

CRISTIAN MARLON DE MAGALHÃES RODRIGUES MARTINS

Composição e estabilidade do leite de vacas alimentadas com dieta aniônica

Pirassununga

2014

CRISTIAN MARLON DE MAGALHÃES RODRIGUES MARTINS

Composição e estabilidade do leite de vacas alimentadas com dieta aniônica

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 Mestre em Ciências.

Departamento:

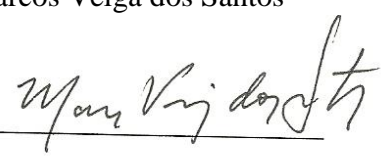
Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos

De acordo: 

Orientador

São Paulo
2014

Obs: A versão original se encontra 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 Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3044 FMVZ	Martins, Cristian Marlon de Magalhães Rodrigues Composição e estabilidade do leite de vacas alimentadas com dieta aniônica / Cristian Marlon de Magalhães Rodrigues Martins. -- 2014. 112 f. : il. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2014. Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal. Área de concentração: Nutrição e Produção Animal. Orientador: Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos. 1. Acidose metabólica. 2. BCAD. 3. Cálcio iônico. 4. LINA. 5. Teste do álcool. I. Título.
----------------	--



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Composição e estabilidade do leite de vacas alimentadas com dieta aniônica”, protocolado sob o nº 2794/2012, utilizando 16 (dezesesseis) bovinos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética no uso de animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/10/2012.

We certify that the Research “Milk composition and stability of cows fed anionic diet”, protocol number 2794/2012, utilizing 16 (sixteen) bovine, under the responsibility Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by “Ethic Committee in the use of animals” of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/17/2012.

São Paulo, 29 de abril de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MARTINS, Cristian Marlon de Magalhães Rodrigues

Título: Composição e estabilidade do leite de vacas alimentadas com dieta aniônica

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 Mestre em Ciências

Data: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, que descansa em paz com a companhia de Deus, mas que foi um grande exemplo de carisma, caráter, esforço e perseverança para todos nós, que me inspira e me dá força cada dia para seguir em frente para superar minhas dificuldades e atingir meus objetivos.

A minha mãe, pelo amor, companhia, compreensão e pelo apoio nesta importante etapa de minha vida.

A toda a minha família, avôs e avós, padrinhos e madrinhas, tios e tias e aos meus primos, sempre presentes em todos os momentos, que me dão força e fé.

A minha namorada, Katiéli Caroline Welter, pelo carinho, paciência e pela companhia. Não mediu esforços para ajudar em todos os momentos, e foi imprescindível para a realização deste trabalho.

A vocês, dedico este trabalho!

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, pela proteção e iluminação em nossos caminhos.

A Universidade de São Paulo, pela estrutura física, acolhimento e oportunidade de cursar este importante programa de pós-graduação.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa (processo FAPESP: 2012/22165-9) e do auxílio financeiro (processo FAPESP: 2012/23212-0) para a realização do presente estudo.

Ao Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, pelo excelente corpo docente, pela competente equipe de técnicos e demais colaboradores, e pela estrutura física de laboratório que proporcionaram adequadas condições para o desenvolvimento da presente pesquisa.

Ao Laboratório de Pesquisa em Qualidade do Leite (Qualileite), por todo ensinamento pessoal e profissional, pela excelente condição física e técnica para o desenvolvimento desta pesquisa, e pelo importante acolhimento que recebi durante este período da minha vida, tornando-se a minha segunda casa.

Ao Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, grande mestre e excelente orientador. Obrigado por todo o ensinamento nas mais diversas áreas do conhecimento que contribuíram para meu desenvolvimento pessoal e profissional. Obrigado pela amizade, paciência e consideração que tivesses comigo.

Aos grandes mestres que tive o privilégio em evoluir pessoalmente e profissionalmente, excelentes professores do Departamento de Nutrição e Produção Animal – FMVZ/USP, Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, Prof. Dr. Francisco Palma Rennó, Prof. Dr. Romualdo Shiguelo Fukushima, Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva, Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues, Prof. Dr. Augusto Hauber Gammeiro, Prof. Dr. Ricardo de Albuquerque, Prof. Dr. Alexandre Augusto de Oliveira Gobesso, Prof. Dra. Angélica Simone Cravo Pereira, Prof. Dr. Anibal de Sant’Anna Moretti, Prof. Dra. Cristiane Soares da Silva Araújo, Prof. Dr. Marcio Antônio Brunetto, Prof. Dra. Maria de Fátima Martins e Prof. Dr. Messias Alves da Trindade Neto.

A toda minha família e a minha namorada, Katiéli Caroline Welter, pelo companheirismo, compreensão, paciência, ensinamentos, amor, afeto, apoio e força para superar todas as minhas dificuldades.

Aos queridos colegas e amigos da família Qualileite: Marcos Veiga, Zeca, Lucinéia, Marcos Arcari, Juliano, Tiago, Aline, Juliana, Cristina, Renata, Bruna, Alessandra, Eduardo, Camila e Marina; pela amizade, companheirismo e ensinamentos durante o período que passamos juntos.

Aos colegas e amigos que não mediram esforços em auxiliar no experimento do presente estudo: Katiéli Caroline Welter, Marcos André Arcari, Maria Libera Tietz Cavalcanti, Verônica Lopes Schvartzaid, William Rodrigo Sattin, João Gustavo Rebelato Forti, Aline Geratto Dibbern e Juliana Regina Barreiro.

Aos professores Arlindo Saran Netto, Carlos Augusto Fernandes de Oliveir e Ives Cláudio da Silva Bueno, pela competente assessoria técnica e realização de análises laboratoriais referentes ao presente estudo.

As técnicas Roice Eliana Rosim e Priscila Sales Maldonado pelo excelente trabalho na realização de análises laboratoriais de quantificação de proteínas do leite e de ácidos graxos de cadeia curta do fluído ruminal, respectivamente.

Ao professor Marcelo da Costa Ferreira e ao Laboratório de Fitossanidade da Faculdade de Ciências Agrárias da UNESP-Jabotical, pela realização das análises de minerais das amostras coletadas no presente estudo.

Ao Sr. José Franchini Garcia Moreno e Sra. Lucinéia Mestieri, especialistas do laboratório Qualileite, pela amizade, ensinamentos e pela assistência técnica neste estudo.

Ao Sr. Ari de Castro, Sra. Simi Luiza, Sr. Gilson Luiz, Sra. Renata e Sra. Ana, funcionários do Laboratório de Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP pela assistência técnica na realização das análises bromatológicas do presente estudo.

Aos amigos e funcionários do Setor de Bovinocultura de Leite e da fábrica de ração da Prefeitura do Campus de Pirassununga, Srs. Antonio Carlos Baladore, Carlos Alberto Schimmitt, José Antonio da Silva, Luis Tadeu de Oliveira, Valmi Donizetti Botteon, João Paulo Pagotti, Vitor Eugenio Baptistela, José Antonio Coelho e André Valente de Sá, Claudio de Jesus Aparecido São Romão, Ioneo Alexandre da Cunha, Israel Andrietta, José Luiz Aparecido Landgraf, Sebastião Rossi e Maico Gabriel Alves de Godoy.

“Que um dia a cidade devolva para o campo, o que o campo durante décadas deu para a cidade.”
(DESOUZART, 2013).

“I have given years of study to the dairy cow and I believe I know a good deal about her, but more and more I am convinced that the darkest place in the world is the inside of a dairy cow.”
(LARSON, 2009)

RESUMO

MARTINS, C. M. M. R. **Composição e estabilidade do leite de vacas alimentadas com dieta aniônica**. [Milk stability and composition of cows fed anionic diet]. 2014. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

O presente estudo objetivou avaliar o efeito do balanço cátion-aniônico da dieta sobre: (a) concentração de subunidades de caseína, proteínas do soro, cálcio iônico e estabilidade do leite ao etanol e ao aquecimento a 140° C; (b) metabolismo digestivo, renal e sanguíneo de vacas leiteiras em lactação. Foram utilizadas 16 vacas da raça Holandês, com 158 ± 52 dias em lactação, distribuídas em 4 quadrados contemporâneos em um delineamento Quadrado Latino 4 x 4, com 4 períodos de 21 dias e 4 tratamentos. Os tratamentos experimentais consistiram de 4 níveis de balanço cátion-aniônico da dieta (BCAD): +290; +192; +98 e -71 mEq/kg de MS. No presente estudo, o consumo de matéria seca, a concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e o pH do fluido ruminal, e a digestibilidade aparente total da FDN aumentaram de acordo com o aumento do BCAD. De forma semelhante, a produção de leite corrigida para gordura, e os teores de gordura, lactose, e sólidos totais do leite aumentaram linearmente em 13,52, 8,78, 2,5 e 2,6%, respectivamente, quando o BCAD aumentou de -71 para 290 mEq/kg MS; enquanto que os teores de proteína bruta e de caseína reduziram linearmente em 4,83 e 4,49%, respectivamente. Adicionalmente, a concentração sanguínea de HCO₃⁻, o pH do sangue e a excreção urinária de Na e K aumentaram de acordo com o BCAD, o que reduziu as concentrações sanguíneas de cátions (Na, K e Ca iônico) e, conseqüentemente, a concentração de Ca iônico do leite. Como resultado da redução da concentração de Ca iônico, a estabilidade do leite ao etanol e ao aquecimento a 140° C aumentaram linearmente com o BCAD [$Y = 74,87$ (EP = 0,87) + 0,01174 (EP = 0,0025) × BCAD (mEq/kg MS) e $Y = 3,95$ (EP = 1,02) + 0,01234 (EP = 0,0032) × BCAD (mEq/kg MS), respectivamente]. Desta forma, pode-se concluir que o BCAD aumenta o desempenho produtivo de vacas leiteiras em lactação e, adicionalmente, eleva a capacidade relativa das proteínas do leite em resistir à coagulação ao teste do álcool e durante o aquecimento do leite a 140° C.

Palavras-chave: Acidose metabólica. BCAD. Cálcio iônico. LINA. Teste do álcool.

ABSTRACT

MARTINS, C. M. M. R. **Milk stability and composition of cows fed anionic diet.** [Composição e estabilidade do leite de vacas alimentadas com dieta aniônica]. 2014. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

The present study aimed to evaluate the effect of dietary cation-anion difference (DCAD) on: (a) concentrations of casein subunits, whey proteins, ionic calcium, and milk ethanol and heat stability at 140° C; (b) digestive, renal and blood metabolism of dairy cows. Sixteen Holstein cows, with 158 ± 52 days in milk, were distributed in 4 contemporary 4 x 4 Latin Square design, with four periods of 21 days and 4 treatments. The experimental treatments consisted in 4 levels of dietary cation-anion difference (DCAD): +290; +192; +98 e -71 mEq/kg DM. In the present study, dry matter intake, the concentration of short chain fat acids (SCFA) and ruminal pH, and the NDF total apparent digestibility increased according to DCAD increases. Similarly, fat-corrected milk and fat, lactose and total milk solids content were linearly increased by 13.52, 8.78, 2.5 and 2.6%, respectively, according to DCAD increases from -71 to 290 mEq/kg DM; while crude protein and casein content were linearly reduced by 4.83 and 4.49%, respectively. In addition, blood concentration of HCO_3^- , pH of blood, and urinary excretion of Na and K increased according to DCAD, which reduced the blood concentrations of cations (Na, K and ionic Ca) and, consequently, the milk concentrations of ionic Ca. As a result of reduction of ionic Ca concentration, the milk ethanol and heat stability at 140° C linearly increased with DCAD [$Y = 74.87$ (SE = 0.87) + 0.01174 (SE = 0.0025) \times DCAD (mEq/kg DM) and $Y = 3.95$ (SE = 1.02) + 0.01234 (SE = 0.0032) \times DCAD (mEq/Kg DM), respectively]. Thus, it may be concluded that DCAD increases the productive performance of lactating dairy cows and, additionally, increases the relative capacity of milk proteins to resist the coagulation at alcohol test and during heat treatment at 140° C.

Key-words: Metabolic acidosis. DCAD. Ionic calcium. UNAM. Alcohol test.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Miliequivalência dos principais cátions e ânions que afetam o equilíbrio iônico sanguíneo de vacas leiteiras em lactação.....	38
Tabela 2 -	Sais aniônicos utilizados no período pré-parto para reduzir o balanço cátion-aniônico da dieta.	44
Tabela 3-	Proporção de ingredientes e composição química das dietas de vacas leiteiras de acordo com o balanço cátion-aniônico da dieta.....	50
Tabela 4 -	Efeito do balanço cátion-aniônico da dieta de vacas leiteiras sobre o consumo de matéria seca e de nutrientes.	55
Tabela 5 -	Efeito do balanço cátion-aniônico da dieta de vacas leiteiras sobre a produção de leite e a eficiência produtiva.	56
Tabela 6 -	Efeito do balanço cátion-aniônico da dieta de vacas leiteiras sobre a composição físico-química do leite.....	57
Tabela 7 -	Efeito do balanço cátion-aniônico da dieta de vacas leiteiras sobre as subunidades de caseína e as proteínas do soro.....	58
Tabela 8 -	Efeito do balanço cátion-aniônico da dieta de vacas leiteiras sobre a composição e secreção de minerais no leite.....	59
Tabela 9 -	Efeito do balanço cátion-aniônico da dieta de vacas leiteiras sobre a composição e secreção de minerais no leite.....	60
Tabela 10 -	Efeito do balanço cátion-aniônico da dieta sobre a fermentação ruminal em vacas leiteiras.	83
Tabela 11 -	Efeito do balanço cátion-aniônico da dieta sobre o coeficiente de digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes.....	84
Tabela 12 -	Efeito do balanço cátion-aniônico da dieta sobre os parâmetros sanguíneos e o pH do sangue de vacas leiteiras.	85
Tabela 13 -	Efeito do balanço cátion-aniônico da dieta sobre a concentração de cátions monovalentes e o pH urinário de vacas leiteiras.....	86
Tabela 14 -	Efeito do balanço cátion-aniônico da dieta sobre o balanço de cátions monovalentes em vacas leiteiras.	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Figura esquemática da micela de caseína do leite.	26
Figura 2 -	Desenho esquemático da formação de fibrilas amiloides entre duas micelas de caseínas.....	27
Figura 3 -	Reação da β -lactoglobulina com a κ -caseína na micela durante o tratamento térmico do leite.	32
Figura 4 -	Efeito da inclusão de sais aniônicos na dieta sobre a absorção de minerais e trocas iônicas no intestino.	42
Figura 5 -	Efeito do balanço cátion-aniônico da dieta (BCAD, mEq/kg de MS) sobre a composição e a estabilidade do leite.	61
Figura 6 -	Efeito do pH sanguíneo e urinário sobre as concentrações de minerais do sangue.	87
Figura 7 -	Efeito do pH sanguíneo e urinário sobre a concentração de minerais do leite.	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -CN	Alpha caseína
β -CN	Beta caseína
κ -CN	Kappa caseína
α -LA	Alpha lactalbumina
β -LG	Beta lactoglobulina
AGCC	Ácido graxo de cadeia curta
BCAD	Balanço cátion-aniônico da dieta
BE	Bases em excesso
C2	Ácido acético
C3	Ácido propiônico
Ca	Cálcio
Cai	Cálcio iônico
CMS	Consumo de matéria seca
CNF	Carboidrato não fibroso
Cl	Cloro
CO ₂	Dióxido de carbono
EE	Extrato etéreo
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN	Fibra em detergente neutro
Hct	Hematócrito
Hb	Hemoglobina
K	Potássio
LINA	Leite instável não ácido
MM	Matéria mineral
MO	Matéria orgânica
MS	Matéria seca
Na	Sódio
NDT	Nutrientes digestíveis totais
PBIDA	Proteína bruta insolúvel em detergente ácido
PBIDN	Proteína bruta insolúvel em detergente neutro

N-NH ₃	Nitrogênio amoniacal
NUL	Nitrogênio ureico do leite
O ₂	Oxigênio
P	Fósforo
PB	Proteína bruta
pCO ₂	Pressão de CO ₂
PDR	Proteína degradável no rúmen
pH	Potencial de hidrogênio
PLC	Produção de leite corrigida
PNDR	Proteína não degradável no rúmen
pO ₂	Pressão de O ₂
PV	Peso vivo
S	Enxofre
SILA	Síndrome do leite anormal
TA	Teste do álcool
TC	Tempo de coagulação
tCO ₂	Concentração total de CO ₂ no sangue
UAT	Ultra alta temperatura

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO LEITE	19
2.2	GORDURA DO LEITE	19
2.3	LACTOSE, MINERAIS E VITAMINAS DO LEITE	21
2.4	PROTEÍNAS DO LEITE	23
2.5	ESTABILIDADE DO LEITE AO ETANOL E AO AQUECIMENTO TÉRMICO	29
2.5.1	Qualidade do leite e ocorrência de leite instável	30
2.5.2	Efeitos do tempo de lactação e da mastite sobre a estabilidade do leite	34
2.5.3	Efeitos sazonais, genéticos e nutricionais das vacas leiteiras que podem alterar a estabilidade do leite	35
2.6	BALANÇO CÁTION-ANIÔNICO DA DIETA	38
2.6.1	Efeitos do balanço cátion-aniônico da dieta sobre o consumo de matéria seca, produção e composição do leite.	39
2.6.2	Dieta aniônica e acidose metabólica	41
3	CAPITULO I - EFEITO DO BALANÇO CÁTION-ANIÔNICO DA DIETA SOBRE A ESTABILIDADE DAS PROTEÍNAS DO LEITE	45
	RESUMO	45
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.2.1	Coleta e análises de alimentos e consumo de matéria seca	51
3.2.2	Coleta e análises de amostras de leite	51
3.2.3	Análises estatísticas	54
3.3	RESULTADOS	54
3.4	DISCUSSÃO	61
3.4.1	Consumo de matéria seca e de nutrientes	62
3.4.2	Composição e estabilidade do leite	63
3.5	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	70
4	CAPITULO II - EFEITO DO BALANÇO CÁTION-ANIÔNICO DA DIETA SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL, DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL E METABOLISMO SANGUÍNEO E RENAL DE VACAS LEITEIRAS	74
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	77
4.2.1	Coleta de amostras e análises bromatológicas	78
4.2.2	Coleta e análises de amostras de líquido ruminal, sangue, urina e leite.	78
4.2.3	Análises estatísticas	80
4.3	RESULTADOS	81
4.4	DISCUSSÃO	91
4.4.1	Fermentação ruminal e digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes... ..	91
4.4.2	Parâmetros sanguíneos	94
4.4.3	Excreção renal e balanço de cátions monovalentes	98

4.5	CONCLUSÃO	99
	REFERÊNCIAS	101
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	104
	REFERÊNCIAS	106

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, durante a última década, a produção de leite e as exigências por qualidade em busca da maior segurança alimentar dos derivados lácteos foram elevadas significativamente. Esta crescente demanda por qualidade e segurança dos produtos de origem animal durante a produção impôs maior exigência sobre os produtores rurais com relação à produção de leite de alta qualidade. Desta forma, desde o início da vigência da Instrução Normativa 51 do Ministério da Agricultura (MAPA) (BRASIL, 2002), em 2005, que posteriormente foi revista e alterada pela Instrução Normativa MAPA N° 62 (IN 62/2011), os produtores de leite buscam medidas para atender os padrões mínimos de qualidade do leite cru, pois, de acordo com a IN 62, até o ano de 2017, o leite comercializado em todo o Brasil deve apresentar limites de CCS \leq 400 mil Células/mL e de CBT \leq 100 mil UFC/mL (BRASIL, 2011).

No atual cenário de produção de leite do Brasil, no qual o leite processado por Ultra Alta Temperatura (UAT) representa a grande maioria do leite líquido comercializado e o leite em pó o derivado lácteo com maior participação nas exportações (BRASIL, 2014), fatores de qualidade como o baixo teor de sólidos e a instabilidade do leite aos intensos tratamentos térmicos industriais também são limitantes para eficiência da cadeia agroindustrial do leite. O termo estabilidade refere-se à capacidade relativa das proteínas do leite em resistir à coagulação durante o processamento industrial (estabilidade térmica do leite) e/ou durante a realização do teste do álcool/alizarol (estabilidade do leite ao etanol) (ZANELA et al., 2006; SANTOS; FONSECA, 2007; FISHER et al., 2012). A baixa estabilidade do leite pode gerar prejuízos econômicos aos produtores, devido à penalização no preço ou ao descarte de leite, às indústrias, pois o leite de baixa estabilidade pode coagular durante o processamento industrial, e aos consumidores, uma vez que o leite de baixa estabilidade após ser processado pode ter maior facilidade de formar coágulos durante a estocagem (FISHER et al., 2012).

O teste do álcool ainda é realizado rotineiramente nas fazendas leiteiras antes da coleta do leite pelo transportador e novamente na plataforma de recebimento do leite na indústria, com o objetivo de estimar a estabilidade térmica do leite. O teste do álcool ou alizarol consiste na mistura das mesmas proporções de leite e etanol, cujo resultado é baseado na visualização ou não de coágulos (SANTOS; FONSECA, 2007; FISHER et al., 2012). No Brasil, o uso do teste do álcool como um método de avaliação da qualidade do leite cru é regulamentado pela

Instrução Normativa Nº 62 (IN 62) (BRASIL, 2011), cujo resultado deve ser negativo (sem formação de coágulos) quando realizado em concentração alcoólica mínima de 72% GL, para que o leite possa ser carregado e destinado para o processamento industrial (BRASIL, 2011).

Problemas com a baixa estabilidade do leite ao etanol ocorreram em alguns estados do Brasil e em demais países que utilizam o teste do álcool como um método de avaliação da qualidade do leite cru, resultando em prejuízos em todos os elos da cadeia agroindustrial láctea devido ao grande volume de descarte de leite gerado no setor primário e industrial (CHAVEZ et al., 2004; MARQUES et al., 2007; FISHER et al., 2012). A grande maioria das amostras de leite identificadas como instáveis ao etanol apresentaram valores normais de pH e acidez titulável (MARQUES et al., 2007; ZANELA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2013). Desta forma, erroneamente as amostras de leite que coagulam no teste do álcool são interpretadas como ácidas, o que dificulta a implementação de medidas de correção da baixa estabilidade do leite nas fazendas e na indústria, uma vez que a única limitação de utilização do leite instável sem acidez resultante de ação microbiana seria quanto à resistência das proteínas em coagular durante os processamentos térmicos empregados (FISHER et al., 2012).

No Brasil, o leite que coagula no teste do álcool sem apresentar acidez resultante de ação microbiana foi denominado como “Leite Instável Não Ácido (LINA) (ZANELA et al., 2006; MARQUES et al., 2007; ZANELA et al., 2009). A baixa estabilidade do leite sem acidez adquirida de ação microbiana foi associada à alterações na micela de caseína, ao aumento da concentração láctea de cátions bivalentes, e à alterações no equilíbrio salino do leite (MARQUES et al., 2011; BARBOSA et al., 2012; FISHER et al., 2012). Desta forma, as causas da ocorrência de LINA são multivariadas, e são poucos os estudos que avaliaram o efeito isolado de cada fator que pode alterar a estabilidade do leite (MARQUES et al., 2011; BARBOSA et al., 2012; STUMPF et al., 2013). Os principais resultados sugerem que a deficiência de nutrientes (ZANELA et al., 2006; BARBOSA et al., 2012) e distúrbios digestivos e metabólicos (PONCE; HERNANDES, 2005; MARQUES et al., 2011; FAGNANI; BELOTI; BATTAGLINI, 2014), por meio do aumento da concentração láctea de cátions bivalentes, são os principais fatores que alteram a estabilidade do leite.

Distúrbios metabólicos são bastante comuns em vacas leiteiras e a redução do pH dos fluídos biológicos pode ocorrer como resultado da acidose ruminal, da alta taxa metabólica e de alterações no balanço cátion-aniônico da dieta (BCAD) (PONCE; HERNANDES, 2005; MARQUES et al., 2011; FAGNANI; BELOTI; BATTAGLINI, 2014). Desta forma, a

hipótese do presente estudo foi que o aumento do BCAD reduz a concentração de cátions do sangue, e, conseqüentemente, do leite, o que reduz as cargas positivas das micelas de caseína e aumenta a força de repulsão eletrostática entre elas, elevando a capacidade de resistência destas proteínas em suportar a reação com o etanol e ao aquecimento a 140° C sem sofrer coagulação. Para testar esta hipótese, o presente estudo objetivou avaliar o efeito do BCAD sobre: (a) concentração de subunidades de caseína, proteínas do soro, cálcio iônico e estabilidade do leite ao etanol e ao aquecimento a 140° C; (b) metabolismo digestivo, renal e sanguíneo de vacas leiteiras em lactação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO LEITE

A lactação em mamíferos tem como objetivo principal transferir nutrientes e imunidade para o neonato, além das funções biológicas básicas como o fornecimento de calor, proteção física e socialização durante o processo de amamentação. Desta forma, na composição do leite encontram-se presentes todos os nutrientes exigidos para a manutenção e crescimento do neonato, o que o caracteriza como alimento completo e de alto valor biológico. O leite pode ser considerado uma combinação de vários componentes diluídos em água, tais como: emulsão de glóbulos e gordura e vitaminas lipossolúveis; suspensão coloidal de micelas de caseína ligadas principalmente pelo fosfato de cálcio; e solução de lactose, proteínas do soro, minerais e vitaminas (SANTOS; FONSECA, 2007).

Dentre os constituintes do leite, a proteína e a gordura são os mais importantes para a produção de derivados lácteos. O leite integral, de acordo com a IN 62 (BRASIL, 2011), deve conter no mínimo 2,9% de proteína e 3,0% de gordura. O leite é facilmente convertido em vários derivados, e além da gordura, a proteína é um fator essencial no rendimento durante o processo de fabricação de derivados lácteos. (SANTOS; FONSECA, 2007). No entanto, a lactose não apresenta papel tão importante, como a proteína, no processo industrial de fabricação de queijos. Porém, a lactose é importante para compor os sólidos totais do leite durante a fabricação de leite em pó, de modo que uma diminuição de 0,5% no teor de sólidos totais no leite pode resultar em perdas de até 5 toneladas de leite em pó para cada milhão de litros de leite processados (SANTOS; FONSECA, 2007).

