade da micela proteica. Este mesmo fenômeno ocorre durante a pasteurização, no entanto, ao direcionar o leite diretamente para o sistema de injeção direta de vapor, o aumento da temperatura do leite é muito mais rápido, o que dificulta a formação destes complexos na micela, facilitando coagulação da mesma (MANZI e PIZZOFERRATO, 2006). Ainda são ausentes evidências científicas sobre a capacidade do LINA em suportar o processamento térmico de UAT atualmente utilizado, especialmente por injeção direta de vapor.

Na avaliação sensorial do leite, houve tendência dos provadores atribuírem maiores notas de sabor nas amostras de leite de baixa estabilidade do que nas de alta estabilidade. Não foram encontrados estudos sobre a avaliação sensorial de leite instável ao etanol 72% pasteurizado. Porém, um estudo avaliou o perfil cristalográfico de amostras de LINA (instável ao etanol 72%), e observou maior cristalização e quantidade de α -lactose em amostras instáveis em relação as estáveis ao teste do etanol, sendo que estas últimas apresentaram outras formas de lactose

predominantes, como beta-lactose (FAGNANI et al., 2016). Portanto, estas alterações do polimorfismo da lactose do leite instável podem estar associadas às pequenas alterações no sabor do leite, mas de forma favorável ao leite instável.

Nosso estudo foi o primeiro que demonstrou que o leite instável ao etanol 72% pode ser processado por pasteurização rápida sem prejuízos nas características sensoriais e reológicas durante o armazenamento. A maioria dos estudos avaliaram os efeitos da alta contagem bacteriana e de células somáticas sobre a vida de prateleira e sabor do leite. O aumento da contagem bacteriana ou de células somáticas do leite foram relacionados ao aumento de proteases termo resistentes e lipases lipoproteicas, causando degradação de proteínas e gorduras durante a vida de prateleira, o que pode resultar em sabor desagradável do leite (BARBANO et al., 2006).

5.7 CONCLUSÃO

A inclusão de sal aniônico na dieta reduziu o pH urinário, o que indica a acidificação sanguínea, porém, não foram observadas alterações de produção, composição e estabilidade do leite. Desta forma, não foi possível neste estudo associar instabilidade do leite com acidificação sanguínea, sendo que futuros estudos podem ser conduzidos para avaliar o efeito de acidificações mais intensas, e que também resultem em redução de CMS e digestibilidade dos nutrientes, sobre a estabilidade do leite ao TEA e aquecimento à 140° C. Após a pasteurização, o leite com baixa estabilidade ao etanol não tem aumento de viscosidade ou piora da percepção sensorial dos consumidores durante a vida de prateleira, quando comparado ao leite estável ao etanol 80%.

REFERÊNCIAS

ABREU, A.S. Fatores nutricionais e não nutricionais que afetam a composição do leite bovino. 2015.271f. Tese (Doutorado em Zootécnica) Faculdade de Agronomia – UFRGS – Porto Alegre-RS, 2015.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 17th edition. Gaithersburg, MD, USA, Association of Analytical Communities, 2000.

BARBANO, D. M.; SANTOS, M. V. Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. **Journal of Dairy Science**, v.89, Suppl 1:E15-9, 2006.

BARROS, L. **Transtornos metabólicos que afetam a qualidade do leite**. In: GONZÁLES, F. H. D.; DURR, J. W.; FONTANELLI, R. S. (Eds.). *Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras*. Porto Alegre: 2001. p.44-57.

BOBE, G; BEITZ, D. C.; FREEMAN, A. E. et al. Separation and quantification of bovine milk proteins by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.458-463, 1998.

COSTABEL, L. M. Estudio de la relación entre aptitud a la coagulación por cuajo y prueba de alcohol en muestras de leche de vacas individuales. In: I CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE LEITE INSTÁVEL. 1., 2009, Pelotas. Anais... Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009.

FAGNANI, R.; BATTGLINI, A. P. P.; BELOTI, V.; UBERBANO, A.; BRONZOL, J. C. Alcohol Stability of Milk from the Perspective of X-Ray Diffractometry. *Food Biophysics*, v.11, n.2, p.198-205, 2016.

FISCHER, V.; RIBEIRO, M. E. R.; ZANELA, M. B.; MARQUES, L. T.; ABREU, A. S.; MACHADO, S. C.; FRUSCALSO, V.; BARBOSA, R. S.; STUMPF, M. T. Leite instável não ácido: um problema solucionável? **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.13, n.3, p.838-849, 2012.

MARQUES, L. T.; FISCHER, V.; ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R.; STUMPF JUNIOR, W.; RODRIGUES, C. M. Produção leiteira, composição do leite e perfil bioquímico sanguíneo de vacas lactantes sob suplementação com sal aniônico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.5, p.1088-1094, 2011.

MARTINS, C. M. M. R.; ARCARI, M. A.; WELTER, K. C.; SARAN NETO, A.; OLIVEIRA, C. A. F.; SANTOS, M. V. Effect of dietary cation-anion difference on performance of lactating dairy cows and stability of milk proteins. **Journal of Dairy Science**, v.98, p.2650-2661, 2015.