2.2 GORDURA DO LEITE

Na indústria de laticínios, o teor de gordura do leite é considerado importante por estar relacionado com a maciez e sabor do queijo, textura dos cremes de leite e da manteiga, além de contribuir para o rendimento na produção de derivados, como queijos, cremes fluídos e leite em pó (SANTOS; FONSECA, 2007). Primordialmente, a principal função da gordura do

leite é fornecer energia, vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos essenciais para o neonato. Os ácidos graxos componentes da gordura do leite estão na forma esterificada, compondo os triacilgliceróis (triglicerídeos). Os triglicerídeos da gordura do leite são sintetizados primariamente no retículo endoplasmático, e, posteriormente, são transportados até a membrana apical dentro das vesículas para ser secretada no lúmen do alvéolo em forma de glóbulos de gordura (SUTTON, 1989). Em condições metabólicas normais, em vacas leiteiras, aproximadamente metade dos ácidos graxos do leite são sintetizados a partir do acetato e beta-hidroxibutirato (BHB); 40-45% são provindos da dieta e menos que 10% são de origem do tecido adiposo (PALMQUIST; JENKINS, 1980; VAN SOEST, 1994).

A contribuição do BHB para a síntese dos ácidos graxos de cadeia longa é muito limitada. No entanto, a glândula mamária utiliza o BHB em adição ao acetato para suprir os carbonos para os ácidos de cadeia curta e média na gordura do leite. A síntese de ácidos graxos da glândula mamária utiliza a butiril-CoA como doador em contraste com os tecidos adiposos os quais usam a acetil-CoA para este propósito (VAN SOEST, 1994). Portanto, os ácidos graxos de cadeia curta são sintetizados na glândula mamária pela síntese “*de novo*” de ácidos graxos. A acetil-CoA-carboxilase é a enzima limitante da velocidade para a via de síntese dos ácidos graxos. Essa enzima catalisa a ação de malonil-CoA a partir do acetil-CoA. Portanto, a acetil-CoA-carboxilase é a chave da atividade enzimática de síntese de ácidos graxos de cadeia curta. Já os ácidos graxos de cadeia média podem ser sintetizados pela síntese “*de novo*” na glândula mamária ou provirem da corrente sanguínea. Diferentemente, todos os ácidos graxos de cadeia longa (18 carbonos para cima) encontrados no leite são originários da gordura absorvida da dieta ou da mobilização do tecido adiposo (PALMQUIST et al., 1993; VAN SOEST, 1994).

Após o processo de digestão e absorção intestinal, os ácidos graxos de origem dietética são re-esterificados em triacilglicerol nos enterócitos, e organizados dentro das lipoproteínas de densidade muito baixa ou dos quilomicrons para serem transportados pelo plasma. Posteriormente, são hidrolisados pela lipase lipoprotéica nos capilares endoteliais, e uma quantidade significativa dos ácidos graxos liberados migram para a glândula mamária contribuindo para a síntese de gordura no leite. Além dos ácidos graxos de origem dietética e do BHB, os ácidos graxos não esterificados (AGNE), resultantes da mobilização das reservas corporais, também são incorporados na gordura do leite. Porém, essa fração é tipicamente baixa, provavelmente devido à incompleta produção dos ácidos graxos resultante da hidrólise dos triglicerídeos lipoprotéicos pela lipase lipoprotéica durante a lipólise. No entanto, a

concentração de AGNE no sangue, e a sua contribuição para a formação da gordura do leite na glândula mamária, pode ser aumentada em um quadro de balanço energético negativo, comum em vacas leiteiras nas primeiras semanas pós-parto, devido à alta mobilização de reservas corporais para suprir as deficiências energéticas destas vacas (PALMQUIST et al., 1993).

Concentrações aumentadas de lipídios no sangue são associadas com aumento da gordura do leite (VAN SOEST, 1994), sendo esta, composta por 95 a 98% de triglicerídeos (PALMQUIST et al., 1993). Desta forma, o teor de gordura do leite pode ser alterado por fatores genéticos e nutricionais das vacas lactantes. Entre os fatores nutricionais, a principal causa associada à redução do teor de gordura do leite é a suplementação com ácidos graxos insaturados, devido à biohidrogenação incompleta destes ácidos graxos e a formação de isômeros específicos, em especial o ácido linoléico conjugado (CLA) Trans-10, Cis-12, que estão associados com a redução da atividade de enzimas lipogênicas (principalmente acetil-CoA-carboxilase) na glândula mamária. Apesar de reduzir o teor de gordura do leite, a suplementação dietética com lipídios poliinsaturados pode alterar a composição da gordura do leite, com o aumento da concentração de ácidos graxos poliinsaturados em detrimento aos saturados (BAUMAN et al., 2011).

2.3 LACTOSE, MINERAIS E VITAMINAS DO LEITE

A lactose é o principal carboidrato do leite e um dos principais determinantes do volume de leite produzido pela glândula mamária. Cada micrograma de lactose arrasta aproximadamente dez vezes o seu peso em água. A lactose é um dissacarídeo composto por glicose e galactose. O complexo enzimático lactose sintase é o responsável pela síntese da lactose, em etapas que ocorrem no citoplasma e no aparelho de Golgi das células dos alvéolos mamários. A enzima lactose sintase é composta de duas subunidades: alfa-lactoalbumina e galactosiltransferase. No entanto, quando a dieta está balanceada para atender as exigências nutricionais das vacas leiteiras em lactação, a concentração de lactose sofre menos alterações com as mudanças ambientais das vacas leiteiras, em comparação com o teor de proteína e de gordura do leite, e, além disso, tem baixo valor comercial, o que desperta menos interesse, por parte da indústria, neste componente (SANTOS; FONSECA, 2007).

No leite, podem ser encontradas cerca de doze vitaminas hidrossolúveis e quatro lipossolúveis (A, D, E e K). A maioria das vitaminas hidrossolúveis encontradas no leite são do complexo B, e podem ser sintetizadas pelos microrganismos do rúmen. As concentrações lácteas destas vitaminas são diretamente associados aos níveis séricos, e, desta forma, o leite pode ser considerado fonte nutricional de vitamina B1 (tiamina) e B2 (riboflavina). Já as vitaminas lipossolúveis secretadas no leite são diretamente associadas à gordura láctea (SANTOS; FONSECA, 2007).

Os principais elementos minerais encontrados no leite são: cálcio, fósforo, magnésio, sódio, potássio e cloretos. Normalmente, o potássio é o mineral mais abundante no leite, seguido pelo cálcio. O cálcio (Ca) e o fósforo (P) podem estar ligados às micelas de caseínas ou “livres” na fase solúvel do leite. Já o sódio, o potássio e os cloretos, juntamente com a lactose, assumem papel importante na regulação da produção do leite, por meio da pressão osmótica exercida por estes constituintes. Os elementos minerais do leite são originários do sangue, porém, a concentração mineral do leite pode chegar a dez vezes mais do que a do sangue (SANTOS; FONSECA, 2007).

Os minerais estão presentes no leite na forma coloidal (como os fosfatos de cálcio ligados a micelas de caseínas) ou na fase solúvel. No entanto, na fase solúvel os minerais não estão totalmente “livres”, e diferentes associações iônicas podem ocorrer. Estas associações são dependentes da força eletrostática (catiônica ou aniônica) exercida pelo mineral, e, também, pela solubilidade dos sais iônicos. Globalmente, o cálcio pode ser encontrado no leite na fase iônica (livre), estabilizado com o citrato (como citrato trivalente), complexado com os fosfatos (mistura de H_2PO_4 e HPO_4) e associado aos cloretos. Outros cátions monovalentes (sódio e potássio) estão presentes no leite somente na forma livre, porém, uma pequena parte está associada com o citrato, fosfato inorgânico e com os cloretos (GAUCHERON, 2005). Na micela de caseína, o cálcio não está totalmente associado ao fosfato inorgânico coloidal, pois uma parte do cálcio micelar está diretamente associado à caseína por meio dos resíduos fosfoserinas (fósforo orgânico). Portanto, o cálcio coloidal do leite pode ser definido como uma mistura de caseinato de cálcio (contendo fosfato orgânico) e fosfato de cálcio (composto por fosforo inorgânico) (GAUCHERON, 2005).

A composição mineral do leite é relativamente constante, mas pode sofrer algumas variações em alguns casos. As concentrações de cálcio e dos fosfatos podem ser aumentadas em leites ricos em proteínas. Este fato pode ser observado ao comparar o leite produzido por

vacas da raça Normando e da raça Holandês. Vacas Normando normalmente produzem leite com maior concentração de minerais do que vacas holandesas (GAUCHERON, 2005).

A composição mineral do leite também pode variar com a fase de lactação, cuja alteração mais significativa ocorre durante o período de transição. Desta forma, a concentração de cálcio no colostro é maior do que a do leite produzido em estágio intermediário de lactação, e similar à observada no final da lactação (GAUCHERON, 2005). A mastite também pode alterar a composição mineral do leite. Neste caso, as concentrações de sódio e de cloretos são aumentadas no leite mastítico. No entanto, a intensidade destas alterações depende da gravidade do quadro de mastite (GAUCHERON, 2005; SANTOS; FONSECA, 2007).

2.4 PROTEÍNAS DO LEITE

A função básica das proteínas do leite é fornecer aminoácidos essenciais ao neonato e proteínas bioativas (anticorpos). A síntese de proteína nas células secretoras do alvéolo mamário ocorre no retículo endoplasmático rugoso a partir de aminoácidos do sangue. Após a síntese, as proteínas são transportadas para o aparelho de Golgi e posteriormente secretadas na forma de vesículas para o lúmen alveolar. Algumas proteínas presentes no leite são oriundas do sangue, que são transportadas e secretadas no lúmen alveolar. De forma semelhante, as imunoglobulinas são transportadas para dentro do leite via sangue e vasos linfáticos. 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 caseína são as proteínas que precipitam em $\text{pH} = 4,6$; enquanto que as proteínas do soro não sofrem esta precipitação. Além destes grupos, o leite apresenta uma fração de compostos nitrogenados não-protéicos (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, pois no leite humano e no de roedores esta proteína não é encontrada. 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 termolábil e apresenta certa capacidade de sequestrar o cálcio em um dado pH; e 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 (subunidade de caseína hidrofílica que protege o interior hidrofóbico da micela do contato com a água, íons de cálcio e com o álcool, apresentando papel importante para a estabilidade do leite durante o aquecimento e/ou no teste do álcool) (MARQUES et al., 2011; FISHER 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.

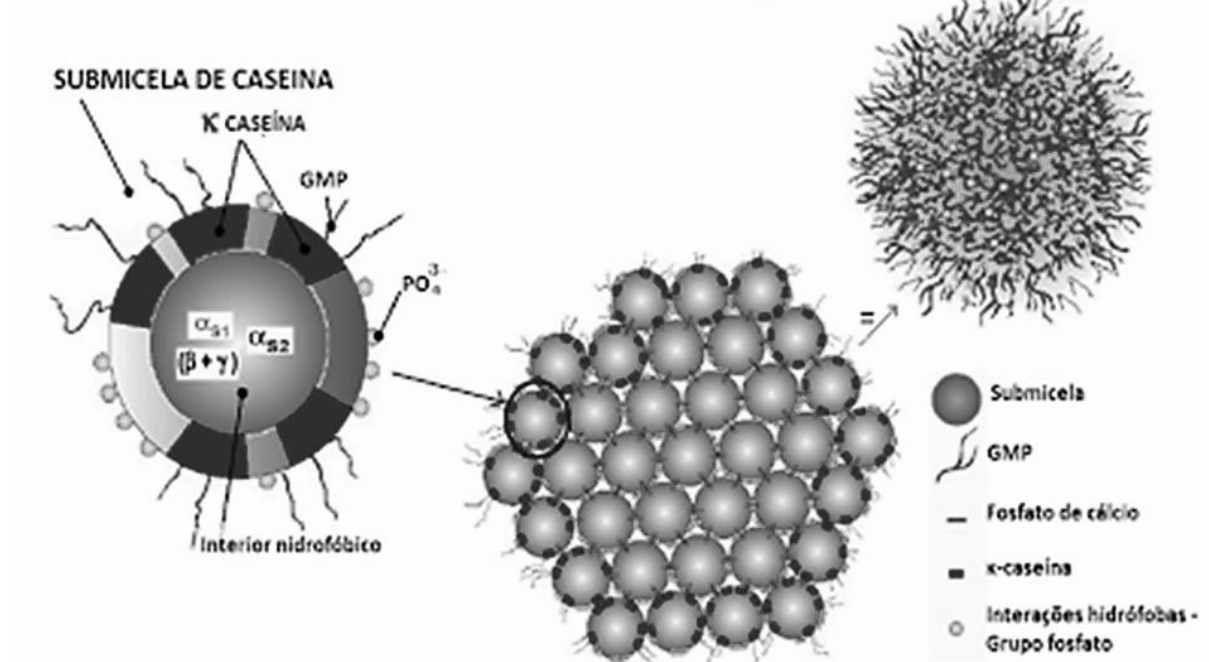
A caseína é a principal proteína encontrada no leite, pois forma 80% das proteínas lácteas (CHEFTEL et al., 1989). O leite de vaca contém diferentes tipos de subunidades de caseína: α (α_{s1} e α_{s2}), β e κ -caseína (FONSECA; SANTOS, 2000). As subunidades α_{s1} , α_{s2} , β , e κ são encontradas no leite nas proporções 4:1:4:1, 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).

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. As submicelas são

interligadas por íons até formar por completo a micela de caseína propriamente dita. 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 162 aminoácidos (RIJNKELS, 2002). As duas principais variantes genéticas de κ -caseína, A e B, diferem na posição dos amino ácidos 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 1) (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 1- Figura esquemática da micela de caseína do leite



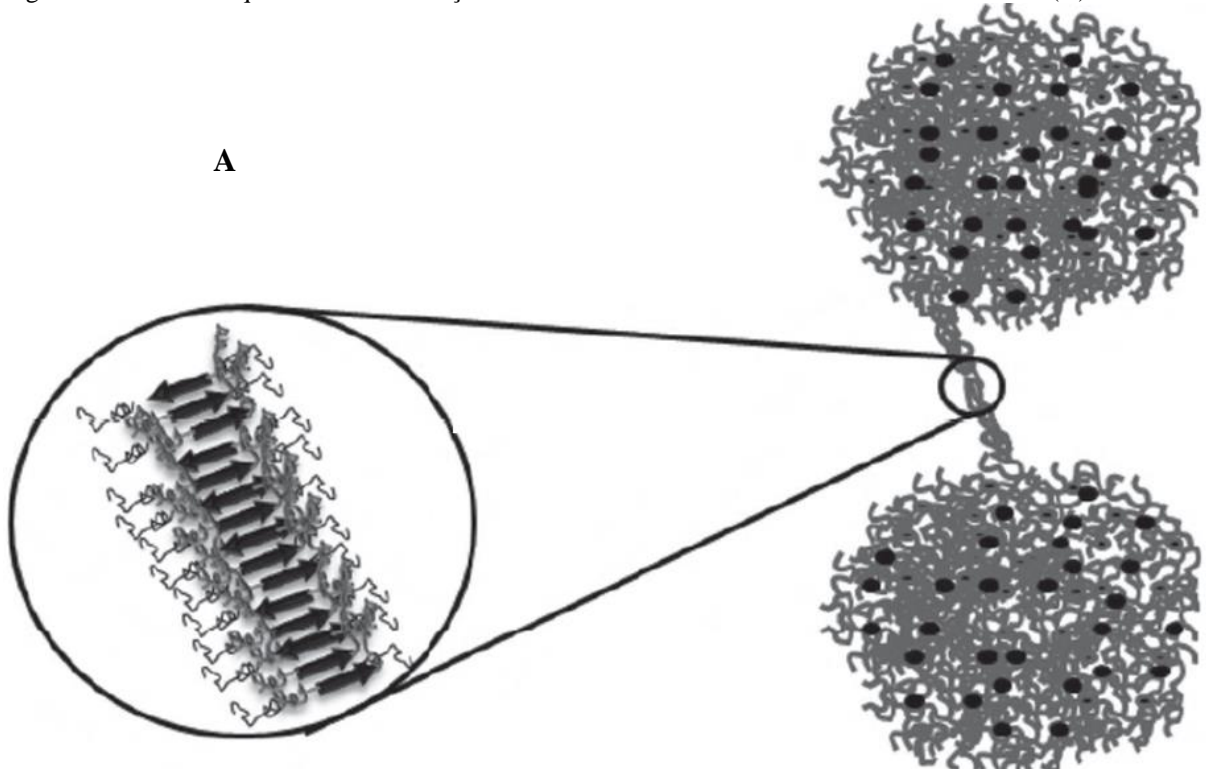
Fonte: adaptado de Di Martins, A. (2009)

Desta forma, a organização das caseínas do leite em micelas é resultado de um processo evolutivo que ocorreu de acordo com algumas necessidades biológicas das fêmeas mamíferas e/ou dos seus neonatos (HOLT et al., 2013). Primariamente, a formação de micelas de caseínas por subunidades proteicas e por fosfato de cálcio evita que ocorra grande concentração de cálcio livre na glândula mamária. Altas concentrações de cálcio livre no interior do úbere poderiam resultar em ocorrência de precipitados de cálcio, e formação de calcificação do tecido secretor da glândula mamária, o que poderia prejudicar a saúde da glândula mamária e a produção de leite (HOLT et al., 2013). Tendo em vista o uso do leite para o consumo humano, o arranjo micelar das subunidades de caseína confere a micela resistência aos tratamentos térmicos industriais e estabilidade aos derivados lácteos durante a armazenagem nas prateleiras do comércio varejista, uma vez que precipitados poderiam ocorrer se houvesse alterações principalmente na concentração de κ -caseína e de cálcio iônico do leite (FISHER et al., 2012).

Além da importância das proteínas para o tratamento térmico, a α_{s2} e κ -caseína, e as proteínas do soro α -lactalbumina e β -lactoglobulina, são proteínas lácteas que são potenciais formadoras de fibrilas (Figura 2). Fibrilas são complexos protéicos insolúveis, e na saúde humana a produção de depósitos de proteínas insolúveis dentro do organismo está associada a doenças conformacionais (Alzheimer, Parkinson, diabete tipo II e catarata). Os mecanismos

moleculares pelos quais α_{S2} e κ - caseína formam fibrilas ainda não foram elucidados em detalhes, mas há associações com a presença de pontes de dissulfeto, pois a α_{S2} -caseína apresenta dímeros formados por 2 interligações de pontes dissulfeto (HOLT et al., 2013). Por outro lado, a κ -caseína apresenta várias pontes de dissulfeto, as quais determinam o estado oligomérico da proteína precursora, o que é um fator determinante para a formação de fibrila. Contrariamente, α_{S1} e β - caseínas podem prevenir a formação de estruturas fibriladas, pois são proteínas com atividade chaperona. Proteínas chaperona auxiliam o enovelamento proteico, associando-se a proteínas com potencial formação de fibrilas, o que evita a formação de complexos insolúveis citotóxicos. A α_{S1} -caseína é mais eficiente do que a β -caseína para prevenir a formação de fibrilas pela α_{S2} -caseína (HOLT et al., 2013). A capacidade de proteção individual das caseínas α_{S1} e β -caseína é dada pela estrutura desdobrada e flexível dessas proteínas (HOLT et al., 2013). No entanto, devido à organização micelar de proteínas α_{S1} , α_{S2} , β e κ - caseína, não há evidências de que o leite contém fibrilas amiloides citotóxicas (HOLT et al., 2013).

Figura 2 - Desenho esquemático da formação de fibrilas amiloides entre duas micelas de caseínas (A)



Fonte: Adaptado de Holt et al. (2013).

Desta forma, as caseínas do leite exercem funções complementares entre si que garantem um produto de alta qualidade nutricional, adequado para o processamento industrial, e sem riscos para a saúde humana: α_{S1} e β -caseína protegem a κ e α_{S2} -caseína do processo de formação de fibrilas; e κ -caseína (hidrofílica) protege as demais caseínas (hidrofóbicas) da ionização com o cálcio e do contato com a água, conferindo estabilidade para o processamento industrial e qualidade adequado do produto para o consumo humano. 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, 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).

Desta forma, o alinhamento de 49 caseínas cálcio-sensitivas forma uma arquitetura global de caseínas, o que proporciona maior digestão das proteínas, sem riscos para o consumo humano e para a saúde da fêmea mamífera. Adicionalmente, a sequência de exons e de aminoácidos para formação das caseínas do leite são bastante conservadas, o que evita a formação de proteínas defeituosas (HOLT et al., 2013). Segundo estes mesmos autores, o número de exons codificador das caseínas varia amplamente de acordo com a função codificadora:

- 1 exon codifica o peptídeo sinalizador;
- 1 exon pequeno codifica a sequência do C-terminal;
- 3 tipos de pequenos exons internos codificam os centros de fosfato e as sequências hidrofílicas de acompanhamento.

2.5 ESTABILIDADE DO LEITE AO ETANOL E AO AQUECIMENTO TÉRMICO

A crescente demanda por qualidade e segurança dos produtos de origem animal durante a produção impôs maior exigência sobre os produtores com relação à produção de leite de alta qualidade. Desta forma, em 2005, entrou em vigor a Instrução Normativa 51 do Ministério da Agricultura (MAPA) (BRASIL, 2002), cujo objetivo foi determinar padrões mínimos de qualidade do leite cru no Brasil. Esta normativa estabeleceu padrões mínimos de qualidade do leite para o recebimento na indústria, com base na composição química ($\geq 3,0\%$ de gordura, $\geq 2,9\%$ de proteína e $\geq 8,4\%$ de extrato seco desengordurado) e critérios de higiene, saúde da vaca e de segurança alimentar (contagem de células somáticas - CCS, contagem bacteriana total - CBT, resíduos contaminantes e adulterantes do leite). Os critérios higiênicos e sanitários do leite (CCS e CBT) foram revistos e alterados pela Instrução Normativa MAPA Nº 62 (IN 62/2011), com o objetivo de até o ano de 2017, o leite comercializado em todo o território nacional apresentar limites de CCS ≤ 400 mil Células/mL e de CBT ≤ 100 mil UFC/mL (BRASIL, 2011).

Outro importante critério de qualidade do leite é a estabilidade das proteínas. O termo “estabilidade” refere-se à resistência relativa das proteínas (caseínas) em suportar o tratamento térmico industrial (estabilidade térmica) sem sofrer coagulação, ou então, não formar coágulos durante a reação com o etanol (estabilidade do leite ao etanol - teste do álcool) utilizado antes da coleta do leite nas fazendas (BRASIL, 2011). O teste do álcool é utilizado para estimar a estabilidade térmica do leite durante o processamento industrial. Este teste é previsto pela IN 62/2011 e é realizado antes da coleta de leite nas fazendas e na plataforma de recebimento do leite na indústria, cujo resultado deve ser negativo para concentração de etanol na mistura de $\leq 72\%$ (BRASIL, 2011). O teste de estabilidade ao álcool consiste na mistura das mesmas proporções (v/v) de leite e etanol (mínimo de 72% de etanol), e o resultado é baseado na visualização (positivo) ou não de coagulação nas amostras de leite (BRASIL, 2011).

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 do leite ao etanol (O'CONNELL et al., 2006). 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; FISHER et al., 2012).

Desta forma, a resistência das proteínas do leite a formar coágulos em reação com o etanol é utilizada para estimar a resistência térmica destas proteínas durante o processamento industrial. Segundo Fisher et al. (2012), para resistir o tratamento térmico “UAT” (Ultra Alta Temperatura) o leite precisa ser estável em concentração alcoólica $\geq 74\%$ GL, sendo que o leite de alta qualidade normalmente é estável em reação com o álcool 80% GL. No entanto, estudos observaram baixa associação entre a estabilidade do leite ao etanol e ao aquecimento (teste da fervura e o tempo de coagulação a 140° C) (MOLINA et al., 2001; CHAVEZ et al., 2004). Esta baixa associação entre o teste do álcool é observada com maior frequência quando fatores não microbiológicos alteram a estabilidade das proteínas, como a força iônica do leite (CHAVEZ et al., 2004). Desta forma, problemas com baixa estabilidade do leite ao etanol ocorreram em diversas regiões do Brasil, e podem ser resultantes da alta contaminação microbiana (leite ácido) ou de demais fatores não microbiológicos que podem resultar em leite instável não ácido (LINA) (ZANELA et al., 2006; FISHER et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013).

2.5.1 Qualidade do leite e ocorrência de leite instável

A baixa estabilidade das proteínas pode ocorrer pela contaminação microbiológica do leite, principalmente devido à baixa qualidade higiênica no processo de ordenha e/ou de armazenamento do leite. Neste caso, a baixa estabilidade do leite poderia ser resultante da ação bacteriana sobre a lactose do leite, de forma a produzir ácido láctico e baixar o pH, resultando em leite ácido. A acidificação reduz a carga e a hidratação das proteínas do leite, o que aumenta a atração eletrostática entre as moléculas de caseína e mantém as micelas mais fortemente juntas, facilitando a coagulação (O'CONNELL et al., 2006; SANTOS; FONSECA, 2007).

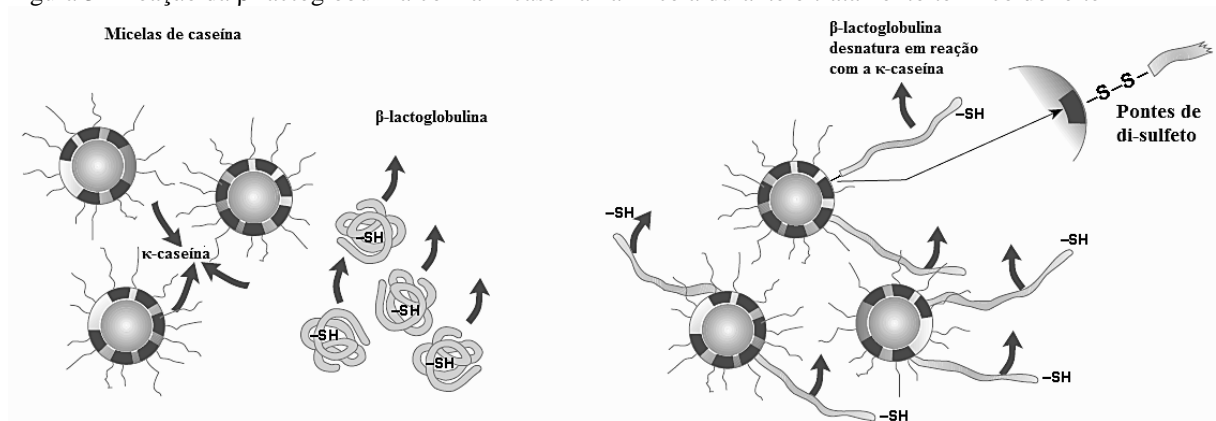
De outra forma, a ação enzimática resultante da elevada carga microbiológica do leite pode agir sobre a κ -caseína e contribuir para a menor estabilidade do leite (SANTOS; FONSECA, 2007). A hidrólise enzimática da κ -caseína reduz a estabilização esférica das micelas, bem como a repulsão eletrostática intermicelar, o que resulta em coagulação do leite (FOX et al., 1996). Adicionalmente, microrganismos psicrotóxicos, ao se multiplicarem no leite armazenado sob baixa temperatura, produzem proteases termoestáveis que agem sobre a κ -caseína, o que reduz o tempo de prateleira do leite pela formação de coágulos proteicos (FAIRBAIRN; LAW, 1986).

Desta forma, o leite instável pode coagular durante o tratamento térmico, e/ou durante a armazenagem, causando prejuízos em todos os elos da cadeia produtiva láctea (FONSECA; SANTOS, 2000; OLIVEIRA; TIMM, 2007). No Brasil, recentemente, demais fatores não relacionados à contaminação microbiana e a acidez do leite foram associados à ocorrência de leite de baixa estabilidade. O leite de baixa estabilidade sem acidez resultante de ação microbiana foi denominado, na região sul do Brasil, como “leite instável não ácido” (LINA) (ZANELA et al., 2006; FISHER et al., 2012). De outra forma, Ponce Ceballo e Hernandez (2001) denominaram o leite instável como “síndrome do leite anormal” (SILA). De acordo com estes autores, para ser considerado SILA, o leite deve ter baixa estabilidade, porém a acidez titulável deve ser menor que 13° C, ou o pH do leite deve ser elevado, o que difere da ocorrência de LINA (que apresenta pH dentro dos padrões normais). No entanto, 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 (SILA), enquanto que a ocorrência de LINA foi de 55,2% (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.

Fisher 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, Zanela et al. (2006); Barbosa et al. (2012) e Stumpf et al. (2013) 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. Os resultados de Barbosa et al. (2012) indicaram que as amostras instáveis ao

teste do álcool 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). Alterações nas proteínas κ -caseína e β -lactoglobulina foram associadas com a estabilidade do leite. As soroproteínas são desnaturadas durante o tratamento térmico, e, como resultado, reagem com a κ -caseína na micela, o que pode expor o interior hidrofóbico e cálcio sensível da micela ao contato com a água e a ionização com o cálcio, facilitando a coagulação (Figura 3) (BOTARO et al., 2007; MACHADO, 2010).

Figura 3 - Reação da β -lactoglobulina com a κ -caseína na micela durante o tratamento térmico do leite



Fonte: Adaptado de Bylund, G. (1995).

De outra forma, Chavez et al. (2004) relataram que a força iônica exercida pelos elementos minerais do leite (Ca, Na, K e Cl) é o principal fator que contribuiu para reduzir a estabilidade do leite não ácido ao etanol. No entanto, neste estudo o Ca iônico foi a única variável que alterou de forma significativa tanto a estabilidade do leite ao etanol quanto a estabilidade ao aquecimento a 140° C. Chavez et al. (2004) observaram que a concentração de Ca^{2+} apresentou o maior coeficiente de determinação ($R^2 = 0,36$) para estimar a estabilidade térmica do leite, enquanto que o Ca, o pH, a ureia e o fósforo apresentaram coeficientes de $R^2 = 0,19$, $R^2 = 0,08$, $R^2 = 0,05$, $R^2 = 0,04$, respectivamente. Adicionalmente, este estudo indicou que a estabilidade térmica é mais sensível à concentração de Ca^{2+} do que a estabilidade do leite ao etanol, o que indica que o teste do álcool tem menor acurácia em prever a estabilidade térmica do leite quando o mesmo apresenta alterações da concentração de cátions bivalentes (LINA).

Barros et al. (1999) também relacionaram a redução da estabilidade da proteína do leite com o aumento da concentração de cálcio iônico. Da mesma forma, Oliveira e Timm (2007) relataram que amostras de leite com menor estabilidade ao teste do álcool sem acidez adquirida apresentaram diminuição do teor de caseína e aumento das concentrações de íons, particularmente cálcio, em épocas de carência alimentar. Marques et al. (2011) observaram resultados semelhantes, uma vez que com o aumento da concentração de cálcio iônico no leite, a estabilidade ao etanol foi reduzida. As cargas elétricas das micelas de caseína dependem da concentração de cálcio ligado e, conseqüentemente, da concentração de cálcio livre no leite. Com o aumento da concentração de cálcio total no leite, aumenta a quantidade de cálcio ligado e reduz as cargas negativas das micelas, diminuindo a barreira energética para a coagulação. Inversamente, reduzindo-se o teor de cálcio, aumentam as cargas negativas das micelas, aumentando a força de repulsão eletrostática entre elas, dificultando a coagulação (BARROS et al., 1999; O'CONNELL et al., 2006; MARQUES et al., 2011).

Além da concentração de íons e da relação de proteínas no leite, outros fatores foram associados à estabilidade do leite no teste do álcool. A concentração de 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 uréia pode ser convertida em cianeto, que reage com a proteína e aumenta às cargas negativas das micelas, o que aumenta a força de repulsão entre elas, e, conseqüentemente, a estabilidade do leite (SWEETSUR; MUIR, 1981). De forma semelhante, o 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; SUTHERLAND, 1995). Os fosfatos, de forma semelhante ao citrato, também podem atuar para manter a estabilidade do leite (HOENE; MUIR, 1990), pois contribuem para reduzir o cálcio iônico no leite. Porém, o citrato se mantém solúvel por mais tempo 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 ao reduzir o pH do meio, o fosfato coloidal passa à fase solúvel e desestabiliza as proteínas do leite (SANTOS; FONSECA, 2007; MACHADO, 2010). Desta forma, fatores como o tempo de lactação, mastite, ambiente, genética e nutrição das vacas lactantes podem ser associados com as alterações nas propriedades físico-químicas e no equilíbrio salino do leite, o que pode alterar a estabilidade do leite ao etanol e/ou durante o tratamento térmico (FISHER et al., 2012).

2.5.2 Efeitos do tempo de lactação e da mastite sobre a estabilidade do leite

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 (FISHER et al., 2012). Este efeito é resultante do aumento no pH do leite, devido à maior permeabilidade do epitélio mamário a pequenas partículas e íons (HOLT, 2004). O estágio avançado de lactação foi um fator associado com a ocorrência de leite de baixa estabilidade (MARQUES et al., 2010). 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 (TSIOULPAS et al., 2007). A baixa estabilidade do leite nas fases inicial e final de lactação foi atribuída aos elevados teores de cálcio iônico do leite, quando comparado à concentração destes cátions no estágio intermediário de lactação (TSIOULPAS et al., 2007; LEWIS, 2011).

Segundo Fisher et al. (2012), a mastite subclínica não apresenta efeitos diretos sobre a estabilidade do leite ao etanol. No entanto, ao estudar amostras de leite na região nordeste do estado de São Paulo, Oliveira et al. (2013) verificaram que o leite estável apresentou menor contagem de células somáticas (CCS) que o leite instável. De forma semelhante, Feagan, Griffin e Lloyd (1966) estudaram os efeitos da mastite subclínica sobre a estabilidade do leite durante o aquecimento térmico a 140° C. Os autores coletaram amostras de leite oriundas de quartos mamários saudáveis e infectados de vacas primíparas e múltíparas nas diferentes fases de lactação, e, posteriormente, submeteram estas amostras ao aquecimento térmico a 140° C. Como resultado, os autores observaram que 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 à ausência de identificação dos efeitos isolados 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 (SANTOS; FONSECA, 2007).

2.5.3 Efeitos sazonais, genéticos e nutricionais das vacas leiteiras que podem alterar a estabilidade do leite.

Botaro et al. (2009) conduziram estudos na região Sudeste do Brasil, com total de 879 amostras de leite de tanque, oriundas de 603 vacas da raça Holandesa e 276 da raça Girolando, coletadas nas estações chuvosas e secas. A frequência dos genótipos AA, AB e BB da κ -caseína de 66,31, 31,84 e 1,33 para vacas da raça Holandês e 71,38, 27,90 e 0,72% para as da raça Girolando, respectivamente. No entanto, não foi observada associação entre a estabilidade do leite e os genótipos de κ -caseína, mas as vacas da raça Holandês apresentaram maior estabilidade do leite ao etanol do que vacas Girolando, e, adicionalmente, o leite foi mais estável na estação chuvosa do que na estação seca. De outra forma, Robitaille (1995) relataram que o polimorfismo na expressão do gene da κ -caseína afeta a estabilidade do leite ao etanol. No estudo de Robitaille (1995), o leite obtido de vacas que apresentaram predominância na expressão do alelo B em relação ao alelo A do gene da κ -caseína precipitou com maiores concentrações de etanol na mistura do que o leite de vacas com expressão similar para os alelos A e B.

Botaro et al. (2007) estudaram seis rebanhos leiteiros de vacas da raça Girolando e cinco da raça Holandês localizados na região sudeste do Brasil, dos quais foram coletadas um total de 953 amostras de leite, distribuídas em dois períodos do ano: chuvoso e seca. Não foi observado efeito do polimorfismo da β -lactoglobulina sobre a estabilidade do leite. Porém, Botaro et al. (2007) relataram que o leite oriundo de vacas da raça Holandês foi menos estável na estação seca. Os efeitos sazonais observados por Botaro et al. (2007) e Botaro et al. (2009) são similares aos resultados relatados por Fisher et al. (2012), que descreveram que os efeitos sazonais sobre a ocorrência de LINA podem ser atribuídos a escassez de alimentos, devido a deficiência de pastagens durante o período de vazio de forragem, compartilhamento de áreas para a produção de cereais, e deficiência de chuva para a produção de volumoso, no caso das regiões Sudeste, Central e Norte do Brasil.

Marques et al. (2007) observaram que a ocorrência média de LINA foi de 58% ao analisar 9.892 amostras de leite de tanque quanto à estabilidade ao álcool 76 °GL e acidez titulável. Neste estudo, foi observado que a maior ocorrência de LINA (77,88% das amostras analisadas) foi durante o outono e início do inverno, período este com escassez de forragem devido às pastagens de inverno ainda não estarem aptas para o pastejo associado à baixa

disponibilidade de forragens tropicais que se encontram em final de ciclo. Resultados semelhantes foram observados por Zanela et al. (2009), pois relataram que o final do verão foi o período que apresentou maior ocorrência de LINA (74,7% das amostras analisadas), período com baixa disponibilidade de forragem agravado pelo uso da terra para a produção de cereais, como milho e soja, na região noroeste do Rio Grande do Sul.

Desta forma, os estudos conduzidos no Brasil sugeriram que a deficiência de alimentos é um fator associado com a alta ocorrência de LINA (ZANELA et al., 2006; MARQUES et al., 2007; ZANELA et al., 2009). Barbosa et al. (2012) relataram que a o leite produzido por vacas em restrição alimentar apresentou maiores concentrações de β -caseína e proteína total, e teve tendência ($P= 0,068$) em ter menor teor de κ -caseína, quando comparado ao leite produzido por vacas alimentadas com dietas adequadas para atender a exigência nutricional. Stumpf et al. (2013) observaram que a restrição alimentar pode aumentar o espaço intercelular (junções firmes) do epitélio alveolar mamário e reduzir a estabilidade do leite. O aumento espaço intercelular do epitélio alveolar mamário pode possibilitar maior passagem de íons para o leite, como cátions bivalentes, o que pode contribuir para reduzir a força de repulsão eletrostática entre as micelas de caseína, facilitando a coagulação durante a reação com o etanol (BARROS et al., 1999; MARQUES et al., 2011).

Oliveira et al. (2013) coletaram 330 amostras de leite na região nordeste de São Paulo, durante os meses de maio, julho e setembro de 2007, e as distribuíram em dois grupos: a) leite estável, quando a precipitação da proteína ocorreu somente com etanol 78% (v/v); b) instável (LINA), quando a precipitação ocorreu com etanol 72% (v/v). Como resultado, 23% das amostras coletadas foram instáveis ao teste do álcool 72%, e apresentaram menor concentração de caseína total no leite, porém sem alteração nas subunidades de caseína (α , β , e κ -caseína) em relação às amostras estáveis.

Além do estágio de lactação e do aporte de nutrientes, alterações digestivas e metabólicas foram relacionadas à ocorrência de leite instável não ácido (FISHER et al., 2012). Fagnani; Beloti e Battaglini (2014) coletaram amostras de sangue e de leite de 96 vacas leiteiras em lactação, e observaram distúrbios no equilíbrio ácido-base do sangue em 50 % das vacas estudadas, e como principal resultado, a frequência de amostras de leite com instabilidade alcoólica foi maior nas vacas com distúrbios metabólicos. Outros estudos relataram que a estabilidade do leite foi reduzida em resposta a acidose metabólica, resultante da acidose ruminal (PONCE; HERNANDES, 2005) ou pela adição de sais aniônicos à dieta durante a lactação (MARQUES et al., 2011). Mellau et al. (2004) relataram que a adição de

sais aniônicos e a alta concentração de carboidratos não fibrosos na dieta estimularam o metabolismo do cálcio de forma semelhante, uma vez que ao induzir hipocalcemia em vacas não lactantes pela infusão intravenosa de EDTA, os autores observaram que a inclusão de carboidratos não fibrosos (10 kg/vaca/dia de cevada) na dieta ou a suplementação com sais aniônicos (cloreto e sulfato de amônio) recuperaram a homeostase do cálcio de forma semelhante.

A concentração de íons de cálcio no leite pode ser aumentada quando as vacas em lactação apresentam acidose metabólica (MARQUES et al., 2011). A acidose metabólica em vacas leiteiras é um distúrbio bastante comum nos atuais sistemas de produção de leite, pois pode ocorrer por diferentes meios: alta taxa metabólica de vacas lactantes; decorrente da acidose ruminal; e resultante da redução do balanço cátion-aniônico da dieta (BCAD). Todos os fluídos corporais devem permanecer com carga elétrica neutra, e a redução do pH sanguíneo em um quadro de acidose desencadeia mecanismos controlados por hormônios, como o da paratireóide (PTH), a calcitonina (CT) e o 1,25 dihidroxicolicalciferol (1,25(OH)₂D₃), os quais alteram a absorção intestinal, reabsorção óssea e excreção renal do cálcio, modificando as concentrações de cálcio nos fluídos corporais, como o leite. Desta forma, a acidose metabólica pode reduzir a estabilidade do leite por meio do aumento da concentração láctea de cálcio iônico (MARQUES et al., 2011).

Vacas em lactação que consomem quantidades expressivas de carboidratos não-fibrosos (rapidamente fermentáveis) podem desencadear processo de acidose metabólica em decorrência da acidose ruminal (MUTSVANGWA et al., 2004). 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 (FISHER et al., 2012). No entanto, ainda não está claro o efeito isolado de trocas de dietas sem adaptação prévia, mudanças de volumosos, e intensidade das alterações metabólicas de vacas leiteiras, sobre a estabilidade do leite ao etanol e ao tratamento térmico. Estudar os mecanismos que alteram a composição do leite influenciada pela acidose metabólica desencadeada em decorrência da acidose ruminal pode apresentar maior variação e aumentar o erro experimental, devido a modificações no fornecimento de nutrientes, como redução da proporção entre alimentos volumosos e concentrados. Portanto, para o estudo da estabilidade do leite influenciada pelos níveis de íons de cálcio, o equilíbrio iônico sanguíneo pode ser manipulado pelo BCAD, o qual pode aumentar ou reduzir o pH sanguíneo, sem alterar fornecimento de energia e proteína da dieta (BLOCK, 1994; MARQUES et al., 2011).

2.6 BALANÇO CÁTION-ANIÔNICO DA DIETA

O balanço cátion-aniônico da dieta (BCAD) pode ser entendido como a diferença entre os cátions e os ânions. Os cátions são os elementos que doam elétrons da última camada orbital, e por isso possuem carga positiva. Já os ânions, são os elementos que recebem elétrons da última camada orbital, e por isso possuem carga negativa. O sódio, o potássio (cátions) e os cloretos (ânions) são íons fixos, pois são biodisponíveis e não metabolizáveis, o que faz com que estes íons afetem o equilíbrio ácido-base do organismo (BLOCK, 1994; SANCHEZ; BEEDE; CORNELL, 1994). Já o enxofre (ânion) não é um íon fixo, porém contribui para acidificar os fluídos corporais, e, desta forma, deve ser incluso no cálculo do BCAD, uma vez que Tucker et al. (1991) descreveram que o efeito do enxofre foi similar ao do cloro sobre o equilíbrio ácido-base do sangue. Já os íons cálcio, magnésio e fosfatos não são incluídos no cálculo do BCAD, pois influenciam muito pouco no equilíbrio ácido-base do sangue (BLOCK, 1994).

Mongin (1981) foram os primeiros a relatarem que os íons monovalentes, Na, K e Cl, são os principais elementos que influenciam o equilíbrio ácido-base do sangue, e descreveram a equação do BCAD para aves: $mEq (Na + K) - (Cl)/100g$ de MS. Em geral, para ruminantes o balanço cation-aniônico da dieta pode ser calculado em miliequivalente (mEq) pela diferença entre os cátions (sódio + potássio) e os ânions (cloretos + sulfatos) por kg, ou por 100 g, de matéria seca (MS) (SANCHEZ; BEEDE; CORNELL, 1994) (Tabela 1). As dietas com maior proporção de cátions em relação aos ânions são denominadas de cationicas, e as dietas com maior proporção de ânions, são definidas como aniônicas (BLOCK, 1994).

Tabela 1 – Miliequivalência dos principais cátions e ânions que afetam o equilíbrio iônico sanguíneo de vacas leiteiras em lactação*

Íons	Peso Atômico (g/mole)	Valência	Peso miliequivalente (g)
Sódio	23,00	+1	0,023
Potássio	39,00	+1	0,039
Cloro	35,50	-1	0,0355
Enxofre	32,00	-2	0,016

*Adaptado de Cavalieri e Santos (2014).

2.6.1 Efeitos do balanço cátion-aniônico da dieta sobre o consumo de matéria seca, produção e composição do leite.

Diversos estudos foram conduzidos para avaliar o efeito do BCAD no período pré-parto e durante a lactação sobre o CMS e a produção de leite. No pré-parto, a suplementação com sais aniônicos resultou em maior desempenho produtivo de vacas leiteiras. Block (1984) relatou aumento de 6,8% de produção de leite durante a lactação ao utilizar sais aniônicos no pré-parto (-130 mEq/kg de MS), porém sem efeitos sobre o CMS durante a lactação. De forma semelhante, DeGroot, Block e French (2010) observaram que as vacas alimentadas com sais aniônicos (-100 a -120 mEq/kg de MS) durante o pré-parto aumentaram em 18 % (6,5 kg/vaca/dia) a produção de leite durante a lactação, quando comparado a vacas alimentadas com dieta controle (+220 mEq/kg de MS). Este aumento de produção de leite foi relatado pelos autores como consequência do aumento do CMS durante a lactação ao utilizar sais aniônicos no pré-parto. De outra forma, Moore et al. (2000) e Ramos-Nieves et al. (2009) não encontraram efeito da suplementação com sais aniônicos durante o pré-parto sobre a produção e composição do leite e CMS no pós-parto, quando comparada a utilização de dietas catiônicas. Resultado semelhante foi relado por Roche et al. (2003) ao estudar vacas em sistema de pastejo, uma vez que não observaram efeito do BCAD (+500 ou +70 mEq/kg de MS) do pré-parto sobre a produção de leite e o CMS no pós-parto. De acordo com Overton e Waldron (2004), para o sucesso de utilização de dietas aniônicas no pré-parto, o CMS não deve ser reduzido, o que pode ocorrer devido à baixa palatabilidade dos sais aniônicos, e consequentemente pode agravar os efeitos do balanço energético negativo nesta fase devido à capacidade reduzida de CMS das vacas leiteiras. Desta forma, os efeitos positivos da dieta aniônica no pré-parto sobre o CMS e a produção de leite no pós-parto pode depender de alguns fatores, como o tipo e o nível de sal aniônico utilizado, o CMS no pré-parto e o período de suplementação (OVERTON; WALDRON, 2004).

Nas dietas pós-parto, de acordo com o NRC (2001) recomenda-se a inclusão de 0,19, 1,02 e 0,25% da matéria seca da dieta de Na, K, Cl (270 mEq/kg de MS), respectivamente. Sanchez e Beede (1996) sugeriram que o BCAD pós-parto ótimo para a produção de leite está entre 250 e 500 mEq/kg de MS, sendo que o pico de consumo de matéria seca foi obtido com o BCAD de 380 mEq/kg de MS. Em estudo de meta-análise para avaliar os efeitos do balanço cátion-aniônico (-191 a 636 mEq/kg de MS) sobre o desempenho produtivo de vacas leiteiras

em lactação, Hu e Murphy (2004) relataram que o pico de consumo de matéria seca foi alcançado com o BCAD de 400 mEq/kg de MS. De forma semelhante, Oetzel e Barmore (1993) observaram aumento no consumo de matéria seca quando o BCAD foi elevado de -109 para 313 mEq/kg de MS. Hu et al. (2007) também descreveram associação positiva entre o BCAD e o consumo de matéria seca.

A associação positiva entre o BCAD e o consumo de matéria seca pode ser explicada pelo fato do aumento do BCAD elevar o pH ruminal (TUCKER et al., 1988; SHARIF et al., 2010), o que melhora as condições para a atividade microbiana ruminal. Ao elevar o BCAD de 55,5 para 258,1 mEq/kg de MS, Delaquis e Block (1995) observaram aumento no CMS de 1 Kg/vaca/dia em vacas na fase inicial de lactação; e ao elevar o BCAD de 140,2 para 372,7 mEq/kg de MS em vacas no terço médio de lactação, houve aumento do CMS de 1,4 kg/vaca/dia.

De forma similar ao CMS, a produção de leite e de seus constituintes podem ser aumentados de acordo com o BCAD. Ao elevar o BCAD de -100 para 200 mEq/kg de MS, Tucker et al. (1988) observaram aumento de produção de leite de 1,6 L/vaca/dia (18,5 e 20,1 L/vaca/dia, respectivamente). Segundo Hu e Murphy (2004), o nível máximo de produção de leite, produção de leite corrigida (4% de gordura), pH e bicarbonato no sangue foram alcançados com BCAD de 340, 550, 350 e 470 mEq/kg de MS, respectivamente. Já Chan et al. (2005) descreveram BCAD entre 230 e 330 mEq/kg de MS como ótimo para a produção de leite.

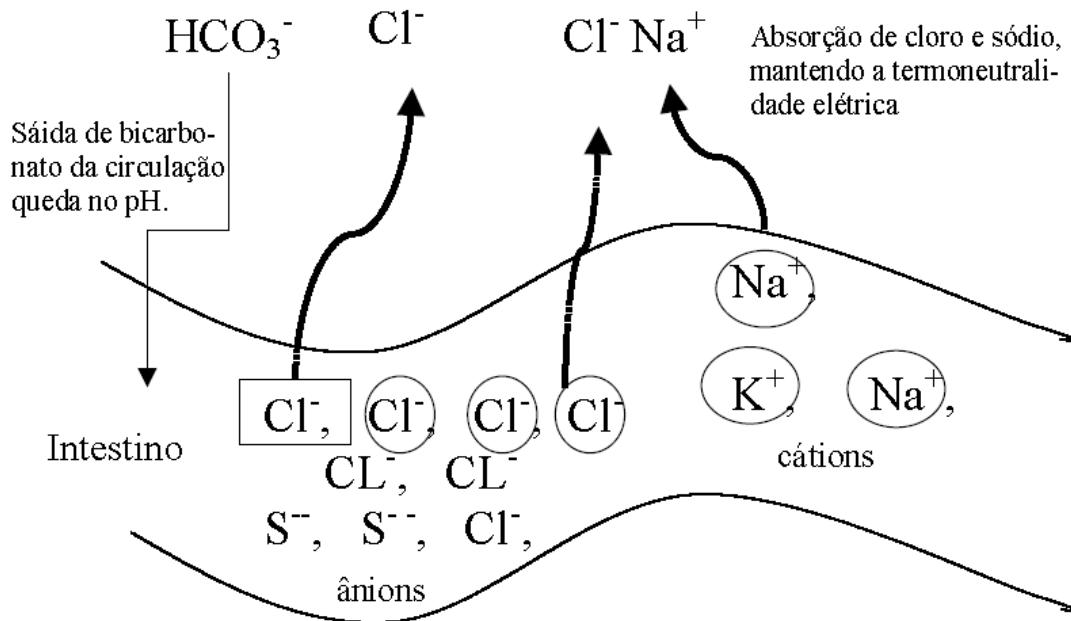
O aumento da produção de leite decorrente do aumento no BCAD pode ser associado ao maior consumo de matéria seca. Adicionalmente, a elevada taxa metabólica de vacas leiteiras em lactação torna os fluídos corporais ácidos devido a maior produção de CO₂ (HU; MURPHY, 2004). Desta forma, a elevação do BCAD pode contribuir para neutralizar o fluído celular devido às propriedades alcalinogênicas dos minerais catiônicos, o que contribui para aumentar a entrada de glicose nas células devido a maior atividade de insulina e, conseqüentemente, para o aumento na produção de leite (BLOCK, 1994). Por outro lado, Roche et al. (2003) descreveram que o BCAD acima de 520 mEq/kg de MS pode reduzir o consumo de matéria seca e a produção de leite pelo excesso de cátions na dieta.