MANZI, P.; PIZZOFERRATO, L. UHT thermal processing of milk. In: *Thermal Food Processing: New Technologies and Quality Issues* (ed. D – W. Sun), pp. 299-34. CRC Press, Boca Raton, FL. 2006.

MERTENS, D. R. 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.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7. rev. ed. Washington, DC.: Natl. Acad. Sci., 2001. 381p.

NEGRI, L.; CHAVES, M.; TAVERNA, M.; CUATRIN, A.; RUBIOLO, A. Determinación de las variables que afectan la estabilidad térmica de la leche utilizando un método capilar para evaluar el tiempo de coagulación por calor. **Revista Argentina de Lactología**, n.22, p.33-44, 2003.

OLIVEIRA, C.A.F.; LOPES, L.C.; FRANCO, R.C.; CORASSIN, C.H. Composição e características físico-químicas do leite instável não ácido recebido em laticínio do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.12, n.2, p.508-515, 2011.

RIBEIRO, M.E.R.; KROLOW, A.C.R.; BARBOSA, R.S.; DELLINGHAUSEN, C.; ZANELA, M. B.; FISCHER, V.; VON HAUSEN, L.J.O. Ensaio preliminares sobre o efeito do Leite Instável Não Ácido (LINA) na industrialização do iogurte batido. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 9., 2006, Goiânia. Anais... Goiânia: Gráfica e Editora Talento, 2006.

SAS. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **Statistical analysis user's guide**. Version 8.2. Cary: SAS, 2001. 1686 p.

STONE, H.; SIDEL, J.L. Affective Testing. In: STONE, H.; SIDEL, J.L. *Sensory Evaluation Practices*. 3ª ed. Orlando: Academic Press, 1985. p. 255-265.

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

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3583-3597, 1991.

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

3M/BR. Petrifilm™ AC - Placa para contagem de mesófilos aeróbios. Boletim

Instrução de Uso. Campinas: 3M do Brasil Ltda., 2006. 4 p.

3M/BR. Petrifilm™ EC - Placa para contagem de coliformes totais e E. coli. Boletim

Instrução de Uso. Campinas: 3M do Brasil Ltda., 2007. 4 p.

3M/BR. Petrifilm™ AC - Placa para contagem de Aeróbios Mesófilos. Guia de interpretação. Campinas: 3M do Brasil Ltda., 2009. 4 p.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, não houve efeito de processamento de amido (MM vs MF) e substituição parcial de MM por PC sobre a estabilidade do leite ao TEA. Adicionalmente, a utilização de dieta acidogênica reduziu o pH urinário de 8 para 5,8, indicando acidificação sanguínea, porém, mesmo assim também não foram observadas alterações na produção e na estabilidade do leite. Desta forma, os resultados dos 3 experimentos não indicaram associação entre acidificação ruminal e/ou sanguínea e a estabilidade do leite. Estes resultados contrariaram nossa hipótese de que o aumento da acidificação ruminal e/ou sanguíneo podem reduzir a estabilidade do leite por meio do aumento da concentração de Cai do leite.

A redução da relação PDR:PNDR aumentou a estabilidade do leite ao TEA, possivelmente por que aumentou o aporte de proteína metabolizável para síntese de leite, bem como aumentou o consumo de nutrientes quando as vacas foram alimentadas com MM. A substituição parcial de MM por PC tendeu a reduzir a estabilidade do leite ao aquecimento à 140° C, provavelmente por que reduziu o CMS. Desta forma, os resultados de nossos estudos indicaram que o consumo e a disponibilidade de nutrientes para glândula mamária pode ser o principal fator associado com a estabilidade da micela de caseína, mesmo que as dietas possam resultar em maior acidificação ruminal e/ou sanguínea. Porém, mais estudos precisam ser conduzidos para avaliar o efeito da intensidade da acidificação ruminal e sanguínea e interações com estágio de lactação e estresse térmico sobre a estabilidade do leite; pois estes fatores podem determinar o impacto da acidificação ruminal sobre o consumo e digestibilidade de nutrientes e respostas inflamatórias, que podem ser fatores associados com a instabilidade do leite.

O leite instável ao etanol 72% e não ácido pode ser pasteurizado, sem comprometimento na percepção sensorial pelos consumidores ou redução das características reológicas durante a vida de prateleira. Adicionalmente, para o processamento de pasteurização, os resultados indicam que o aumento da concentração de etanol >72% utilizada no TEA não melhora as características físico-químicas, organolépticas e reológicas do leite pasteurizado durante a vida de prateleira, resultando apenas em aumento da chance de o leite não ser captado para o processamento. Estudos ainda precisam ser conduzidos para avaliar a resistência térmica do leite instável não ácido por processamento de UAT, bem como características de rendimento de produção e vida de prateleira

dos derivados, especialmente ao utilizar sistemas de UAT com injeção direta de vapor, que demandam maior estabilidade da micela de caseína devido ao aumento de temperatura ser mais acentuado do que o sistema de troca de calor em placas.