2.6.2 Dieta aniônica e acidose metabólica

Todos os fluídos corporais devem permanecer com carga elétrica neutra. Desta forma, mudanças na carga elétrica dos fluídos biológicos podem alterar a transferência de íons H^+ e, conseqüentemente, o pH sanguíneo, resultando em acidose (em excesso de ânions) ou alcalose (em excesso de cátions) metabólica, que podem ser rapidamente compensados por mecanismos fisiológicos para reestabelecer a homeostase (GOFF, 2008). Devido aos mecanismos de compensação metabólica, o pH do sangue é rigidamente controlado, de modo que o pH do sangue arterial geralmente situa-se entre 7,35-7,45 e do sangue venoso ligeiramente mais baixo (NAGY et al., 2001). Desta forma, a redução do BCAD pode resultar em acidose metabólica devido ao elevado consumo de ânions, embora que as mudanças de pH do sangue possam não ser significativas devido as respostas fisiológicas rapidamente desencadeadas para compensar a acidose (CHARBONNEAU et al., 2006; GRÜNBERG; DONKIN; CONSTABLE, 2011). Um dos mecanismos responsáveis por manter o equilíbrio iônico-sanguíneo é controle renal, uma vez que, em caso de acidose metabólica, a excreção urinária de ânions e a reabsorção de cátions podem ser elevadas na tentativa de manter o pH sanguíneo próximo à neutralidade. Desta forma, a avaliação mais acessível para o monitoramento do estado ácido-base de vacas leiteiras é o pH da urina, de modo que quando este pH é inferior a 7,0, um quadro de acidose metabólica pode ser gerado (JARDON, 1995).

Portanto, ao reduzir o BCAD por adição de sais aniônicos (cloretos e/ou sulfatos), mecanismos fisiológicos são desencadeados para manter o pH sanguíneo próximo a homeostasia. Todavia, nenhuma destas trocas, ácidas ou básicas do pH sanguíneo causam problemas fisiológicos nas vacas, visto que o pH sanguíneo é altamente tamponado pelos pulmões e pelos rins. Como consequência do fornecimento de dietas aniônicas, as concentrações intestinais de Cl^- e SO_4^{2-} são aumentadas. Com o objetivo de manter a neutralidade elétrica, ocorre excreção de HCO_3^- da circulação para o lúmen intestinal (Figura 4), o que reduz as concentrações sanguíneas de HCO_3^- , resultando em leve redução de pH do sangue e no desenvolvimento quadro de acidose metabólica (BLOCK, 1994). A concentração de bicarbonato sanguíneo representa cerca de 95% do total de dióxido de carbono (TCO_2), pois estas variáveis estão associadas entre si. Desta forma, em um quadro de acidose metabólica, as concentrações séricas de HCO_3^- e o TCO_2 podem ser reduzidos (BLOCK, 1994; ORTOLANI, 2003).

Figura 4 - Efeito da inclusão de sais aniônicos na dieta sobre a absorção de minerais e trocas iônicas no intestino



Fonte: Block (1994).

Uma forma de estimar o equilíbrio iônico sanguíneo é por meio da medida do excesso de bases no sangue. Esta variável é mensurada pela quantidade de ácido clorídrico necessária para atingir o pH 7,4, em uma pressão de CO₂ (pCO₂) de 40 mmHg em temperatura de 37° C. Desta forma, o excesso de bases estima a quantidade de tampões existentes dentro do sangue, sendo que os valores normais encontram-se próximos a zero. Quanto mais negativa for esta medida, mais intenso é o quadro de acidose metabólica (ORTOLANI, 2003). Como resposta a acidose metabólica vários mecanismos fisiológicos passam a ser mais ativos, os quais resultam em aumento de concentrações sanguíneas de cálcio (BLOCK, 1994):

- 1- Aumento de excreção de HCO₃, objetivando compensar o dreno de bicarbonato para o intestino, com isso o cálcio também passa a ser liberado na circulação, disponibilizando cálcio para a glândula mamária (BLOCK, 1994).
- 2- Aumento na atividade do 1,25-dihidroxicoliciferol (1,25(OH)₂D₃) e paratormônio (PTH) mobilizando cálcio para a circulação, pois a produção renal de 1, 25 (OH)₂D₃ é um processo enzimático sensível ao pH e qualquer mudança no pH intracelular alteraria a atividade enzimática (GAYNOR et al., 1989; BLOCK, 1994).

Adicionalmente, animais com acidose metabólica apresentam alteração do metabolismo renal. Os rins aumentam a excreção de íons de hidrogênio na urina, e aumentam a reabsorção de bicarbonato nos túbulos renais. Em resposta a acidose metabólica, também

pode ou não ter aumento de frequência respiratória para maior eliminação de CO₂ pela expiração (ORTOLANI, 2003).

Devido aos efeitos da acidose metabólica sobre metabolismo do cálcio, de modo que as concentrações séricas deste mineral sejam aumentadas, a dieta aniônica é amplamente utilizada nos dias antecedentes ao parto para prevenir a hipocalcemia subclínica, febre do leite ou paresia puerperal no pós-parto. A hipocalcemia é caracterizada pela rápida depleção das concentrações de cálcio no sangue no período próximo ao parto, devido ao grande fluxo de cálcio para a glândula mamária no início da lactação, e este distúrbio metabólico pode ser caracterizado como hipocalcemia clínica ou subclínica. A hipocalcemia subclínica pode ser caracterizada quando as concentrações séricas de Ca está abaixo de 8,6 mg/dL (MARTINEZ et al., 2012); ao passo que a hipocalcemia clínica pode ser definida quando a baixa concentração de Ca no sangue resulta em insuficiência homeostática (concentração de Ca < 5,5 mg/dL) (GOFF, 2008).

Portanto, a acidose metabólica induzida é uma forma de aumentar a ação dos hormônios envolvidos no metabolismo do cálcio, como o PTH e o 1,25 dihidroxicolicalciferol (1,25(OH)₂D₃), o que resulta em maior concentração de cálcio do sangue, e redução da incidência de hipocalcemia no pós-parto (BLOCK, 1984; SHARIF et al., 2010). A redução do BCAD pode alterar efetivamente o equilíbrio ácido-base de vacas leiteiras dentro de 36 horas (GOOF; HORST, 1998), porém, por demais questões, como divisão de lotes e manejo alimentar, o uso de dietas aniônicas no pré-parto pode ser recomendado durante as duas ou três semanas antecedentes ao parto. Oetzel et al. (1988) relataram que vacas no pré-parto alimentadas com BCAD de 187 mEq/kg de MS apresentaram maior incidência de hipocalcemia do que vacas alimentadas com BCAD negativo de -75 mEq/kg de MS. Sanchez e Blauxickel (1994) relataram que dietas pré-parto com BCAD entre -100 e -150 mEq/Kg de MS previnem a hipocalcemia. De forma semelhante, Charbonneau et al. (2006) relataram que a redução do BCAD de +300 para 0 mEq/kg de MS reduziu o pH urinário de 8,09 para 7,01, aumentou em 11% a concentração de Ca no sangue, e reduziu a incidência de febre do leite de 16,4 para 3,2 %. Para reduzir o balanço cátion-aniônico da dieta no período pré-parto, podem ser incluídos na dieta sais aniônicos, como os sulfatos (sulfato de amônio, sulfato de cálcio e sulfato de magnésio) e os cloretos (cloreto de amônio, cloreto de cálcio e cloreto de magnésio) (Tabela 2).

Tabela 2 - Sais aniônicos utilizados no período pré-parto para reduzir o balanço cátion-aniônico da dieta*

Sal aniônico	mEq/100g MO	%N	%Ca	%Mg	%S	% Cl	%MS
Sulfato de amônio	-1519	21,2			24,3		100
Sulfato de Ca	-1162		23,3		18,6		79,1
Sulfato de Mg	-812,5			9,9	13		48,8
Cloreto de Amônio	-1870	26,2				66,3	100
Cloreto de Ca	-1359		27,3			48,2	75,5
Cloreto de Mg	-984			12,0		34,9	46,8

*Fonte: (Beede, 1992).

Desta forma, a dieta aniônica é uma forma eficiente de induzir acidose metabólica e alterar o metabolismo do cálcio e a atividade da vitamina D, o que pode ser um modelo de estudo eficiente para avaliar os efeitos das alterações do equilíbrio iônico sanguíneo em vacas em lactação sobre a produção, composição e estabilidade do leite, além de demais fatores digestivos e metabólicos. Para avaliar o efeito da acidose metabólica em vacas leiteiras durante a lactação, Marques et al. (2011) adicionaram 250g/vaca/dia de cloreto de amônio (sal aniônico) na dieta de vacas da raça Jersey em lactação, de modo a fornecer a dieta aniônica (-200 mEq/kg de MS), e observaram redução do pH urinário e aumento das concentrações sanguíneas de ureia, cálcio e magnésio, quando comparadas a dieta controle (+100 mEq/kg de MS). Ainda no mesmo estudo, as amostras de leite correspondentes às vacas que receberam cloreto de amônia coagularam em menores concentrações de etanol no teste do álcool, e apresentaram menor densidade, porcentagens de lactose, proteína e imunoglobulina, porém maior teor de cálcio iônico. Roche et al. (2003), descreveram que não necessariamente o balanço cátion-aniônico necessita ser negativo para desencadear um quadro de acidose metabólica; uma vez que observaram que a redução do balanço cátion-aniônico de 520 para +210 mEq/Kg de MS já desencadeia um quadro de acidose metabólica, demonstrada pela redução de HCO_3 do pH sanguíneo, e do aumento da excreção urinária de cálcio. Desta forma, a intensidade de alterações do equilíbrio ácido-base do sangue pode determinar a concentração de cátions bivalentes no leite e, conseqüentemente, a estabilidade do leite ao etanol e ao tratamento térmico.

3 CAPITULO I - EFEITO DO BALANÇO CÁTION-ANIÔNICO DA DIETA SOBRE A ESTABILIDADE DAS PROTEÍNAS DO LEITE

RESUMO

A estabilidade da micela de caseína está negativamente associada com a concentração de cálcio iônico do leite, a qual pode variar de acordo com as condições nutricionais e metabólicas das vacas leiteiras. Desta forma, o presente estudo objetivou avaliar o efeito do balanço cátion-aniônico da dieta sobre as subunidades de caseína, proteínas do soro, cálcio iônico e a estabilidade do leite ao etanol e ao aquecimento térmico. Foram utilizadas 16 vacas da raça Holandesa distribuídas em 4 quadrados contemporâneos em um delineamento Quadrado Latino 4 x 4, com 4 períodos de 21 dias e 4 tratamentos. Os tratamentos experimentais consistiram de 4 níveis de balanço cátion-aniônico da dieta (BCAD): +290; +192; 98 e -71 mEq/kg de MS. As concentrações de cálcio iônico e de κ -caseína do leite foram reduzidas de acordo com o aumento do BCAD, enquanto que as concentrações de nitrogênio ureico do leite e de β -lactoglobulina foram elevadas. Como resultado destas alterações, a estabilidade do leite durante a reação com o etanol e ao aquecimento a 140° C foi elevada linearmente de acordo com o aumento do BCAD [$Y = 74,87$ (EP = 0,87) + 0,01174 (EP = 0,0025) \times BCAD (mEq/kg de MS) e $Y = 3,95$ (EP = 1,02) + 0,01234 (EP = 0,0032) \times BCAD (mEq/kg de MS), respectivamente]. Adicionalmente, a produção de leite corrigida e os teores de gordura, lactose e sólidos totais do leite foram elevados linearmente em 13,52, 8,78, 2,5 e 2,6 %, respectivamente, de acordo com o aumento do BCAD; enquanto que os teores de PB e de caseína foram reduzidos linearmente em 4,83 e 4,49 %, respectivamente. Como conclusão, as alterações metabólicas de vacas leiteiras que ocorrem em tentativa de manter o equilíbrio iônico sanguíneo próximo a homeostasia é um importante fator a ser considerado para manter o leite estável ao etanol e ao aquecimento térmico.

Palavras-chave: Acidose metabólica. BCAD. Cálcio iônico. Caseína. Leite Instável Não Ácido.

EFFECT OF DIETARY CATION-ANION DIFFERENCE ON THE STABILITY OF MILK PROTEINS

ABSTRACT

The casein micelle stability is negatively correlated with the milk ionic calcium concentration, which may change according to metabolic and nutritional conditions of dairy cows. The present study aimed to evaluate the effect of dietary cation-anion difference (DCAD) on concentrations of casein subunits, whey proteins, ionic calcium, and milk thermal and ethanol stability. Sixteen Holstein cows were distributed in four contemporary 4 x 4 Latin Square design, which consisted of four periods of 21 days and four treatments according to DCAD: +290; +192; +98 e -71 mEq/kg DM. The milk concentrations of ionic calcium and κ -casein were reduced according to DCAD increasing, while the milk urea nitrogen and β -lactoglobulin concentrations were increased. As a result of these alterations, the milk ethanol stability and milk stability during heating at 140 ° C was increased linearly according to DCAD increases [$Y = 74.87$ (SE = 0.87) + 0.01174 (SE = 0.0025) \times DCAD (mEq/kg DM) and $Y = 3.95$ (SE = 1.02) + 0.01234 (SE = 0.0032) \times DCAD (mEq/kg DM), respectively]. Additionally, the fat corrected milk and fat, lactose and the total milk solids content were linearly increased in 13.52, 8.78, 2.5 and 2.6%, respectively, according to DCAD increases from -71 to 290 mEq/kg DM; while CP and casein content were linearly reduced in 4.83 and 4.49%, respectively. In conclusion, the control of metabolic changes in lactating dairy cows to maintain the blood acid-base status in equilibrium play an important role to maintain milk stable to ethanol and heating treatment.

Keywords: Metabolic acidosis. DCAD. Ionic calcium. Casein. Unstable not acid milk.

3.1 INTRODUÇÃO

O termo “estabilidade térmica do leite” refere-se à resistência relativa das proteínas lácteas em suportar o tratamento térmico industrial sem sofrer coagulação (SINGH, 2004; FISHER et al., 2012). Nos atuais sistemas de produção de leite, a demanda por desenvolvimento de novos produtos lácteos, a produção de derivados que necessitam tratamentos térmicos intensos, como UAT e o leite em pó, e a necessidade de estender a vida de prateleira dos produtos lácteos, aumentam a necessidade de produzir leite com elevada estabilidade. Desta forma, a baixa estabilidade do leite pode afetar diretamente a eficiência da cadeia agroindustrial láctea, uma vez que o leite instável gera prejuízos aos produtores, pela penalização no preço e/ou pelo descarte de leite de baixa estabilidade; e à indústria, pois o leite de baixa estabilidade pode coagular durante o processamento térmico, o que gera descarte de leite e gastos adicionais com higienização do sistema de processamento. Desta forma, a estabilidade do leite ao etanol (teste do álcool) ainda é realizada antes da coleta de leite nas fazendas e na plataforma de recebimento das indústrias laticinistas como uma forma de estimar a estabilidade térmica das proteínas do leite (FISHER et al., 2012).

A proteína do leite é composta pelas proteínas do soro e pelas caseínas, sendo que esta última está presente no leite na forma de micelas. Desta forma, as micelas de caseína são formadas por subunidades (α , β e κ) de caseínas interligadas por fosfato de cálcio (WALSTRA, 1999). O cálcio, além de estar presente em sua fase coloidal, também está presente no leite na sua forma livre (cálcio iônico), que está negativamente correlacionada com a estabilidade das micelas de caseínas (BARROS et al., 1999). O aumento da concentração de cálcio iônico (Cai) do leite pode reduzir as cargas negativas das micelas de caseínas e a força de repulsão eletrostática entre elas, o que pode reduzir a resistência do leite em formar coágulos durante o contato com o etanol e / ou durante o aquecimento térmico (BARROS et al., 1999). Além disso, a α e a β -caseína são hidrofóbicas e instáveis ao contato com Cai. No entanto, a κ -caseína, localizado na região superficial da micela, é hidrofílica e estável a reação com o Cai, e desta forma protege o interior hidrofóbico da micela (composto por α e β -caseína) do contato com a água e da ionização com o Cai (CREAMER et al., 1998; WALSTRA, 1999). Portanto, além da função nutricional, a organização estrutural da α , β e κ -caseína na micela e a força de repulsão eletrostática entre as micelas pode determinar a estabilidade do leite durante o tratamento térmico e a vida de prateleira de produtos lácteos

após os processos industriais de aquecimento, congelamento e secagem (BARROS et al., 1999; FISHER et al., 2012; HOLT et al., 2013).

Em diversas regiões do Brasil (ZANELA et al. 2006; MARQUES et al., 2007; BOTARO et al., 2009; FISHER et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013) e em demais países que utilizam a estabilidade ao etanol como um parâmetro de qualidade do leite (BARROS et al., 1999; MOLINA et al., 2001; NEGRI et al., 2003; CHAVEZ, et al., 2004), foi relatada alta frequência de leite de baixa estabilidade, no entanto, sem acidez resultante de ação microbiana (leite instável não ácido). As condições nutricionais e metabólicas das vacas leiteiras foram os principais fatores relatados que podem alterar a estabilidade do leite não ácido (ZANELA et al., 2006; MARQUES et al., 2007; BOTARO et al., 2009; MARQUES et al., 2011; BARBOSA et al., 2012). Barbosa et al. (2012) e Stumpf et al. (2013) relataram que vacas alimentadas com dietas deficientes em nutrientes produziram leite com menor estabilidade ao etanol do que vacas alimentadas com dietas balanceadas. De outra forma, Marques et al. (2011) relataram que a acidose metabólica de vacas leiteiras, por meio da ação dos hormônios PTH e 1,25-dihidroxicalciferol, pode aumentar a concentração de Ca^{2+} e reduzir a estabilidade do leite ao etanol. Resultado similar foi observado por Chavez et al. (2004), pois neste estudo os autores relataram que a concentração de cálcio iônico do leite é o principal fator determinante da estabilidade do leite ao etanol e ao tratamento térmico.

Além da concentração de Ca^{2+} e de κ -caseína, demais componentes lácteos também foram associados com a baixa estabilidade do leite, como a formação de complexos proteicos da β -lactoglobulina com κ -caseína na micela, nitrogênio ureico do leite, temperatura, pH, e as concentrações lácteas de citrato e fosfatos (SWEETSUR; MUIR, 1981; SINGH, 2004; LEWIS, 2011; HOLT et al., 2013). Os constituintes lácteos associados com a estabilidade do leite podem ser alterados diretamente pela nutrição e pelo estado metabólico das vacas leiteiras (MARQUES et al., 2011; BARBOSA et al., 2012; FISHER et al., 2012). No entanto, poucos estudos isolaram os fatores nutricionais e metabólicos das vacas leiteiras que podem alterar a estabilidade do leite, uma vez que tanto a deficiência quanto o excesso de nutrientes, por meio da acidose metabólica resultante da acidose ruminal, podem reduzir a estabilidade do leite por diferentes meios (MARQUES et al., 2011; BARBOSA et al., 2012; FISHER et al., 2012). Adicionalmente, outros fatores também podem contribuir para a acidificação do pH sanguíneo de vacas leiteiras, como a alta taxa metabólica e a inclusão de sais aniônicos na dieta (MARQUES et al., 2011).

Uma forma de elevar o pH sanguíneo, prevenir distúrbios metabólicos, e reduzir a concentração de cátions bivalentes no sangue é pelo aumento do balanço cátion-aniônico da dieta (BCAD) (BLOCK, 1994; HU; MURPHY, 2004). No entanto, ainda não foi determinado o efeito do aumento gradativo do BCAD de vacas leiteiras sobre o controle da concentração láctea de Cai e, conseqüentemente, da estabilidade do leite ao etanol e ao aquecimento térmico. Adicionalmente, Molina et al. (2001); Chavez et al. (2004) e Fisher et al. (2012) relataram que a estabilidade do leite ao etanol apresenta capacidade limitada para estimar a estabilidade do leite durante o tratamento térmico industrial, o que dificulta o uso de resultados de estudos baseados apenas na estabilidade ao etanol para definir medidas de correção do leite instável ao tratamento térmico. Portanto, o presente estudo objetivou avaliar o efeito do balanço cátion-aniônico da dieta de vacas leiteiras sobre a concentração de subunidades de caseína, proteínas do soro, cálcio iônico e estabilidade do leite ao etanol e ao aquecimento a 140° C.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 16 vacas da raça Holandês com 158 ± 52 dias em lactação, com peso corporal de 618 ± 57 kg, produção média de $22 \pm 4,5$ kg/dia, as quais foram alojadas em baias individuais (16 m^2), com controle individual de consumo de alimentos e regime de duas ordenhas/dia. As vacas foram distribuídas em delineamento do tipo quadrado latino com total de 4 quadrados contemporâneos, 4 períodos de 21 dias e 4 tratamentos. Cada período teve duração de 21 dias, sendo que os primeiros 14 dias foram destinados à adaptação da dieta e os últimos 7 para a coleta de amostras e mensurações das variáveis respostas. Os tratamentos experimentais consistiram de 4 níveis de balanço cátion-aniônico da dieta (BCAD), calculado de acordo com os teores de Na, K, Cl e S dos ingredientes dietéticos (Tabela 3): +290; +192; 98 e -71 mEq/kg de MS. O BCAD foi calculado de acordo com Tucker et al. (1991), pelo uso da seguinte fórmula: $\text{mEq/kg de MS} = [(\% \text{Na na MS}/0,023) + (\% \text{K na MS}/0,039)] - [(\% \text{Cl na MS}/0,0355) + (\% \text{S na MS}/0,016)]$. As dietas foram formuladas para serem isocalóricas (1,58 Mcal/kg) e isoproteicas (160 g/kg de MS), de acordo com as recomendações do NRC (2001). As vacas foram alimentadas em sistema de dieta completa fornecida *ad libitum*, de modo a permitir 5 a 10% de sobras.

Tabela 3- Proporção de ingredientes e composição química das dietas de vacas leiteiras de acordo com o balanço cátion-aniônico da dieta

Ingredientes	Balanço Cátion-Aniônico da Dieta mEq/kg de MS			
	-71	98	192	290
	g/Kg MS			
Milho	205,63	212,38	214,32	209,72
Farelo de soja (46% PB)	153,45	146,47	145,78	150,23
Núcleo mineral	15,34	15,34	15,34	15,34
Cloreto de sódio	5,11	7,67	7,93	-
Bicarbonato de sódio	-	2,25	3,58	11,66
Sulfato de amônio	14,834	5,678	-	-
Uréia	2,56	7,16	9,97	9,97
Fosfato bicálcico	2,56	2,56	2,56	2,56
Óxido de Magnésio	0,56	0,56	0,56	0,56
Silagem de milho	600	600	600	600
	Composição bromatológica g/kg MS			
MS, g/kg MN	609	609	608,9	608,9
MO	918,6	918,7	919,9	919,6
PB	163,17	161,13	161,13	163,07
EE	27,7	27,9	27,98	27,8
NDT*	665,17	670,56	674,33	677
ELI*, Mcal/kg MS	1,51	1,52	1,53	1,54
FDN	351,41	350,9	350,9	351,41
FDNcp ¹	321,65	321,87	321,91	321,97
FDA	190,7	190,1	190,1	190,5
PBIDN	29,76	29,02	28,98	29,44
PBIDA	11,77	11,74	11,76	11,77
CNF**	401,59	409,73	414,18	417,40
Lignina	21,3	21,2	21,2	21,3
MM	6,54	6,51	6,39	5,84
Ca	6,14	6,14	6,14	6,14
P	3,15	3,13	3,13	3,07
Na	3,38	4,96	5,42	4,65
K	10,23	10,08	10,08	10,13
Cl	3,89	5,12	5,52	0,87
S	5,93	3,71	2,35	2,35

*Estimado pelo NRC (2001); **Calculado segundo HALL (2000); ¹FDNcp= Fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína; MN= Matéria natural; ²Núcleo mineral, g/kg: 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).

3.2.1 Coletas e análises de alimentos e consumo de matéria seca.

Diariamente, foram feitas pesagens das quantidades das dietas e das sobras de cada vaca, para estimativa do consumo de matéria seca (CMS). As vacas foram arraçadas de acordo com o CMS no dia anterior, de forma a ser mantido um percentual de sobras diárias das dietas entre 5 e 10% do fornecido. Durante os últimos 4 dias de cada período experimental foram coletadas amostras dos alimentos fornecidos e das sobras da dieta, as quais foram armazenadas a -20° C, de modo a compor uma amostra composta por animal de cada período com base no peso seco para realização das análises bromatológicas.

Nas amostras de alimentos e sobras foram determinados os teores de MS, MM, PB e EE de acordo com as metodologias descritas pela AOAC (1995). Os teores de PBIDN, PBIDA, LDA, FDN e FDA foram obtidos conforme técnica desenvolvida por Van Soest et al. (1991). A determinação de FDN foi de acordo com as adaptações descritas por Mertens (2002), usando α -amilase e sem adição de sulfito de sódio. As amostras foram moídas, digeridas a seco e posteriormente solubilizadas para a realização das análises de minerais. Os teores de Ca, P, Na e K foram determinados por espectrofotometria de chama (THERMO FISHER, 2008), e a concentração de cloretos (Cl) pelo método de Mohr (AOAC, 1995). A determinação da concentração de S foi obtida por colorimetria (molibdênio azul) segunda metodologia descrita por Malavolta, Vitti e Oliveira (1997). Adicionalmente, os teores de CNF foram calculados segundo Hall (2000); e os teores de NDT e EL_L foram calculados de acordo com o NRC (2001). Com base na composição bromatológica dos alimentos e das sobras, foi calculado o CMS, e consumo de PB, FDN, EE, CNF, NDT, Ca, P, Na, K, Cl e S segundo NRC (2001).

3.2.2 Coleta e análises de amostras de leite.

A produção de leite foi mensurada diariamente e utilizada para calcular a produção de leite corrigida para 3,5% de gordura, segundo fórmula descrita por Sklan et al. (1994). As amostras de leite foram coletadas no 15° e 16° dia de cada período, refrigeradas e conservadas com bronopol para determinação dos teores de gordura, lactose, sólidos totais (TS), caseína e

PB por absorção infravermelha (BENTLEY INSTRUMENTS, 1995a) e crioscopia do leite por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FOSS ANALYTICAL, 2008). O teor de nitrogênio ureico no leite (NUL) foi determinado por método enzimático espectrofotométrico (BENTLEY INSTRUMENTS, 1998). O teor de extrato seco desengordurado (ESD) do leite foi obtido pela diferença do teor de gordura e de sólidos totais do leite. A contagem de células somáticas (CCS) foi realizada por citometria de fluxo (BENTLEY INSTRUMENTS, 1995b).

Em cada período experimental, amostras de leite foram coletadas para imediata determinação da concentração de cálcio iônico (Cai) por meio de potenciômetro com eletrodo seletivo e pH por potenciometria (BARROS et al., 1999). Amostras individuais de leite de todas as vacas foram coletadas e congeladas a -20°C para posteriores análises dos teores de Ca, P, Na e K por espectrofotometria de chama (THERMO FISHER, 2008), e cloretos pelo método de Mohr (AOAC, 1995).

Amostras de leite oriundas das duas ordenhas diárias foram coletadas e armazenadas por 12 horas sob refrigeração. Antes da determinação da estabilidade do leite ao etanol nas seguintes graduações: 68, 70, 72, 74, 76, 78 e 80% de etanol na solução alcoólica, os frascos que continham leite foram destampados para a liberação do dióxido de carbono dissolvido. A técnica consistiu em misturar 2 mL de leite e 2 mL de solução alcoólica, seguida de homogeneização por alguns segundos e avaliação visual da presença de coágulos. Os resultados foram expressos pela menor concentração de álcool em que ocorreu a precipitação (ZANELA et al., 2006). Adicionalmente, para avaliar a estabilidade térmica do leite foi determinado o tempo de coagulação. Para tanto, capilares de vidro (7,00 cm de comprimento, 0,15 cm de diâmetro externo e 0,1 cm de diâmetro interno) foram preenchidos individualmente com amostras de leite, fechados hermeticamente com calor, e submetidos à imersão em glicerina para aquecimento a 140°C . O tempo para a coagulação foi registrado desde a introdução dos capilares no banho com glicerina a 140°C até o aparecimento dos primeiros sinais visíveis de coagulação (NEGRI et al., 2003).

Para a quantificação da concentração das subunidades de caseína (α_{S1} , α_{S2} , β e κ -caseína) e proteínas do soro (α -lactalbumina e β -lactoglobulina), foram coletadas amostras de leite representativas das duas ordenhas diárias, as quais foram congeladas (-20°C) até a análise. Cada amostra foi avaliada em duplicata, onde o resultado obtido foi resultante das suas respectivas médias, através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme metodologia proposta por Bobe et al. (1998). Para as análises no sistema CLAE, de cada

amostra de leite coletada, foram separadas alíquotas de 500 μ L, alocados em 1 tubo ependorf, e então congelados a -20° C. Momentos antes das análises, foram acrescentados 500 μ L de uma 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 ditioneol (pH 7), seguido de agitação por 10 segundos a temperatura ambiente, e descanso durante 1 hora. Logo após este período, os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 14000 rpm. A camada de gordura foi removida com escapula e o restante da amostra diluída com uma 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. Para está última, 20 μ L de amostra foram injetados no sistema CLAE, equipado com luz UV, e com uma 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 um 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 gradativamente a proporção do solvente B após injeção da amostra [34% (4 minutos), 48% (11 minutos), 50% (13 minutos) e 100% (17 minutos), retornando as condições iniciais após 2 minutos], em um fluxo de 1 mL/minuto, com comprimento de onda do detector de 220 nm. Os seguintes tempos de retenção foram obtidos para α _S-caseína, β -caseína, κ -caseína, α -lactalbumina e β -lactoglobulina, respectivamente: 12,3 min, 12,9 min, 9,1 min, 14,4 min e 14,1 min.

Para interpretação dos resultados das análises de cromatografia das amostras em questão, foi construído uma equações de regressão através das curvas de calibração, com a utilização de proteínas padrão do leite bovino purificado (Sigma, Saint Louis, MO, EUA), preparados nas mesmas condições descritas para as amostras de leite nas seguintes concentrações: α _S-caseína: 0,5, 1,0, 2,0 e 4,0 mg/mL; β -caseína: 0,375, 0,75, 1,50 e 3,0 mg/mL; κ -caseína: 0,187, 0,375, 0,75 e 1,50 mg/mL; α -lactalbumina: 0,125, 0,250, 0,375 e 0,5 mg/mL; β -lactoglobulina: 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0 mg/mL, e a relação α _{S1}: α _{S2} foi considerada 4:1 (BOBE et al., 1998). Para formar a curva, cada amostra padrão foi injetada 10 vezes, separadamente, no sistema CLAE. Portanto, os resultados de cada replicada foram utilizados para formar o desvio padrão da curva.

3.2.3 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. Para análise dos dados foi utilizado o procedimento MIXED do SAS (2001) de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + Q_j + A(Q)_k + P_l + e_{ijkl},$$

em que Y_{ijkl} = foi o valor observado; μ = média geral; T_i = efeito fixo de tratamento i (3 GL); Q_j = efeito fixo do quadrado latino, $j = 1$ a 4 (3 GL); $A(Q)_k$ = efeito aleatório do animal k dentro de cada quadrado latino, $k = 1$ a 16 (12 GL); P_l = efeito fixo do período, $l = 1$ a 4 (3 GL); e_{ijkl} = erro aleatório associado a cada observação.

Os polinômios ortogonais foram obtidos com a utilização do Proc-IML, pois os tratamentos não foram igualmente espaçados. O efeito de tratamento foi decomposto em três contrastes polinomiais ortogonais (linear, quadrático e desvio). Os interceptos e os coeficientes angulares foram obtidos utilizando a opção “estimate” do procedimento MIXED. Adicionalmente, utilizou-se a correlação linear de *Pearson* entre os resultados de estabilidade térmica do leite e ao etanol. Para todas as análises estatísticas, significância foi declarada quando $P \leq 0,05$ e tendência quando $P \leq 0,10$.

3.3 RESULTADOS

No presente estudo, o CMS foi elevado de forma quadrática de acordo com o aumento do BCAD. De acordo com a equação [$Y = 22,63$ (EP = 0,94) + $0,0185$ (EP = 0,0032) \times BCAD (mEq/kg de MS) – $0,00008$ (EP = 0,000013) \times BCAD² (mEq/kg de MS²)], o ponto de máximo CMS foi obtido com o BCAD de 115,62 mEq/kg de MS, cujo CMS estimado foi de 23,70 kg de MS/vaca/dia. De forma semelhante, o consumo de nutrientes também foi elevado de forma quadrática de acordo com o aumento do BCAD (Tabela 4). O máximo consumo de nutrientes foi observado com BCAD entre 100 e 150 mEq/kg de MS, sendo que o ponto de consumo máximo de PB e de FDN foi obtido com o BCAD de 125 e 118,33 mEq/kg de MS, respectivamente.

Tabela 4 - Efeito do balanço cátion-aniônico da dieta de vacas leiteiras sobre o consumo de matéria seca e de nutrientes

Consumo	Balanço Cátion-Aniônico da Dieta mEq/kg de MS				EPM ¹	P ²		
	-71	98	192	290		L	Q	D
	kg/vaca/dia							
CMS	20,96	23,44	23,53	21,17	0,380	0,227	<0,0001	0,326
CMS, %PV	3,41	3,82	3,85	3,45	0,06	0,215	<0,0001	0,255
CMO	19,38	21,69	21,91	19,62	0,36	0,181	<0,0001	0,228
CPB	3,16	3,49	3,50	3,19	0,054	0,332	<0,0001	0,421
CEE	0,60	0,67	0,68	0,63	0,01	0,015	<0,0001	0,572
CFDN	7,62	8,55	8,61	7,64	0,15	0,304	<0,0001	0,237
CFDN, %PV	1,21	1,36	1,37	1,22	0,02	0,300	<0,0001	0,239
CCa	0,117	0,130	0,131	0,118	0,002	0,333	<0,0001	0,407
CP	0,094	0,105	0,105	0,094	0,002	0,459	<0,0001	0,338
CNa	0,062	0,098	0,107	0,084	0,003	<0,0001	<0,0001	0,002
CK	0,214	0,235	0,247	0,216	0,004	0,123	<0,0001	0,011
CCI	0,074	0,110	0,110	0,018	0,005	<0,0001	<0,0001	<0,0001
CS	0,112	0,080	0,052	0,046	0,003	<0,0001	0,0029	<0,0001

MS, %PV = Consumo de matéria seca em % do peso vivo (PV); FDN, %PV = Consumo de FDN em % do PV.

¹EPM = Erro padrão da média; ²L = Probabilidade para efeito linear, Q = Probabilidade para efeito quadrático, D = Probabilidade para efeito de desvio.

Alterações do CMS e do estado metabólico das vacas leiteiras podem alterar a produção e a composição do leite. No presente estudo, a produção de leite (PL) e a produção de leite corrigida para 3,5% de gordura (PLC) foram elevadas de forma quadrática e linear, respectivamente, de acordo com o aumento do BCAD. O ponto de máxima produção de leite (22,35 kg/vaca/dia) foi obtido com o BCAD de 171,67 mEq/kg de MS ($Y = 21,47 (EP = 1,22) + 0,0103 (EP = 0,0038) \times \text{BCAD (mEq/kg de MS)} - 0,00003 (EP = 0,000012) \times \text{BCAD}^2$ (mEq/kg de MS²). Ao elevar o BCAD de -71 para 290 mEq/kg de MS, a PLC aumentou em 2,9 kg/vaca/dia [$Y = 22,23 (EP = 1,19) + 0,008798 (EP = 0,0016) \times \text{BCAD (mEq/kg de MS)}$]. De modo contrário, a eficiência produtiva (EP) foi reduzida de forma quadrática de acordo com o aumento do BCAD (Tabela 5). A menor eficiência produtiva foi observada com o BCAD de 111,98 mEq/kg de MS, próximo ao ponto de máximo CMS (BCAD de 115,62 mEq/kg de MS).

Tabela 5 - Efeito do balanço cátion-aniônico da dieta de vacas leiteiras sobre a produção de leite e a eficiência produtiva

Variável	Balanço Cátion-Aniônico da Dieta mEq/kg de MS				EPM ¹	P ²		
	-71	98	192	290		L	Q	D
	PL, kg/vaca/dia	20,71	22,17	22,66		22,05	0,590	0,004
PLC, kg/vaca/dia	21,42	23,32	24,49	24,32	0,610	<0,0001	0,127	0,367
Peso vivo, kg	617	617,50	620,44	615,94	57,54	0,977	0,646	0,581
EP* (PL/CMS)	1,038	0,977	0,991	1,034	0,034	0,675	0,004	0,911

¹EPM = Erro padrão da média; ²L = Probabilidade para efeito linear, Q = Probabilidade para efeito quadrático, D = Probabilidade para efeito de desvio. *EP = Eficiência produtiva.

As concentrações lácteas de gordura, lactose, sólidos totais e de NUL foram elevadas linearmente de acordo com o aumento do BCAD; enquanto que a concentração de extrato seco desengordurado (ESD) foi elevada de forma quadrática. De acordo com o aumento do BCAD de -71 para 290 mEq/kg de MS, o teor de gordura do leite foi elevado em 8,71% [$Y = 3,82 (EP = 0,15) + 0,0008 (EP = 0,0003) \times \text{BCAD (mEq/kg de MS)}$]. Contrariamente, os teores lácteos de PB e de caseína foram reduzidos linearmente de acordo com o aumento do BCAD. Em consequência dos efeitos do BCAD sobre a produção e a composição do leite, as produções diárias dos componentes lácteos também foram modificadas pelos níveis de BCAD estudados. O aumento do BCAD elevou linearmente a produção de gordura e, de forma quadrática, as produções de PB, caseína, lactose, ESD e sólidos totais (ST) (Tabela 6). Como resposta ao aumento da produção de leite, o ponto de máxima produção diária de ST foi alcançada com o BCAD de 170,21 mEq/kg de MS/vaca/dia. Entretanto, o ponto de máxima produção de PB e de caseína foi alcançado com BCAD de 118,57 e 130 mEq/kg de MS, respectivamente.

Tabela 6 - Efeito do balanço cátion-aniônico da dieta de vacas leiteiras sobre a composição físico-química do leite

Componente	Balanço Cátion-Aniônico da Dieta mEq/kg de MS				EPM ¹	P ²		
	-71	98	192	290		L	Q	D
	g/100g							
Gordura	3,76	3,86	4,00	4,09	0,07	0,001	0,661	0,644
PB	3,31	3,25	3,26	3,15	0,05	0,004	0,352	0,219
Caseína	2,45	2,39	2,42	2,34	0,04	0,039	0,586	0,177
PCAS, % da PB	73,95	73,73	74,14	73,30	0,37	0,242	0,296	0,121
NUL, mg/dL	17,71	19,07	18,90	21,43	0,52	0,002	0,264	0,241
Lactose	4,32	4,39	4,42	4,43	0,05	<0,0001	0,340	0,902
ESD	8,55	8,58	8,64	8,53	0,06	0,909	0,182	0,191
ST	12,32	12,44	12,64	12,64	0,12	0,005	0,857	0,313
	kg/vaca/dia							
Gordura	0,76	0,84	0,88	0,87	0,02	0,0003	0,095	0,434
PB	0,66	0,69	0,72	0,66	0,01	0,509	0,017	0,213
Caseína	0,49	0,51	0,53	0,48	0,01	0,612	0,008	0,120
Lactose	0,89	0,97	0,99	0,97	0,03	0,0007	0,001	0,514
ESD	1,73	1,88	1,91	1,82	0,04	0,011	0,002	0,455
ST	2,51	2,72	2,80	2,69	0,06	0,002	0,008	0,396

¹EPM = Erro padrão da média; ²L = Probabilidade para efeito linear, Q = Probabilidade para efeito quadrático, D = Probabilidade para efeito de desvio.

No presente estudo, não houve efeito do BCAD sobre as concentrações de α (s_1 e s_2) e β -caseína, e α -lactalbumina. No entanto, o teor de κ -caseína no leite foi elevado linearmente de acordo com o aumento do BCAD, enquanto que o teor lácteo de β -lactoglobulina foi reduzido de forma linear. Portanto, quando o BCAD foi aumentado de -71 para 290 mEq/kg de MS, o teor de κ -caseína no leite foi reduzido em 7,69% e o de β -lactoglobulina elevado em 17,14%. No entanto, ao analisar as proporções de cada proteína do leite em relação à concentração total de PB, a concentração de κ -caseína/PB apresentou apenas tendência ($P = 0,089$) em ser reduzida de forma linear de acordo com o aumento do BCAD; enquanto que a concentração de β -lactoglobulina do leite foi elevada linearmente em 0,79 g/100g PB ao elevar o BCAD de -71 para 290 mEq/kg de MS (Tabela 7).

Tabela 7 - Efeito do balanço cátion-aniônico da dieta de vacas leiteiras sobre as subunidades de caseína e as proteínas do soro

Proteína	Balanço Cátion-Aniônico da Dieta mEq/kg de MS				EPM ¹	P ²		
	-71	98	192	290		L	Q	D
	mg/mL de leite							
α_{S1} -CN	6,38	6,36	6,52	6,17	0,12	0,404	0,165	0,118
α_{S2} -CN	1,58	1,58	1,62	1,53	0,029	0,455	0,167	0,113
β -CN	7,34	7,29	7,38	7,10	0,19	0,423	0,482	0,449
κ -CN	5,07	4,96	4,95	4,68	0,15	0,031	0,361	0,478
β -LG	1,40	1,53	1,55	1,64	0,07	0,002	0,951	0,580
α -LA	0,84	0,76	0,74	0,77	0,05	0,115	0,172	0,815
	g/100g de PB							
α_{S1} -CN	19,58	19,96	20,35	19,90	0,34	0,274	0,281	0,419
α_{S2} -CN	4,90	4,99	5,04	4,97	0,08	0,376	0,392	0,716
β -CN	22,63	22,88	23,38	23,06	0,60	0,325	0,660	0,517
κ -CN	15,19	14,39	14,47	14,20	0,30	0,089	0,568	0,642
β -LG	4,39	4,57	4,61	5,18	0,27	0,006	0,164	0,402
α -LA	2,55	2,40	2,27	2,46	0,16	0,360	0,210	0,410

PB = proteína bruta; CN = caseína; LG = lactoglobulina; LA = lactalbumina.

¹EPM = Erro padrão da média; ²L = Probabilidade para efeito linear, Q = Probabilidade para efeito quadrático, D = Probabilidade para efeito de desvio.

Mudanças no equilíbrio ácido-base do sangue podem alterar a composição mineral do leite e o equilíbrio iônico entre as micelas de caseína. No presente estudo, as concentrações de cálcio iônico (Cai) e de cloretos no leite reduziram de forma quadrática e linear, respectivamente, de acordo com o aumento do BCAD. O ponto de menor concentração de Cai no leite foi obtido com o BCAD de +169 mEq/kg de MS. Adicionalmente, o aumento do BCAD tendeu (P = 0,070) a reduzir linearmente a concentração de K e, de forma quadrática (P = 0,096), a concentração do Na no leite. No entanto, neste estudo a produção individual diária de P, Na, K e Cl do leite não foram alteradas pelo BCAD (Tabela 8).

Tabela 8 - Efeito do balanço cátion-aniônico da dieta de vacas leiteiras em lactação sobre a composição e secreção de minerais no leite

Mineral	Balanço Cátion-Aniônico da Dieta mEq/kg de MS				EPM ¹	P ²		
	-71	98	192	290		L	Q	D
	mg/L							
Cai	92,34	80,10	78,61	82,17	1,984	0,002	0,009	0,914
	g/100 g							
K	0,101	0,101	0,095	0,092	0,003	0,070	0,544	0,478
Na	0,074	0,070	0,069	0,074	0,002	0,757	0,096	0,599
Cl	0,130	0,116	0,118	0,117	0,003	0,014	0,101	0,319
P	0,074	0,076	0,077	0,073	0,001	0,977	0,137	0,456
	kg/vaca/dia							
K	0,020	0,024	0,022	0,020	0,001	0,942	0,080	0,452
Na	0,015	0,015	0,015	0,016	0,0004	0,327	0,770	0,646
Cl	0,026	0,026	0,027	0,025	0,0008	0,770	0,326	0,231
P	0,017	0,016	0,017	0,016	0,0006	0,337	0,517	0,084

¹EPM = Erro padrão da média; ²L = Probabilidade para efeito linear, Q = Probabilidade para efeito quadrático, D = Probabilidade para efeito de desvio.

As concentrações lácteas de Cai, subunidades de caseína e proteínas do soro podem determinar a resistência das caseínas em formar coágulos. No presente estudo, a estabilidade do leite ao etanol e ao aquecimento a 140° C aumentou linearmente de acordo com o BCAD (Tabela 9). Ao elevar o BCAD, de -71 para 290 mEq/kg de MS, a resistência do leite em formar coágulos durante o aquecimento térmico a 140° C aumentou em 4,77 minutos. De forma semelhante, ao elevar o BCAD de -71 para 290 mEq/kg de MS a concentração de etanol na mistura alcoólica necessária para provocar coagulação do leite foi elevada em 4,6% GL (Figura 5). Já as variáveis crioscopia e pH do leite não foram alteradas pelo BCAD. No presente estudo, a correlação observada entre a estabilidade térmica e a estabilidade ao etanol foi significativa (P = 0,01), porém apresentou apenas média correlação positiva (r = + 0,45).

Tabela 9 - Efeito do balanço cátion-aniônico da dieta de vacas leiteiras em lactação sobre a composição e a estabilidade do leite ao etanol e ao aquecimento a 140° C

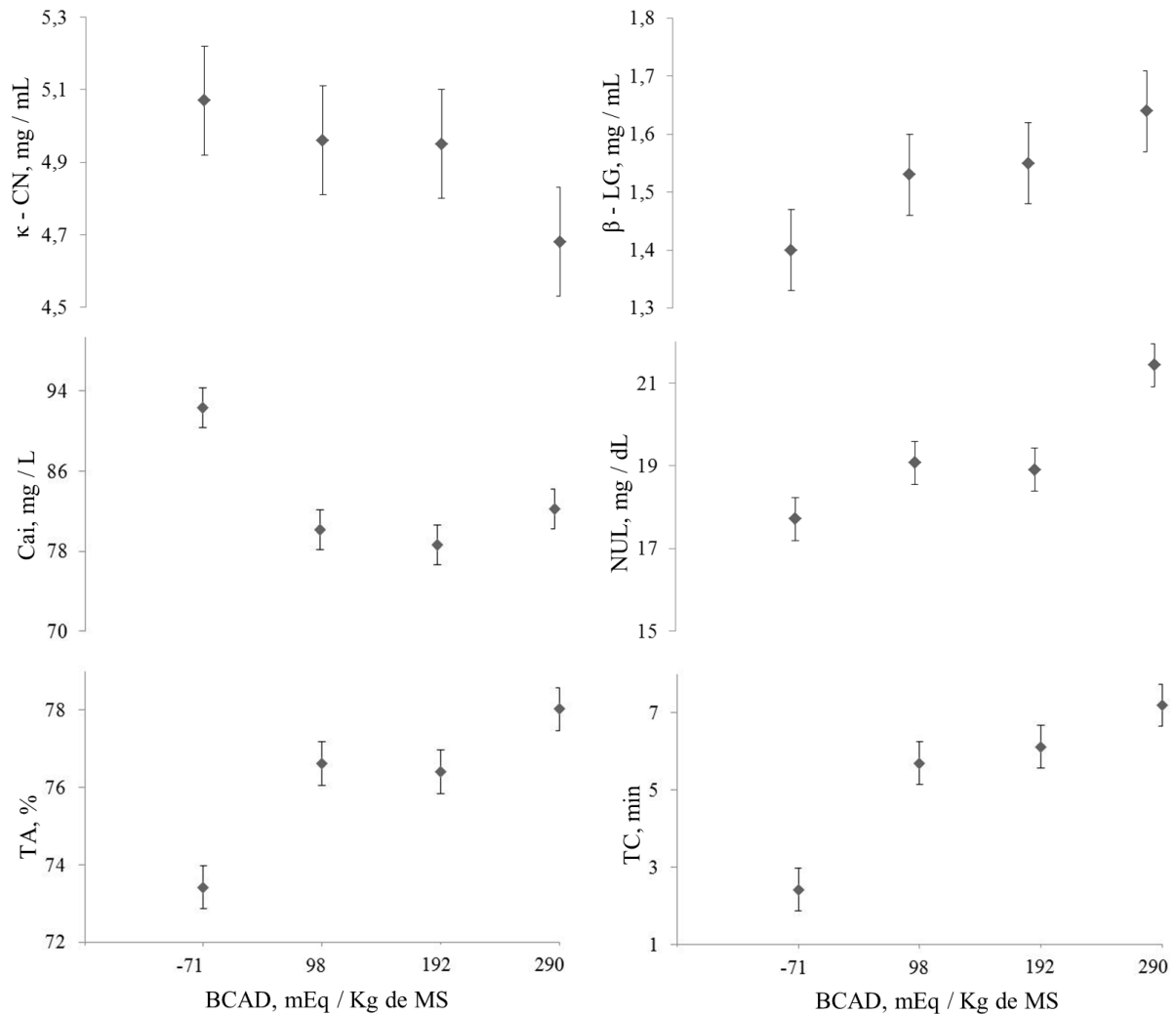
Variável	Balanço Cátion-Aniônico da Dieta mEq/kg de MS				EPM ¹	P ²		
	-71	98	192	290		L	Q	D
TA (% v/v)*	73,42	76,61	76,40	78,02	0,56	<0,0001	0,468	0,251
TC (min)*	2,42	5,69	6,12	7,19	0,55	0,0005	0,403	0,628
pH	6,73	6,75	6,70	6,80	0,02	0,13	0,08	0,06
Crioscopia, °C	-0,535	-0,537	-0,539	-0,533	0,002	0,880	0,066	0,385

TA = Teste do álcool (concentração de etanol mínima na solução alcoólica necessária para ocorrer coagulação);
TC= Tempo de coagulação (tempo necessário para coagulação do leite a 140° C).

¹EPM = Erro padrão da média; ²L = Probabilidade para efeito linear, Q = Probabilidade para efeito quadrático, D = Probabilidade para efeito de desvio.

*Correlação entre TA e TC: $r = +0,45$ ($P < 0,01$).

Figura 5 - Efeito do balanço cátion-aniônico da dieta (BCAD, mEq/kg de MS) sobre a composição e a estabilidade do leite



κ-CN - concentração de κ - caseína do leite: $Y = 5,02 (EP = 0,30) - 0,00098 (EP = 0,0004) \times BCAD (mEq/kg \text{ de MS})$; β-LG - concentração de β - Lactoglobulina do leite: $Y = 1,46 (EP = 0,15) + 0,00065 (EP = 0,0002) \times BCAD (mEq/kg \text{ MD})$; Cai - concentração de cálcio iônico do leite: $Y = 85,78 (EP = 4,98) - 0,08 (EP = 0,01) \times BCAD (mEq/kg \text{ de MS}) + 0,000237 (EP = 0,00008) \times BCAD^2 (mEq/kg \text{ MS}^2)$; NUL - concentração de nitrogênio ureico do leite: $Y = 18,22 (EP = 1,36) + 0,0094 (EP = 0,0026) \times BCAD (mEq/kg \text{ de MS})$; TA - Teste do álcool (nível de etanol na solução alcoólica necessária para provocar coagulação do leite): $Y = 74,87 (EP = 0,87) + 0,01174 (EP = 0,0025) \times BCAD (mEq/kg \text{ de MS})$; TC - Tempo de coagulação (tempo necessário para coagular o leite durante o aquecimento a 140° C): $Y = 3,95 (EP = 1,02) + 0,01234 (EP = 0,0032) \times BCAD (mEq/kg \text{ de MS})$.

3.4 DISCUSSÃO

O aumento da concentração de iCa do leite altera o equilíbrio iônico entre as subunidades de caseína (BARROS et al., 1999) e pode potencializar a reatividade da β-LG com a κ-CN na micela (HOLT et al., 2013), fatores estes que podem reduzir a estabilidade do

leite durante o tratamento térmico industrial. No presente estudo, as concentrações lácteas de Cai e de κ -CN foram elevadas com a redução do BCAD. De forma contrária, com a redução do BCAD as concentrações lácteas de β -LG e de MUN foram diminuídas. Como resultado destas alterações, a estabilidade do leite ao etanol e ao aquecimento a 140° C foi reduzida linearmente. O aumento da concentração de Cai associado com a redução da concentração de NUL pode reduzir às cargas negativas das micelas, e, conseqüentemente, a força de repulsão eletrostática entre elas (BARROS et al., 1999), o que, no presente estudo, pode ter facilitado a coagulação do leite durante a reação com o etanol e ao aquecimento térmico. Adicionalmente, o aumento da concentração de Cai no leite pode ter potencializado a reatividade da β -LG com a κ -CN na micela, o que pode contribuir para a formação de complexos proteicos entre estas proteínas e, conseqüentemente, a redução da estabilidade da micela de caseína (HAMBLING; MCALPINE; SAWYER, 1992; HOLT et al., 2013). Portanto, o aumento do BCAD pode contribuir para evitar a acidificação do sangue, e manter o leite estável ao etanol e aos processamentos industriais durante a fabricação dos derivados lácteos.

3.4.1 Consumo de matéria seca e de nutrientes.

No presente estudo, o CMS e o consumo de nutrientes foram elevados de forma quadrática com o aumento do BCAD ($P < 0,0001$). Resultados semelhantes foram relatados por Hu e Murphy (2004), que ao conduzirem uma meta-análise observaram que o aumento do BCAD elevou de forma quadrática o CMS das vacas leiteiras (consumo máximo observado com BCAD de 395,52 mEq/kg de MS). Delaquis e Block (1995) ao estudarem vacas em estágio médio de lactação relataram aumento de CMS de 15,6 para 17,0 kg/vaca/dia quando o BCAD aumentou de 140,2 para 372,7 mEq/kg de MS. O menor CMS observado com a redução do BCAD, especialmente em dietas com BCAD negativo, pode estar associado à adição de sais aniônicos, como o sulfato de amônia utilizado no presente estudo. Os sais aniônicos (geralmente fontes de cloretos e enxofre) apresentam baixa aceitabilidade pelas vacas e, por este motivo, podem reduzir o CMS (WEST; MULLINIX; SANDIFER, 1991; WEST et al., 1992). O CMS também pode ser diminuído com a redução do BCAD como resposta a acidose metabólica, por meio da redução das concentrações séricas de bicarbonato (HUBER, 1976). Adicionalmente, alterações na atividade microbiana ruminal em razão da

redução do BCAD também foram associadas com a diminuição do CMS. Para reduzir o BCAD, a substituição de bicarbonato de sódio por sais aniônicos pode reduzir o pH ruminal (conforme apresentado no Capítulo 2 – Tabela 10), o que pode diminuir as condições ótimas para atividade de bactérias celulolíticas e reduzir a digestibilidade aparente total da FDN (Capítulo 2 - Tabela 11), a taxa de passagem do trato gastrointestinal (SHARIF et al., 2010) e, conseqüentemente, o CMS.

Alterações no CMS, na fermentação ruminal e no equilíbrio iônico sanguíneo são fatores que podem afetar diretamente o fluxo de nutrientes para a glândula mamária e, conseqüentemente, a produção de leite (HU; MURPHY, 2004; SHARIF et al., 2010). No presente estudo, a produção de leite foi elevada de forma quadrática de acordo com o aumento do BCAD. De forma similar, Hu e Murphy (2004) também relataram que o aumento no BCAD elevou de forma quadrática a produção de leite, e descreveram que o BCAD de 490 mEq/kg de MS foi o teor ótimo para produção de leite corrigida (4% de gordura). Resultados semelhantes foram descritos por West, Mullinix e Sandifer (1991) e Delaquis e block (1995), os quais relataram associação positiva entre a produção de leite e o BCAD. O aumento de produção de leite de acordo com o aumento do BCAD pode ser resultado do maior consumo de matéria seca e de nutrientes. Em resposta ao aumento de consumo, a disponibilidade de nutrientes para fermentação ruminal e a absorção intestinal podem ser aumentadas, o que pode resultar em maior fluxo de nutrientes para a glândula mamária para serem utilizados na síntese de leite. Adicionalmente, com o aumento do BCAD os ácidos disponíveis na corrente sanguínea podem ser neutralizados por meio do aumento da concentração de HCO_3 circulante, o que facilita a entrada de glicose nas células devido à maior atividade de insulina. Com a maior entrada de glicose nas células, a síntese de lactose na glândula mamária pode ser elevada, o que pode contribuir para o aumento da produção de leite por meio da pressão osmótica exercida pela lactose durante a síntese de leite (BLOCK, 1994; HU; MURPHY, 2004; SHARIF et al., 2010).

3.4.2 Composição e estabilidade do leite

A gordura é um importante componente do leite para o rendimento industrial durante a produção de derivados lácteos, e pode variar de acordo com a dieta, especialmente quando

ocorrem alterações da atividade microbiana no rúmen. No presente estudo, o teor de gordura do leite foi elevado linearmente de acordo com o aumento do BCAD. Resultados similares foram relatados por West, Mullinix e Sandifer (1991); Delaquis e Block (1995) e Apper-Bossard et al. (2010), os quais também observaram maior teor de gordura no leite com aumento no BCAD. Este resultado pode ser atribuído à inclusão de tamponante (bicarbonato de sódio) na dieta com o intuito de elevar o BCAD, o que pode aumentar o pH ruminal (Capítulo 2 – Tabela 10) e manter estável a atividade microbiana, principalmente das bactérias celulolíticas que apresentam crescimento ótimo em pH próximo a neutralidade (ALLEN, 1997). Desta forma, com condições adequadas para atividade da microbiota ruminal, o processo de biohidrogenação dos ácidos graxos insaturados pode ser mais acentuado do que quando o pH ruminal está reduzido, diminuindo a formação de ácidos graxos intermediários *Trans*, os quais estão negativamente associados a síntese de gordura na glândula mamária (BAUMAN; GRINARII, 2003).

A lactose é um importante osmorregulador da produção de leite, e a concentração de lactose no leite é pouco influenciada por fatores nutricionais quando comparado a demais componentes lácteos, como a gordura e a proteína. Em nosso estudo, o teor de lactose do leite foi aumentado de forma linear em resposta ao aumento do BCAD. Resultados similares foram observados por Hu et al. (2007), que relataram que a concentração de lactose do leite foi elevada linearmente de acordo com o aumento no BCAD. O aumento do teor de lactose do leite decorrente do aumento do BCAD pode estar associado ao maior CMS, e à maior disponibilidade de glicose na glândula mamária, uma vez que ao reduzir o BCAD, a disponibilidade de ácidos na corrente sanguínea pode ser aumentada devido ao consumo elevado de ânions, o que pode dificultar a atividade da insulina e a entrada de glicose nas células (BLOCK, 1994).

Como resultado do aumento do teor de gordura e de lactose do leite, o teor de sólidos totais foi elevado linearmente de acordo com o aumento do BCAD. Entretanto, o teor de ESD no leite não foi alterado pelas dietas. Este resultado pode ser decorrente do efeito negativo do aumento do BCAD sobre o teor de proteína, compensado pelo aumento do teor de lactose do leite, o que resultou em ausência de efeito do BCAD sobre o teor de ESD do leite. A redução no teor de PB do leite em resposta ao aumento do BCAD provavelmente ocorreu pela redução linear do teor de caseína no leite. Estes resultados diferem dos relatados por Hu et al. (2007), que observaram aumento no teor de proteína do leite ao avaliar os BCADs de 30, 220, e 470

mEq/kg de MS. De outra forma, Hu e Murphy (2004) não observaram efeito do BCAD sobre o teor de proteína bruta do leite.

A composição mineral do leite é relativamente constante, mas pode sofrer variações de acordo com o estado metabólico das vacas leiteiras. No presente estudo, o BCAD não alterou a concentração de Na e K do leite. No entanto, a concentração de cloretos do leite foi elevada linearmente com a redução do BCAD. O aumento da concentração de cloretos no leite pode ter ocorrido em resposta à acidificação do sangue resultante da redução do BCAD (Capítulo 2 – Tabela 12), uma vez que para compensar a acidose, ocorrem mecanismos compensatórios de aumento da excreção de ânions pelos fluídos corporais, como leite e urina (BLOCK, 1994). A concentração de Cai no leite também foi elevada com a redução do BCAD. Este resultado possivelmente ocorreu por meio de mecanismos controlados por hormônios, como o da paratireóide (PTH), a calcitonina (CT) e o 1,25 dihidroxicolicalciferol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), que podem alterar a absorção intestinal, reabsorção óssea e excreção renal do cálcio com o objetivo de aumentar a concentração deste mineral no sangue em tentativa de compensar a acidose metabólica (BLOCK, 1994; MARQUES et al., 2011). Como resultado deste aumento de Cai no sangue (Capítulo 2 - Tabela 12), a concentração de Cai no leite pode ser elevada com a acidose metabólica (MARQUES et al., 2011).

O cálcio pode estar presente no leite em sua fase coloidal (ligado às micelas de caseínas) ou na fase solúvel, e o equilíbrio iônico entre essas duas fases e com os demais minerais do leite é importante para manter a estabilidade da micela de caseína. No presente estudo, em resposta ao aumento da concentração de cálcio iônico do leite, por meio da acidose metabólica resultante da redução do BCAD, a estabilidade do leite ao etanol e a estabilidade térmica foram reduzidas linearmente. Este resultado indica que a ocorrência de distúrbios metabólicos, como a acidificação do sangue, pode afetar diretamente a estabilidade das proteínas do leite. Desta forma, o aumento do BCAD pode contribuir para evitar a queda do pH sanguíneo, reduzir a concentração láctea de Cai e, conseqüentemente, manter o leite estável a reação com o etanol e ao processamento industrial. Resultado semelhante foi relatado por Marques et al. (2011), que observaram redução da estabilidade com o aumento da concentração de cálcio iônico no leite. Segundo Barros et al. (1999), com o aumento da concentração de cálcio iônico no leite ocorre redução de cargas negativas das micelas e a força de repulsão eletrostática entre elas, o que pode reduzir a estabilidade do leite ao etanol e/ou ao aquecimento térmico.

Além de alterar o equilíbrio iônico entre as subunidades de caseína, o aumento da concentração de Cai do leite pode alterar o comportamento da β -LG e da κ -CN na micela. No presente estudo, a concentração de κ -CN do leite foi elevada linearmente com a redução do BCAD. Resultado semelhante foi descrito por Marques et al. (2011), que observaram tendência ($P= 0,09$) de aumento no teor de κ -CN do leite de vacas alimentadas com dieta aniônica, em comparação com o leite das vacas alimentadas com dieta catiônica. De outra forma, no presente estudo, com a redução do BCAD, a concentração de β -LG no leite foi diminuída linearmente. Estas alterações da concentração láctea de β -LG e κ -CN indicam que estejam ocorrendo interações entre estas proteínas. De acordo com Singh e Fox (1987), a intensidade de interações entre a β -LG e a κ -CN na micela depende da concentração de cálcio livre no leite, e segundo Hambling; Mcalpine e Sawyer (1992), a interação entre a κ -CN e a β -LG desestabiliza estas proteínas. Portanto, o aumento da concentração láctea de Cai decorrente da acidificação sanguínea pode alterar o equilíbrio iônico entre as micelas de caseína e, adicionalmente, potencializar a reatividade da β -LG com a κ -CN na micela, reduzindo a estabilidade do leite ao teste do álcool e ao tratamento térmico.

Além das concentrações e das interações de cálcio iônico, β -LG e κ -CN no leite, demais fatores, como a concentração de NUL, podem contribuir para alterar a estabilidade do leite. No presente estudo, a concentração de nitrogênio ureico no leite foi diminuída de acordo com a redução do BCAD, o que pode ter contribuído para reduzir a estabilidade do leite. O nitrogênio ureico do leite pode inibir a formação de ácidos e atuar sobre os grupos tiol das proteínas. Adicionalmente, a ureia pode ser convertida em cianeto, que contrariamente ao cálcio, reage com a proteína do leite e aumenta às cargas negativas das micelas, o que aumenta a força de repulsão entre elas, e, conseqüentemente, a estabilidade do leite (SWEETSUR; MUIR, 1981).

A acidose metabólica em vacas leiteiras pode ocorrer em decorrência da redução do BCAD ou resultante da acidose ruminal e/ou da elevada taxa metabólica de vacas leiteiras. Desta forma, dietas com elevado teor de carboidratos não fibrosos e/ou baixo teor de FDNe também podem contribuir para a ocorrência de leite de baixa estabilidade, uma vez que a acidose ruminal pode resultar em acidose metabólica (FISHER et al., 2012). Por outro lado, conforme descrito por Barbosa et al. (2012), a deficiência de nutrientes dietéticos também pode reduzir a estabilidade do leite. De forma semelhante, Stumpf et al. (2013) relataram que a deficiência de nutrientes pode aumentar o espaço intercelular (“junções firmes”) do epitélio mamário, o que pode aumentar a passagem de íons para o leite e reduzir a estabilidade das

proteínas (FISHER 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 FDN e/ou uso de tamponantes e/ou alcalinizantes na dieta das vacas leiteiras devem ser considerados para evitar distúrbios digestivos e metabólicos. Adicionalmente, os resultados do presente estudo indicam que o aumento do BCAD pode elevar o pH sanguíneo, o que pode contribuir para prevenir a acidificação do sangue (Capítulo 2 – Tabela 12), reduzir a concentração láctea de cátions bivalentes, e manter o leite estável ao etanol e ao tratamento térmico.

Além do balanceamento adequado da dieta, alterações de ingredientes volumosos e/ou concentrados e/ou de suplementos minerais sem adaptação prévia também devem ser evitadas para prevenir problemas digestivos (FISHER et al., 2012), reduções no BCAD, e, conseqüentemente, problemas de leite instável não ácido. A baixa estabilidade do leite é um problema principalmente para as indústrias que utilizam processamentos térmicos intensos, como a produção de leite longa vida processado por ultra alta temperatura (UAT) e leite em pó. No Brasil, os principais derivados lácteos exportados são: leite UAT, leite em pó e leite condensado (BRASIL, 2014), e, desta forma, a instabilidade do leite causa grandes prejuízos à cadeia agroindustrial do leite (FISHER et al., 2012). A ocorrência de leite instável sem acidez adquirida por contaminação microbiana foi relatada em vários estados do Brasil (MARQUES et al., 2007; BOTARO et al., 2009; ZANELA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2013) e demais países que utilizam a estabilidade ao etanol como um parâmetro de qualidade do leite (BARROS et al., 1999; MOLINA et al., 2001; NEGRI et al., 2003; CHAVEZ et al., 2004). No Brasil, Marques et al. (2007) relataram que, durante o período de avaliação de 17 meses, 58% das amostras avaliadas foram instáveis a reação com o etanol (76% v/v de etanol na mistura alcoólica), porém sem acidez adquirida (acidez titulável média de 15,81° D).

A baixa estabilidade do leite causa prejuízos ao produtor, que pode receber uma penalização no pagamento; para a indústria, que não pode utilizar este leite de baixa estabilidade para a produção de derivados lácteos, como o UAT e o leite em pó; e para o consumidor, uma vez que o leite de baixa estabilidade quando submetidos a processos industriais de aquecimento, congelamento e secagem podem ter um tempo de prateleira reduzido, pois o tratamento do leite por UAT pode contribuir para a irreversível formação de gel resultante da coagulação de caseínas durante o período de estocagem (MCMAHON, 1996; HOLT et al., 2013). McMahon (1996) observaram por micrografia eletrônica que as micelas

de caseínas de algumas amostras de leite UAT apresentaram protuberâncias, pontas ou tentáculos que representam complexos proteicos formados pelas interações da β -LG com a κ -CN na micela. Segundo McMahon (1996), durante o armazenamento do leite UHT em temperatura ambiente, o tamanho das micelas de caseína também aumentaram, e algumas teorias foram propostas para explicar a gelificação das caseínas, como proteólise, alterações físico-químicas, e, inclusive, a formação de complexos proteicos entre a β -LG e a κ -CN que se formam e subsequentemente se dissociam da micela de caseína. Desta forma, a acidose metabólica em vacas leiteiras em lactação pode aumentar a formação de gel durante o armazenamento do leite UHT, já que o aumento da concentração de Cai do leite pode potencializar a interação da β -LG com a κ -CN e, posteriormente, a dissociação deste complexo da micela de caseína.

No presente estudo, foi observada média correlação entre a estabilidade do leite ao etanol e ao aquecimento a 140° C ($r = +0,45$; $P = 0,01$). De forma semelhante, Molina et al. (2001); Negri et al. (2001) e Chavez et al. (2004) também relataram baixa ou média correlação entre a estabilidade do leite ao etanol e a demais métodos de avaliação da estabilidade térmica do leite, como o teste da fervura e o tempo de coagulação a 140° C. Adicionalmente, em busca de leite com elevada estabilidade térmica para a crescente produção de derivados lácteos, como o leite UAT e o leite em pó, alguns laticínios aumentam o teor de etanol (de 72 para 78, 80 e até 82%) na solução alcoólica para a seleção de matéria-prima com elevada estabilidade. No entanto, o uso da estabilidade do leite ao etanol para destinar o leite para o processamento térmico mais adequado pode não apresentar resultados satisfatórios, uma vez que o leite que coagula durante a reação com o etanol pode resistir o aquecimento térmico sem formar coágulos, o que apenas aumentaria o descartar de leite e/ou a penalização no preço pago aos produtores pelo leite de "baixa" estabilidade ao etanol (<78 ou até mesmo <82%) (FISHER et al., 2012). Assim, pesquisas são necessárias para estudar e propor métodos acurados e precisos para a estimativa da estabilidade térmica do leite, o que pode melhorar a eficiência da cadeia agroindustrial do leite, uma vez que o leite de baixa estabilidade sem acidez adquirida por contaminação microbiana poderia ser devidamente identificado e destinado a processamentos térmicos menos intensos de aquecimento, como o de pasteurização.

3.5 CONCLUSÃO

As concentrações lácteas de cálcio iônico e de κ -caseína aumentam de acordo com a redução do BCAD; enquanto que as concentrações de NUL e de β -lactoglobulina do leite são reduzidas. Como resultado destas alterações, a estabilidade do leite à reação com o etanol e ao aquecimento a 140° C é diminuída linearmente com a redução do BCAD, devido a alterações no equilíbrio iônico do leite e as interações da β -lactoglobulina com a κ -caseína na micela. Portanto, o controle de alterações metabólicas que ocorrem em vacas leiteiras em lactação para manter o equilíbrio iônico sanguíneo é um importante fator para manter o leite estável à reação com o etanol e ao aquecimento térmico.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, M. S. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 7, p. 1447–1462, 1997.
- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis**. 16. ed. Arlington, VA. Washington (USA): AOAC, 1995.
- APPER-BOSSARD, E.; FAVERDIN, P.; MESCHY, F.; PEYRAUD, J.L. Effects of dietary cation-anion difference on ruminal metabolism and blood acid-base regulation in dairy cows receiving 2 contrasting levels of concentrate in diets. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 4196–4210, 2010.
- BARBOSA, R. S.; FISHER, 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, n. 2, p. 315, 1999.
- BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Review Nutrition**, v. 23, p. 203-227, 2003.
- 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.
- BLOCK, E. Manipulation of dietary cation-anion difference on nutritionally related production diseases, productivity, and metabolic responses of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 1437-1450, 1994.
- BOBE, G.; BEITZ, D. C.; FREEMAN, A. E.; LINDBERG, L. Separation and quantification of bovine milk proteins by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 46, p. 458-463, 1998.
- BRASIL. Ministério de Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior - MDIC. Secretaria de Comércio Exterior, do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. **Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior – AliceWeb Mercosul**. 2014. Disponível em: <http://aliceweb.mdic.gov.br/>. Acesso em: 20 maio 2014.

- 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.
- 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.
- DeLAQUIS, A. M.; BLOCK, E. The effects of changing ration ingredients on acid-base status, renal function, and macromineral metabolism. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 2024-2039, 1995.
- FISHER, 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.
- FOSS ANALYTICAL. **MilkoScan 6000 FT+**: operator's manual. Dinamarca, 2008.
- HALL, M. B. **Neutral detergent-soluble carbohydrates**. Nutritional relevance and analysis. Gainesville: University of Florida, 2000. 76 p.
- HAMBLING, S. G.; MCALPINE, A. S.; SAWYER, I. **Beta-lactoglobulin**. In: FOX, P. F. (Ed). **Advanced dairy chemistry**. London: Elsevier Applied Science, 1992. v. 1, p. 141-189.
- 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.
- HU, W.; MURPHY, M. R. Dietary cation-anion difference effects on performance and acid-base status of lactating dairy cows. A Meta-Analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 7, p. 2222-2229, 2004.
- HU, W.; MURPHY, M. R.; CONSTABLE, P. D.; BLOCK, E. Dietary cation-anion difference and dietary protein effects on performance and acid-base status of dairy cows in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 7, p. 3355–3366, 2007.
- LEWIS, M. J. The measurement and significance of ionic calcium in milk – review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, n. 1, p. 1-13, 2011.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. Assessment of Nutritional Status of Plants: Principles and Applications. 2th ed. **Brazilian Association for Research Potash and Phosphate**. Piracicaba, Brazil. 1997.
- 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 álcool 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.

McMAHON, D. J. **Age-gelation of UHT milks**: changes that occur on storage, their effect on shelf life and the mechanism by which age-gelation occurs. Brussels, Belgium: Heat Treatments and Alternative Methods. International Dairy Federation, 1996. p. 315–326

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.

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.

NEGRI, L.; CHAVEZ, M.; TAVERNA, M.; CUATRÍN, 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**, v. 22, p. 33-44, 2003.

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

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.

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.

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

SHARIF, M.; SHAHZAD, M. A.; MAHR-un-NISA; SARWAR, M. Dietary cation anion difference: Impact on productive and reproductive performance in animal agriculture. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 47, p. 7976-7988, 2010.

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-dependet dissociation of micellar κ -casein. **Journal of Dairy Research**, v. 54, p. 509-521, 1987.

SKLAN, D.; KAIM, M.; MOALLEM, U.; FOLMAN, Y. Effect of dietary calcium soaps on milk yield, bodyweight, reproductive hormones and fertility in first parity and older cows. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 6, p. 1652-1660, 1994.

SOBHANI, S.; VALIZADEH, R.; NASERIAN, A. Alcohol stability of milk and its relation to milk and blood composition in Holstein dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 85, p. 58, 1998. Supplement, 1.

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.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **iCE 3000 series atomic absorption spectrometers**: operators manual. Cambridge: Thermo Fisher Scientific, 2008.

TUCKER, W. B.; HOGUE, J. F.; WATERMAN, D. F.; SWENSON, T. S.; XIN, Z.; HEMKEN, R. W.; JACKSON, J. A.; ADAMS, G. D.; SPICER, L. J.. Role of sulfur and chloride in the dietary cation-anion balance equation for lactating dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v.69, p.1205-1213, 1991.

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.

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

WEST, J. W.; MULLINIX, B. G.; SANDIFER, T. G. Changing dietary electrolyte balance for dairy cows in cool and hot environments. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 3-6, p. 1662-1671, 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, n. 5, p. 835-840, 2006.

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

4 CAPITULO II - EFEITO DO BALANÇO CÁTION-ANIÔNICO DA DIETA SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL, DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL E METABOLISMO SANGUÍNEO E RENAL DE VACAS LEITEIRAS

RESUMO

O presente estudo objetivou avaliar o efeito do balanço cátion-aniônico da dieta sobre a fermentação ruminal, digestibilidade aparente total e metabolismo sanguíneo e renal em vacas leiteiras em lactação. Foram utilizadas 16 vacas da raça Holandês, com 158 ± 52 (Média \pm DP) dias em lactação, distribuídas em 4 quadrados contemporâneos em um delineamento Quadrado Latino 4 x 4, com 4 períodos de 21 dias e 4 tratamentos. Os tratamentos experimentais consistiram de 4 níveis de balanço cátion-aniônico da dieta (BCAD): +290; +192; 98 e -71 mEq/kg de MS. O pH ruminal e as concentrações dos ácidos acético e butírico foram elevadas linearmente de acordo com o aumento do BCAD. De forma semelhante, a digestibilidade aparente total da FDN aumentou linearmente em 6,38% quando o BCAD aumentou de -71 para 290 mEq/kg de MS [$Y = 65,90$ (EP = 2,37) + 0,0167 (EP = 0,0068) \times BCAD (mEq/kg de MS)]. O pH sanguíneo também foi elevado de acordo com o BCAD, o que reduziu as concentrações séricas de Na, K e de cálcio iônico (Cai). Para manter o equilíbrio ácido-base do sangue próximo a homeostasia, o metabolismo renal desempenhou importante papel no controle das concentrações séricas de Na e K, uma vez que a excreção de Na e K na urina aumentou linearmente em 89,69% e 46,06%, respectivamente, quando o BCAD foi elevado de -71 para 290 mEq/kg de MS. As alterações no metabolismo sanguíneo para manter o pH dos fluídos celulares próximo a homeostasia refletiram diretamente na concentração de íons do leite, uma vez que a concentrações de Na, K, Cai e de cloretos do leite reduziram de acordo com o aumento do pH sanguíneo. Desta forma, pode-se concluir que o aumento do BCAD eleva pH do fluído ruminal, aumenta a digestibilidade aparente total da FDN, e reduz a concentração de cátions do leite, o que pode aumentar as cargas negativas das micelas de caseína e contribuir para o aumento da capacidade relativa destas proteínas em suportar o processamento industrial sem sofrer coagulação.

Palavras-chave: Acidose metabólica. Balanço de minerais. Cálcio iônico. Controle renal. Metabolismo do cálcio.

EFFECT OF DIETARY CATION-ANION DIFFERENCE ON RUMINAL FERMENTATION, TOTAL APPARENT DIGESTIBILITY AND BLOOD AND RENAL METABOLISM OF DAIRY COWS

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the effect of dietary cation-anion difference on ruminal fermentation, total apparent digestibility and blood and renal metabolism of lactating dairy cows. Sixteen Holstein cows were distributed in four contemporary 4 x 4 Latin Square designs, which consisted of four periods of 21 days and four treatments according to DCAD: +290; +192; +98 and -71 mEq/kg DM. Ruminal pH and concentrations of acetic and butyric acids were linearly increased according to increases of DCAD. Similarly, the NDF total apparent digestibility linearly increased by 6.38% when DCAD increased from -71 to 290 mEq/kg DM [$Y = 65.90 (SE = 2.37) + 0.0167 (SE = 0.0068) \times DCAD (mEq/kg DM)$]. The blood pH was also increased according to DCAD, which reduced the serum concentrations of Na, K and ionic calcium (iCa). To maintain the blood acid-base status near of homeostasis, renal metabolism played an important role in controlling serum concentrations of Na and K, since the Na and K urinary excretion increased linearly by 89.69 and 46,06%, respectively, when DCAD was increased from -71 to 290 mEq / kg DM. Changes in blood metabolism to maintain the pH of cell fluid near homeostasis directly reflected on the milk concentrations of ions, since the milk concentrations of Na, K, iCa and chlorides reduced according to increases of blood pH. Thus, it can be concluded that the increase of DCAD increases the pH of ruminal fluid, the FDN total apparent digestibility, and decreases the milk concentration of cations, which may increases the negative charges of casein micelles and contribute to increases the relative ability of milk proteins to resist the industrial processing without undergoing coagulation.

Keywords: Metabolic acidosis. Mineral balance. Ionic calcium. Renal control. Calcium metabolism.

4.1 INTRODUÇÃO

Nos sistemas intensivos de produção de leite, as vacas leiteiras podem exigir de 3 a 6 vezes mais energia para a produção de leite do que a utilizada para manutenção, o que demanda elevada capacidade de consumo, digestão, absorção e metabolização dos nutrientes (NRC, 2001). Desta forma, vacas leiteiras em lactação apresentam elevada taxa metabólica, estresse térmico, e consomem quantidade de carboidratos não fibrosos suficiente para a acidificação do fluido ruminal, fatores estes que podem contribuir para a redução do pH sanguíneo e para a ocorrência de distúrbios metabólicos (BLOCK, 1994; FAGNANI; BELOTI; BATTAGLINI, 2014).

O pH dos fluidos biológicos está diretamente associado com as reações bioquímicas essenciais para manutenção da vida (WHEELER, 1980). Fatores como volume, pressão, osmolaridade e interações iônicas estão em constante equilíbrio para manter a homeostase dos fluidos celulares, transcelulares, intersticiais e plasmáticos. Como resultado de alterações no equilíbrio ácido-base do sangue, o desempenho produtivo de vacas leiteiras pode ser reduzido, uma vez que a eficiência de uso da glicose pode ser diminuída devido à menor atividade da insulina em fluidos corporais ácidos. Para manter o equilíbrio ácido-base do sangue de vacas acidóticas, ocorrem mecanismos de compensação metabólica, de modo a elevar a concentração sérica de minerais catiônicos em detrimento aos aniônicos e ao hidrogênio em tentativa de manter o pH dos fluidos biológicos próximo a homeostasia (BLOCK, 1994; ROSS; SPEARS; GARLICH, 1994; JACKSON et al., 2001). Desta forma, o metabolismo renal desempenha importante papel para manutenção do equilíbrio ácido-base do sangue, uma vez que a excreção urinária de ânions e de hidrogênio pode ser elevada, e a de cátions reduzida. Adicionalmente, mediante ação dos hormônios da paratireoide (PTH) e do 1,25 dihidroxicolicalciferol, a concentração séria de cálcio é elevada, pois estes hormônios alteram a absorção intestinal, mobilização óssea e excreção renal deste mineral (BLOCK, 1994).

As alterações da concentração sérica de íons decorrentes da acidificação do sangue podem refletir diretamente na concentração de cátions do leite. Desta forma, estudos prévios demonstraram que além de afetar o desempenho produtivo de vacas leiteiras, as alterações metabólicas também alteram o rendimento de produção dos derivados lácteos, uma vez que podem aumentar a concentração láctea de cátions bivalentes e, conseqüentemente, reduzir a estabilidade térmica das proteínas do leite (MARQUES et al., 2011; FISHER et al., 2012).

Diversos estudos demonstraram que o pH sanguíneo de vacas leiteiras pode ser elevado por meio do aumento do balanço cátion-aniônico da dieta, resultando em aumento do consumo de matéria seca e da produção de leite (HU; MURPHY, 2004; SHARIF et al., 2010). No entanto, poucos estudos avaliaram o efeito do aumento BCAD e, conseqüentemente, de alterações do equilíbrio ácido-base do sangue, sobre a concentração láctea de cátions (MARQUES et al., 2011; FAGNANI; BELOTI; BATTAGLINI, 2014) e sobre a retenção e a eficiência de utilização dos minerais para a produção de leite. Desta forma, o presente estudo objetivou avaliar o efeito do balanço cátion-aniônico da dieta sobre a fermentação ruminal, digestibilidade aparente total, metabolismo renal e sanguíneo, e balanço de minerais em vacas leiteiras em lactação.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 16 vacas da raça Holandesa com 158 ± 52 dias em lactação, peso corporal de 618 ± 57 kg e produção média de $22 \pm 4,5$ kg/dia, as quais foram alojadas em baias individuais (16 m^2), com controle individual de consumo de alimentos e regime de duas ordenhas/dia. As vacas foram distribuídas em delineamento do tipo quadrado latino, com total de 4 quadrados contemporâneos, 4 períodos de 21 dias e 4 tratamentos. Cada período teve duração de 21 dias, sendo que os primeiros 14 foram destinados à adaptação da dieta e os últimos 7 para a coleta de amostras e mensurações das variáveis respostas. Os tratamentos experimentais consistiram de 4 níveis de balanço cátion-aniônico da dieta (BCAD), calculado de acordo com os teores de Na, K, Cl e S dos ingredientes dietéticos (Tabela 3): +290; +192; 98 e -71 mEq/kg de MS. O BCAD foi calculado de acordo com Tucker et al. (1991), pelo uso da seguinte fórmula: $\text{mEq/kg de MS} = [(\% \text{Na na MS}/0,023) + (\% \text{K na MS}/0,039)] - [(\% \text{Cl na MS}/0,0355) + (\% \text{S na MS}/0,016)]$. As dietas foram formuladas para serem isocalóricas (1,58 Mcal/kg) e isoproteicas (160 g/kg de MS), de acordo com as recomendações do NRC (2001). As vacas foram alimentadas em sistema de dieta completa fornecida *ad libitum*, de modo a permitir 5 a 10% de sobras.

4.2.1 Coleta de amostras e análises bromatológicas.

Em cada período experimental foram coletadas amostras individuais de alimentos fornecidos, sobras da dieta e fezes coletadas diretamente do reto de cada vaca, as quais foram armazenadas a -20°C , de modo a compor uma amostra composta por animal de cada período com base no peso seco para realização das análises bromatológicas. Os teores de MS, MM, PB e EE foram determinados de acordo com as metodologias descritas pela AOAC (1995). Os teores de PBIDN, PBIDA, LDA, FDN e FDA foram obtidos conforme técnica desenvolvida por Van Soest et al. (1991). A determinação de FDN foi de acordo com as adaptações descritas por Mertens (2002), usando α -amilase e sem adição de sulfito de sódio. As amostras foram moídas, digeridas a seco e posteriormente solubilizadas para a realização das análises de minerais. Os teores de Ca, P, Na e K foram determinados por espectrofotometria de chama (THERMO FISHER, 2008), e a concentração de cloretos (Cl) pelo método titulométrico de Mohr (AOAC, 1995). A determinação da concentração de S foi obtida por colorimetria (molibdênio azul) segundo metodologia descrita por Malavolta, Vitti e Oliveira (1997). Adicionalmente, os teores de CNF foram calculados segundo Hall (2000); e os teores de NDT e EL_L foram calculados de acordo com o NRC (2001). Para determinação da digestibilidade aparente total da MS e dos nutrientes, a excreção total de fezes (ETF) foi estimada pela concentração de fibra em detergente ácido indigestível (FDAi), obtida após incubação ruminal dos alimentos, sobras e fezes em sacos Ankom (filter bag 57) por um período de 288 horas, segundo Casali et al. (2008).

4.2.2 Coleta e análises de amostras de líquido ruminal, sangue, urina e leite.

No presente estudo, no último dia de cada período experimental, foram coletadas amostras de líquido ruminal (50mL/animal) utilizando-se sonda esofágica, antes e após 3 horas da alimentação matinal. Imediatamente após a coleta foi realizada a leitura do pH por potenciometria, e as amostras de líquido ruminal foram centrifugadas (2500-3000 rpm) durante 15 minutos, e, posteriormente, 2 mL do sobrenadante foram adicionadas a 1 mL de solução de H_2SO_4 1N e congeladas à -20°C , até a realização das análises. A concentração de

nitrogênio amoniacal foi determinada pelo método espectrofotométrico segundo Bergmeyer (1985). As concentrações de ácidos graxos de cadeia curta no fluido ruminal foram determinadas por cromatografia em fase gasosa (GC-2014, Shimadzu, Japão), através de uma coluna capilar (Stabilwax[®], Restek, EUA; 30m de comprimento/ 0.53mm de diâmetro interno) a 145°C (isotérmica) e um injetor split/splitless e detector dual FID a 250°C, utilizando o método descrito por Erwin, Marco e Emery (1961). Hélio foi utilizado como gás de arraste na vazão de 8,01 mL/minuto, o ar sintético como comburente na pressão de 40kPa e o hidrogênio como combustível na pressão de 60kPa. As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e centrifugadas a 14500 × g durante 10 min. O sobrenadante (800 ul) foi transferido para um frasco seco e limpo com 200 µL de ácido fórmico 98-100% PA ACS e 100 µL do padrão interno (ácido 2-etil-butírico 100 mM, Chemservice, USA). O padrão externo foi preparado com ácidos acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico (Chemservice, USA). O software GCSolution[®] (Shimadzu, Japão) foi utilizado para os cálculos.

Foram realizadas coletas de sangue no 6º dia de cada período de coleta por punção da veia mamária no período da manhã antes do fornecimento da alimentação matinal. As amostras de sangue foram inseridas no analisador de sangue portátil I-Stat[®] (ABBOTT OF CARE INC. – Estados Unidos) previamente calibrado, com cartucho para analisar os teores de sódio, potássio, cálcio ionizado (Cai), pH, pressão de CO₂ (pCO₂), pressão de O₂ (pO₂), hematócrito (Hct) bicarbonato (HCO₃), CO₂ total (tCO₂), Saturação de O₂ (sO₂) e Hemoglobina (Hb). Os cartuchos contém micros-sensores e executam análises por meio de seus biossensores químicos sensíveis com chip de silício. Quando a análise é iniciada, a solução de calibração do cartucho é liberada no sensor do aparelho para validação. Uma vez que a validação é concluída, a solução de calibração vai para a câmara de resíduo e é substituído por sangue, o qual é então analisado.

Foram coletados 100 mL de urina/vaca/período por meio de massagem na vulva, e imediatamente o pH foi determinado por potenciometria e as amostras congeladas a -20 °C. Para determinar a concentração urinária de cátions monovalentes, as amostras foram previamente diluídas, digeridas e solubilizadas em ácido clorídrico. Após o preparo das amostras, a concentração urinária de Na e K foi determinada por espectrofotometria de chama (THERMO FISHER, 2008). A concentração urinária de creatinina foi determinada utilizando kits comerciais (Laborlab[®]). A excreção diária de urina foi estimada pela divisão do volume diário excretado de creatinina pela concentração de creatinina observada nas amostras “spot”,

de acordo com Oliveira et al. (2001). A excreção urinária de creatinina foi adotada como 24,05 mg de creatinina/kg de peso vivo, de acordo com Chizzotti et al. (2007).

Em cada período experimental, amostras de leite foram coletadas, e de imediato a concentração de cálcio iônico foi determinada com um potenciômetro com eletrodo seletivo e o pH por potenciometria (BARROS et al., 1999). Amostras individuais de leite de todas as vacas foram coletadas e congeladas a -20° C. Para a determinação da concentração de Na e K no leite, as amostras foram previamente diluídas, digeridas e solubilizadas em ácido clorídrico. Posteriormente, a concentração de Na e K no leite foi determinada por espectrofotometria de chama (THERMO FISHER, 2008). A concentração de cloretos no leite foi determinada segundo método titulométrico de Mohr (AOAC, 1995). O balanço (retenção) de minerais foi calculado descontando o excretado pelo leite, fezes e urina do total ingerido diariamente (NRC, 2001).

4.2.3 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) ($\alpha= 0,05$), de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + Q_j + A(Q)_k + P_l + e_{ijkl},$$

em que Y_{ijkl} = é o valor observado; μ = média geral; T_i = efeito fixo do nível de BCAD i (3 GL); Q_j = efeito fixo do quadrado latino j , $j = 1$ a 4 (3 GL); $A(Q)_k$ = efeito aleatório do animal k dentro de cada quadrado latino, $k = 1$ a 16 (12 GL); P_l = efeito fixo do período l , $l = 1$ a 4 (3 GL); e_{ijkl} = erro aleatório associado a cada observação. Os parâmetros da fermentação ruminal foram analisados como medidas repetidas no tempo (tempo 0 e 3 horas após o fornecimento da alimentação matinal). Diversas estruturas de erros foram investigadas, e a estrutura escolhida para cada variável avaliada foi de acordo com o critério de informação bayesiano (BIC), de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijklm} = \mu + T_i + TE_j + T_i \times TE_j + Q_k + Q_k \times TE_j + A(Q)_l + A(Q)_l \times TE_j \times P_m + P_m \times TE_j + e_{ijklm},$$

em que Y_{ijklm} = é o valor observado; μ = média geral; T_i = efeito fixo do nível de BCAD i (3 GL); TE_j = efeito fixo do tempo j (1 GL); $T_i \times TE_j$ = efeito fixo da interação entre T_i e TE_j (3 GL); Q_j = efeito fixo do quadrado latino j , $j = 1$ a 4 (3 GL); $Q_k \times TE_j$ = efeito fixo da interação entre Q_k e TE_j (3 GL); $A(Q)_k$ = efeito aleatório do animal k dentro de cada quadrado latino, $k = 1$ a 16 (12 GL); $A(Q)_k \times TE_j$ = efeito aleatório da interação entre $A(Q)_k$ e TE_j (12 GL); P_m = efeito fixo do período m (3 GL); $P_m \times TE_j$ = efeito fixo da interação entre P_m e TE_j (3 GL); e_{ijklm} = erro aleatório associado a cada observação.

Os polinômios ortogonais foram obtidos com a utilização do Proc-IML, pois os tratamentos não eram igualmente espaçados. O efeito de tratamento foi decomposto em três contrastes polinomiais ortogonais (linear, quadrático e desvio). O intercepto e os coeficientes angulares foram obtidos utilizando a opção “estimate” do procedimento MIXED.

4.3 RESULTADOS

No presente estudo, amostras de líquido ruminal foram coletadas antes e 3 horas após o fornecimento da alimentação matinal, para a determinação do pH, concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e nitrogênio amoniacal (N-NH₃). Não houve efeito de interação entre o BCAD e o tempo de coleta sobre o pH e as concentrações ruminais de AGCC e de N-NH₃. No tempo 3 horas após a alimentação, o pH do fluido ruminal foi elevado linearmente de acordo com o aumento do BCAD [$Y = 6,98$ (EP = 0,05) + 0,00062 (EP = 0,0002) \times BCAD (mEq/kg de MS)], enquanto que momentos antes da alimentação (tempo 0) não houve efeito do BCAD sobre esta variável. Após 3 horas da alimentação, as concentrações ruminais de nitrogênio amoniacal e de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) aumentaram, e a relação acetato/propionato (C2/C3) reduziu, quando comparadas as amostras coletadas antes da oferta da dieta. Com o aumento do BCAD, a concentração de ácido propiônico no fluido ruminal não foi alterada, enquanto que as concentrações de ácido acético, butírico, valérico, isobutírico e isovalérico aumentaram linearmente de acordo com o BCAD. Como resposta à variação na concentração ruminal do ácido acético, o BCAD aumentou linearmente a relação C2/C3 em ambos os tempos de coleta [T0: $Y = 2,63$ (EP = 0,18) + 0,001448 (EP = 0,00035) \times BCAD (mEq/kg de MS); T3: $Y = 2,60$ (EP = 0,13) + 0,0018 (EP = 0,0004) \times BCAD (mEq/kg de MS) - 0,000004 (EP = 0,0000016) \times BCAD

(mEq/kg de MS)]. No presente estudo, a concentração de cada AGCC também foi expressa em unidade relativa à concentração total de AGCC no fluido ruminal. Em ambos os tempos de coleta, as proporções de ácido acético, valérico, iso-valérico e iso-butírico aumentaram linearmente de acordo com o BCAD; enquanto que a concentração de ácido propiônico foi reduzida. De outra forma, a concentração ruminal de ácido butírico aumentou linearmente de acordo com o BCAD apenas no tempo 0 (Tabela 10).

Tabela 10 - Efeito do balanço cátion-aniônico da dieta sobre a fermentação ruminal em vacas leiteiras

Variável	Balanço Cátion-Aniônico da Dieta (mEq/kg de MS)				EPM ¹	P ²				
	-71	98	192	290		BCAD*T	Tempo (T)	L	Q	D
	pH									
T0*	7,20	7,12	7,23	7,23	0,04	0,635	0,057	0,687	0,502	0,440
T3*	6,95	7,03	7,11	7,15	0,03			0,014	0,939	0,814
	N-NH ₃ , mg/dL									
T0	7,70	8,55	8,74	10,40	0,38	0,379	<0,0001	0,002	0,338	0,383
T3	18,41	19,67	20,60	23,88	0,72			0,005	0,290	0,705
	Acético (C2)									
T0, mM ^a	29,49	36,91	38,04	40,68	1,33	0,647	<0,0001	0,0004	0,468	0,609
T3, mM	43,42	45,71	51,14	51,36	1,47			0,009	0,927	0,322
T0, % ^b	60,39	63,43	63,72	63,29	0,50	0,190	<0,0001	0,008	0,043	0,665
T3, %	59,97	62,26	62,66	61,44	0,42			0,007	0,0006	0,460
	Propiônico (C3)									
T0, mM	14,42	13,57	11,62	14,21	0,67	0,497	<0,0001	0,442	0,151	0,108
T3, mM	18,38	17,16	17,76	19,07	0,63			0,649	0,096	0,998
T0, %	26,14	22,16	22,22	21,66	0,48	0,003	0,247	<0,0001	0,056	0,195
T3, %	25,03	22,90	22,56	22,64	0,37			0,0003	0,047	0,955
	Butírico									
T0, mM	4,27	5,27	5,12	6,23	0,19	0,406	<0,0001	<0,0001	0,595	0,129
T3, mM	7,30	7,38	7,99	8,96	0,21			0,001	0,077	0,944
T0, %	8,66	8,63	8,99	9,77	0,21	0,737	<0,0001	0,030	0,162	0,900
T3, %	10,16	10,23	10,34	10,82	0,24			0,199	0,332	0,685
	Valérico									
T0, mM	0,61	0,58	0,50	0,64	0,03	0,089	<0,0001	0,914	0,087	0,780
T3, mM	0,92	0,94	0,98	1,16	0,03			0,004	0,104	0,421
T0, %	8,66	8,63	8,99	9,77	0,21	0,737	<0,0001	0,030	0,162	0,900
T3, %	10,16	10,23	10,34	10,82	0,24			0,199	0,332	0,685
	Iso-butírico									
T0, mM	0,76	0,89	0,89	1,00	0,03	0,602	0,054	0,005	0,934	0,438
T3, mM	0,89	0,90	0,97	1,10	0,03			0,009	0,134	0,989
T0, %	1,46	1,50	1,56	1,59	0,04	0,334	<0,0001	0,021	0,882	0,608
T3, %	1,25	1,18	1,20	1,31	0,04			0,524	0,031	0,909
	Iso-valérico									
T0, mM	1,11	1,50	1,46	1,70	0,06	0,751	<0,0001	0,0002	0,937	0,358
T3, mM	1,40	1,68	1,76	2,05	0,06			<0,0001	0,592	0,487
T0, %	2,32	2,41	2,48	2,61	0,07	0,358	0,008	0,014	0,546	0,623
T3, %	1,96	2,28	2,24	2,53	0,07			0,0007	0,906	0,134
	Relação C2/C3									
T0	2,42	2,97	2,93	2,97	0,07	0,045	0,009	0,0001	0,029	0,448
T3	2,45	2,75	2,76	2,75	0,05			0,0002	0,039	0,786

¹EPM = Erro padrão da média; ²L = Probabilidade para efeito linear, Q = Probabilidade para efeito quadrático, D = Probabilidade para efeito de desvio, BCAD*T = Probabilidade para efeito de interação entre o BCAD e o tempo de coleta; *T0 e T3 = Tempo de coleta: 0 e 3 horas após a alimentação; a = Mmolar (mM), b = % do total de AGCC.

No presente estudo, a digestibilidade aparente total da matéria seca (Média= 74,03 % e EPM= 0,94), matéria orgânica (Média= 75,22 % e EPM= 0,92), proteína bruta (Média= 74,97 % e EPM= 0,99), extrato etéreo (Média= 85,35 % e EPM= 0,83) e NDT (Média= 78,01 % e EPM= 1,05) não foram alteradas pelo BCAD. Porém, o BCAD alterou o coeficiente de absorção dos minerais acidogênicos (Cl, S) e alcalinogênicos (Na e K) e da fração fibrosa (FDN) da dieta. O coeficiente de absorção (CA) do Na foi reduzido de forma quadrática de acordo com o aumento do BCAD, enquanto que o CA do S foi reduzido de forma linear. O ponto de menor CA do Na foi alcançado com o BCAD de 154 mEq/kg de MS. Contrariamente, o aumento do BCAD elevou linearmente a digestibilidade aparente total da FDN e o CA do K, e, de forma quadrática, aumentou o Cl. Quando o BCAD aumentou de 71 para 290 mEq/Kg de MS, a digestibilidade aparente total da FDN aumentou em 6,38% [$Y = 65,90 (EP = 2,37) + 0,0167 (EP = 0,0068) \times \text{BCAD (mEq/kg de MS)}$] (Tabela 11).

Tabela 11 - Efeito do balanço cátion-aniônico da dieta sobre o coeficiente de digestibilidade aparente total da matéria seca e do coeficiente de absorção dos microelementos

Coeficiente de digestibilidade	Balanço cátion-aniônico da dieta (mEq/Kg de MS)				EPM ¹	P ²		
	-71	98	192	290		L	Q	D
	g/100g de MS							
MS	73,26	73,06	73,75	76,26	0,94	0,188	0,291	0,829
MO	74,45	74,27	74,88	77,70	0,93	0,141	0,229	0,756
PB	75,72	74,08	74,26	76,11	0,99	0,971	0,291	0,894
EE	85,72	84,83	84,57	86,60	0,83	0,618	0,230	0,634
FDN	65,09	67,43	67,99	71,47	1,37	0,024	0,584	0,619
NDT	77,01	76,80	77,69	80,84	1,05	0,120	0,217	0,809
Coeficiente de absorção								
Ca	44,04	40,69	39,45	42,46	1,98	0,696	0,520	0,814
P	68,12	70,07	69,24	70,48	1,19	0,477	0,883	0,650
Na	89,33	85,83	83,32	86,73	0,76	0,041	0,028	0,188
K	81,44	86,37	86,02	89,09	0,86	0,0004	0,727	0,264
Cl	81,39	87,28	85,45	57,08	2,12	<0,0001	<0,0001	0,025
S	90,68	85,62	80,54	81,39	0,82	<0,0001	0,134	0,063
ETF, kg/vaca/dia	5,81	5,66	5,49	4,89	0,16	0,011	0,212	0,687

¹EPM= Erro Padrão da Média; ²L= Probabilidade para efeito linear, Q= Probabilidade para efeito quadrático, D= Probabilidade para efeito de desvio. ETF= Excreção total de fezes.

A concentração sérica de HCO_3 [$Y = 24,21 (EP = 0,57) + 0,0195 (EP = 0,0025) \times \text{BCAD (mEq/kg de MS)}$], as bases em excesso [$Y = 0,263 (EP = 0,796) + 0,023 (EP = 0,0025) \times \text{BCAD (mEq/kg de MS)}$] e o pH [$Y = 7,41 (EP = 0,006) + 0,00023 (EP = 0,000029) \times$

BCAD (mEq/kg de MS)] sanguíneo aumentaram linearmente de acordo com o BCAD. Em decorrência do aumento de pH, as concentrações séricas de cátions (Na, K e Cai) reduziram linearmente. De forma semelhante, a pCO₂ e o tCO₂ do sangue aumentaram de acordo com o BCAD, enquanto que a pO₂ reduziu, indicando que as vacas alteraram a frequência respiratória em tentativa de manter o pH sanguíneo constante. Como resultado da do aumento do BCAD, os teores de hematócrito e de hemoglobina no sangue também aumentaram (Tabela 12).

Tabela 12 - Efeito do balanço cátion-aniônico da dieta sobre os parâmetros sanguíneos e o pH do sangue de vacas leiteiras

Variável	Balanço Cátion-Aniônico da Dieta (mEq/kg de MS)				EPM ¹	P ²		
	-71	98	192	290		L	Q	D
Na, mmol/L	138,44	138,19	138	135,86	0,29	0,0001	0,007	0,191
K, mmol/L	3,89	3,98	3,91	3,39	0,048	0,0001	<0,0001	0,155
Cai, mmol/L	1,22	1,20	1,18	1,13	0,009	<0,0001	0,121	0,372
BE, mmol/L	-1,37	3,23	3,16	7,63	0,64	<0,0001	0,476	0,014
HCO ₃ , mmol/L	22,99	26,75	26,34	30,84	0,51	<0,0001	0,199	0,005
pH	7,40	7,44	7,44	7,49	0,006	<0,0001	0,686	0,003
pCO ₂ , mmHg	37,40	38,54	39,05	41,81	0,43	<0,0001	0,127	0,368
pO ₂ , mmHg	34,50	32,94	33,0	32,50	0,45	0,049	0,567	0,629
tCO ₂ , mmol/L	24,13	27,90	27,63	32,10	0,55	<0,0001	0,232	0,010
Hb, g/dL	8,33	8,08	8,31	9,02	0,09	0,001	0,0002	0,709
Hct, %	24,56	23,81	24,44	26,5	0,27	0,0004	0,0005	0,97
sO ₂ , %	66,00	66,56	66,00	67,06	0,80	0,678	0,867	0,663

¹EPM = Erro padrão da média; ²L= Probabilidade para efeito linear, Q= Probabilidade para efeito quadrático, D= Probabilidade para efeito de desvio.

A reabsorção renal de íons é um dos mecanismos responsáveis por manter o equilíbrio ácido-base dos fluídos biológicos próximos a homeostasia, uma vez que a excreção de cátions pela urina pode ser reduzida ou aumentada de acordo com diferença cátion-aniônica sanguínea. No presente estudo, as concentrações urinárias de K e Na aumentaram de forma quadrática e linear, respectivamente, de acordo com o BCAD. Ao avaliar a relação destes minerais com a concentração de creatinina na urina, a relação K:creatinina e de Na:creatinina aumentaram de acordo com o BCAD. As relações K:creatinina e Na:creatinina foram elevadas de 6,607 para 12,204 e 0,246 para 3,135, respectivamente, quando o BCAD aumentou de -71 para 290 mEq/kg de MS; o que indica que a reabsorção renal de cátions, principalmente Na, reduziu de acordo com o aumento do BCAD. Como resposta à maior excreção de cátions (Na e K) pela urina, o pH urinário aumentou linearmente de acordo com o

BCAD [$Y = 6,35$ (EP = 0,13) + 0,00607 (EP = 0,00042) × BCAD (mEq/kg de MS)] (Tabela 13).

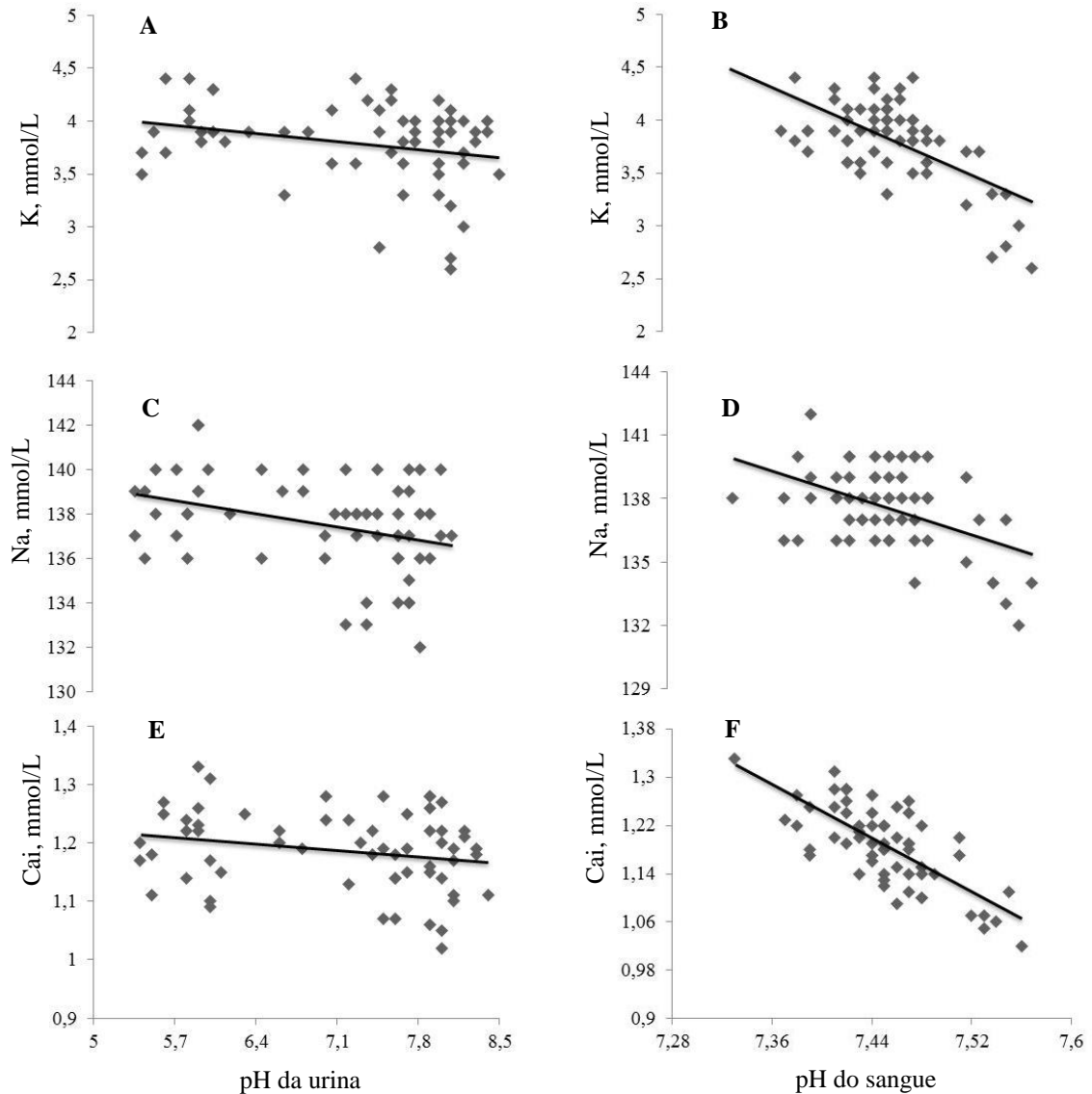
Tabela 13 - Efeito do balanço cátion-aniônico da dieta sobre a concentração de cátions monovalentes e o pH urinário de vacas leiteiras

Variável	Balanço Cátion-Aniônico da Dieta (mEq/kg de MS)				EPM ¹	P ²		
	-71	98	192	290		L	Q	D
pH	5,86	6,99	7,65	7,99	0,12	<0,0001	0,127	0,389
	g/100 mL							
K	0,327	0,742	0,766	0,665	0,038	<0,0001	<0,0001	0,868
Na	0,016	0,090	0,154	0,166	0,011	<0,0001	0,344	0,143
	g mineral/g creatinina							
K	6,607	10,341	11,736	12,204	0,519	<0,0001	0,062	0,829
Na	0,246	1,799	2,851	3,135	0,253	<0,0001	0,446	0,515
	L/vaca/dia							
ETU	22,04	20,60	21,25	26,77	0,805	0,058	0,009	0,464

¹EPM= Erro padrão da média; ²L= Probabilidade para efeito linear, Q= Probabilidade para efeito quadrático, D= Probabilidade para efeito de desvio. ETU= Excreção total de urina.

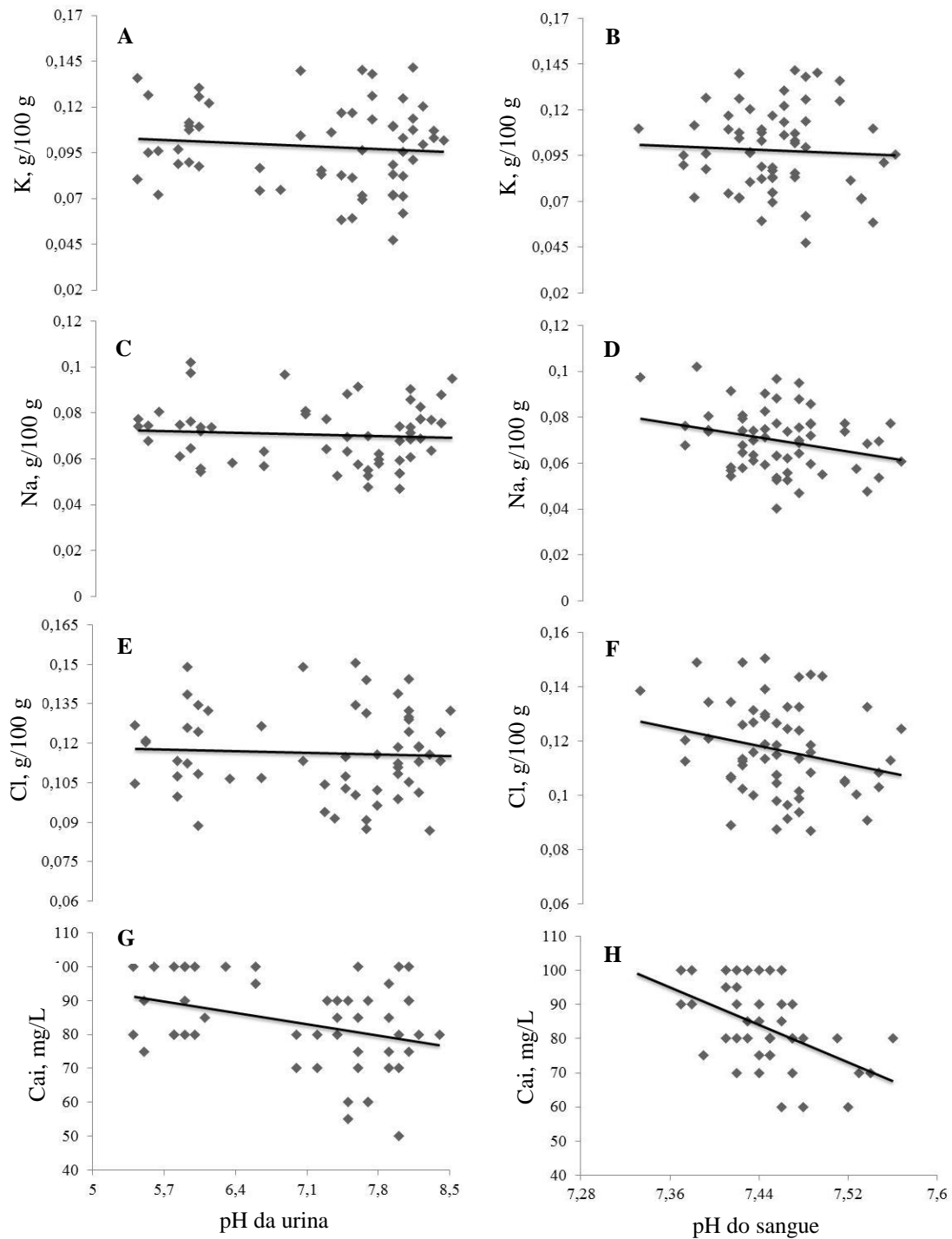
As alterações do equilíbrio ácido-base do sangue afetaram diretamente a concentração de cátions do sangue e, conseqüentemente, do leite. As concentrações séricas de Na, K e de Cai reduziram linearmente de acordo com o aumento do pH sanguíneo (Figura 6). De forma semelhante, as concentrações lácteas de Na, K, Cai e de cloretos também aumentaram (Figura 7) de acordo com o pH sanguíneo. No entanto, o pH urinário apresentou baixa associação com a concentração de Na e K do leite, uma vez que os interceptos e os coeficientes angulares não foram significativos ($P > 0,05$). De forma geral, o pH do sangue apresentou maior associação com as concentrações de minerais no sangue e no leite, quando comparado ao pH urinário.

Figura 6 - Efeito do pH sanguíneo e urinário sobre as concentrações de minerais do sangue



A e B: Potássio (K, mmol/L): $Y = 4,61$ (EP = 0,37, $P < 0,0001$) - $0,1129$ (EP = 0,051, $P = 0,031$) \times pH (urina); $Y = 44,65$ (EP = 6,81, $P < 0,0001$) - $5,48$ (EP = 0,91, $P < 0,0001$) \times pH (sangue); C e D: Sódio (Na, mmol/L): $Y = 143,10$ (EP = 1,97, $P < 0,0001$) - $0,773$ (EP = 0,27, $P = 0,007$) \times pH (urina); $Y = 283,74$ (EP = 36,26, $P < 0,0001$) - $19,62$ (EP = 4,87, $P = 0,0002$) \times pH (sangue); E e F: cálcio iônico (Cai, mmol/L): $Y = 1,30$ (EP = 0,06, $P < 0,0001$) - $0,015$ (EP = 0,0089, $P = 0,08$) \times pH (urina); $Y = 9,41$ (EP = 0,998, $P < 0,0001$) - $1,104$ (EP = 0,134, $P < 0,0001$) \times pH (sangue).

Figura 7 - Efeito do pH sanguíneo e urinário sobre a concentração de minerais do leite



A e B: Potássio (K, g/100 mL): $Y = 0,124$ (EP = 0,025, $P < 0,0001$) - $0,0037$ (EP = 0,003, $P = 0,282$) \times pH (urina); $Y = 0,04$ (EP = 0,02, $P = 0,089$) - $0,0079$ (EP = 0,0031, $P = 0,015$) \times pH (sangue); C e D: Sódio (Na, g /100g): $Y = 0,078$ (EP = 0,018, $P < 0,0001$) - $0,00077$ (EP = 0,0024, $P = 0,755$) \times pH (urina); $Y = 0,099$ (EP = 0,013, $P < 0,0001$) - $0,0039$ (EP = 0,0018, $P = 0,038$) \times pH (sangue); E e F: Cloretos (Cl, g/100g): $Y = -0,085$ (EP = 1,09, $P = 0,938$) + $0,054$ (EP = 0,15, $P = 0,719$) \times pH (urina); $Y = 5,85$ (EP = 0,036, $P < 0,0001$) - $0,769$ (EP = 0,0049, $P < 0,0001$) \times pH (sangue); G e H: Cálcio iônico (Cai, mg/L): $Y = 116,89$ (EP = 13,43, $P < 0,0001$) - $4,76$ (EP = 1,89, $P = 0,015$) \times pH (urina); $Y = 1110,71$ (EP = 276,17, $P = 0,0002$) - $137,99$ (EP = 37,09, $P = 0,0006$) \times pH (sangue).

O consumo de K aumentou de forma quadrática de acordo com o BCAD; enquanto que a excreção de K nas fezes reduziu linearmente. De modo contrário, a excreção urinária de K aumentou linearmente de acordo com o BCAD, enquanto que a secreção de K no leite não foi alterada. Como resultado das alterações do metabolismo digestivo e renal, o balanço de K (retenção, g/dia) reduziu de forma linear de acordo com o BCAD [Y (g/vaca/dia) = 39,28 (EP = 15,51) – 0,14 (EP = 0,03) × BCAD (mEq/kg de MS); Y (g/100 g consumido) = 17,91 (EP = 7,31) – 0,065 (EP = 0,015) × BCAD (mEq/kg de MS)]. Apesar do BCAD alterar o balanço de K, a eficiência de utilização do K dietético para a produção de leite (g de K secretado no leite/g de K consumido) não foi alterada. O consumo e a excreção de Na nas fezes aumentaram de forma quadrática de acordo com o BCAD, enquanto que a excreção de sódio na urina aumentou linearmente e a secreção láctea de Na, em g/vaca/dia, não foi alterada. Como resultado destas alterações, o balanço de Na, em g/vaca/dia, aumentou de forma quadrática de acordo com o BCAD [Y (g/vaca/dia) = 43,44 (EP = 5,06) + 0,050 (EP = 0,049) × BCAD (mEq/kg de MS) - 0,00052 (EP = 0,0002) × BCAD² (mEq/kg de MS²)]. No entanto, quando expresso em percentual do total consumido, o balanço de Na reduziu linearmente de acordo com o BCAD [Y (g/100 g consumido) = 52,49 (EP = 5,60) – 0,106 (EP = 0,021) × BCAD (mEq/kg de MS)]. Diferentemente do K, a eficiência de utilização do Na para produção de leite foi alterada, uma vez que reduziu de forma quadrática com o aumento do BCAD [Y (g Na no leite/g Na consumido) = 0,182 (EP = 0,014) – 0,00064 (EP = 0,000075) × BCAD (mEq/kg de MS) + 0,0000023 (EP < 0,000001) × BCAD² (mEq/kg de MS²)] (Tabela 14).

Tabela 14 - Efeito do balanço cátion-aniônico da dieta sobre o balanço de cátions monovalentes em vacas leiteiras

Balanço	Balanço Cátion-Aniônico da Dieta (mEq/kg de MS)				EPM ¹	P ²		
	-71	98	192	290		L	Q	D
	Consumo (g/vaca/dia)							
K	210,74	231,49	241,82	216,14	3,35	0,009	<0,0001	0,005
Na	61,64	98,22	106,73	84,35	2,56	<0,0001	<0,0001	0,0003
	Excreção fecal (g/vaca/dia)							
K	39,98	33,34	33,36	25,68	1,93	0,003	0,652	0,378
Na	6,36	14,31	18,27	10,69	0,816	0,0002	<0,0001	0,010
	Excreção urinária (g/vaca/dia)							
K	94,06	154,68	172,10	174,37	7,70	<0,0001	0,020	0,917
Na	3,93	20,88	34,55	38,10	2,74	<0,0001	0,462	0,286
	Secreção láctea (g/vaca/dia)							
K	20,13	22,07	21,72	19,59	1,00	0,924	0,201	0,911
Na	14,90	15,21	15,06	15,55	0,45	0,477	0,847	0,676
	Balanço (retenção) (g/vaca/dia)							
K	48,13	27,29	12,69	-4,32	6,23	0,0001	0,700	0,987
Na	36,04	44,99	31,82	15,72	3,49	0,037	0,022	0,626
	Excreção fecal (g/100g consumido)							
K	20,40	13,95	14,81	11,58	0,96	0,0002	0,450	0,190
Na	10,67	14,34	16,77	12,47	0,73	0,079	0,006	0,126
	Excreção urinária (g/100g consumido)							
K	45,49	64,59	71,30	81,00	3,22	<0,0001	0,701	0,702
Na	7,45	27,08	38,01	49,97	3,68	<0,0001	0,957	0,980
	Secreção láctea (g/100g consumido)							
K	10,43	10,51	8,90	8,96	0,50	0,054	0,641	0,237
Na	23,89	15,33	13,95	18,55	0,78	<0,0001	<0,0001	0,248
	Balanço (retenção) (g/100g consumido)							
K	22,05	12,20	5,65	-2,43	2,94	<0,0001	0,698	0,977
Na	57,22	44,87	39,20	16,89	3,66	<0,0001	0,159	0,428
	Eficiência (g secretado no leite/g consumido)							
K	0,103	0,105	0,096	0,090	0,005	0,205	0,496	0,680
Na	0,239	0,145	0,140	0,190	0,008	<0,0001	<0,0001	0,574

¹EPM = Erro padrão da média; ²L = Probabilidade para efeito linear, Q = Probabilidade para efeito quadrático, D = Probabilidade para efeito de desvio.

4.4 DISCUSSÃO

No presente estudo, o aumento do BCAD elevou o pH do líquido ruminal e possivelmente alterou a fermentação microbiana, uma vez que houve aumento da concentração de ácido acético e da relação C2/C3. Como resultado das alterações na fermentação ruminal, a digestibilidade aparente total da FDN aumentou linearmente de acordo com o BCAD, o que indica que o aumento do pH ruminal resultou em maior atividade de bactérias celulolíticas sobre os carboidratos fibrosos da dieta. Além das alterações digestivas, o pH sanguíneo também foi elevado de acordo com o BCAD, o que reduziu a reabsorção renal, a retenção e a eficiência de utilização de cátions para a produção de leite. Como resultado do controle metabólico, as concentrações séricas e lácteas de Na, K e Cai reduziram de acordo com o aumento do pH sanguíneo, o que indica que o controle metabólico para manter o equilíbrio iônico sanguíneo pode afetar diretamente a concentração de íons e o equilíbrio iônico do leite (BARROS, 1999; MARQUES et al., 2011; FISHER et al., 2012). A seguir serão discutidos em cada seção os efeitos do BCAD de vacas leiteiras em lactação sobre a fermentação ruminal, digestibilidade aparente total da MS e dos nutrientes, metabolismo sanguíneo e renal, e os efeitos das alterações metabólicas sobre a composição mineral e o equilíbrio iônico das micelas de caseína do leite.

4.4.1 Fermentação ruminal e digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes

A acidificação do fluido ruminal por meio de alterações dietéticas pode alterar a atividade microbiana, especialmente das bactérias celulolíticas, e reduzir a taxa de digestão da fração fibrosa da dieta. No presente estudo, o pH ruminal, as concentrações ruminais de nitrogênio amoniacal, ácidos graxos de cadeia curta e a relação dos ácidos acético/propiónico (C2/C3) aumentaram de acordo com o BCAD. Além do possível efeito direto do aumento da positividade do BCAD sobre o pH do fluido ruminal, no presente estudo, para elevar o BCAD, foi adicionado bicarbonato de sódio em substituição ao sulfato de amônia da dieta. O sulfato de amônia apresenta propriedades acidogênicas, enquanto que o bicarbonato de sódio

apresenta ação tamponante (NRC, 2001). Desta forma, a inclusão de bicarbonato de sódio em substituição ao sulfato de amônia reduziu a concentração de ânions da dieta, e, adicionalmente, a inclusão de bicarbonato de sódio na dieta pode ter contribuído para neutralizar os ácidos produzidos pela fermentação ruminal, resultando em aumento do pH. Como resultado do aumento do pH ruminal, a atividade dos microrganismos ruminais, principalmente de bactérias celulolíticas, pode ter sido potencializada, uma vez que bactérias celulolíticas apresentam máximo crescimento com pH próximo a neutralidade (ALLEN, 1997; NRC, 2001). No presente estudo, a maior atividade de bactérias celulolíticas devido ao aumento de pH pode ser indicada pelo aumento linear da concentração ruminal de ácido acético (produto resultante principalmente da atividade de bactérias celulolíticas) de acordo com o aumento do BCAD (NRC, 2001; SHARIF et al., 2010).

Apper-Bossard et al. (2010) estudaram os efeitos de dois níveis de concentrado na dieta (20 ou 40 % da MS) associados ao aumento do BCAD (0, 150 e 300 mEq/kg de MS) sobre o metabolismo ruminal. Estes autores relataram que o aumento do BCAD não alterou a média do pH ruminal, a proporção molar de AGCC e a digestibilidade da fibra, porém reduziu a taxa de decréscimo do pH ruminal após a alimentação das vacas que receberam a dieta com 40 % de concentrado na MS. No entanto, as médias de pH ruminal do presente estudo 3 horas após a alimentação foram maiores do que as relatadas por Apper-Bossard et al. (2010) (média de pH= 6,19). O maior pH observado no presente estudo pode ser atribuído à coleta de líquido ruminal por sonda esofágica, que pode superestimar os valores de pH, devido ao risco de contaminação das amostras do fluído ruminal com saliva (SALLES et al., 2003), o que indica uma limitação deste método de coleta.

Alterações da fermentação ruminal podem afetar diretamente a digestibilidade dos nutrientes, especialmente da fração fibrosa da dieta, uma vez que a digestão da fibra ocorre exclusivamente pelos microrganismos durante a fermentação ruminal (NRC, 2001). No presente estudo, o BCAD não alterou a digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, extrato etéreo e o coeficiente de absorção dos minerais cálcio e fósforo. Estes resultados são similares aos relatados por Delaquis e Block (1995), que não encontraram diferença de digestibilidade aparente total dos nutrientes ao comparar os BCAD +55 e +375 mEq/kg de MS. De forma semelhante, Hirosh e Block (1991) não observaram efeitos do BCAD sobre o coeficiente de absorção do cálcio. Porém, no presente estudo a digestibilidade aparente total da FDN foi diminuída linearmente de acordo com a redução do BCAD. O efeito negativo da redução do BCAD sobre a digestibilidade da FDN pode ser associado à queda do

pH ruminal e, conseqüentemente, da menor atividade de bactérias celulolíticas, uma vez que a concentração de ácido acético no fluido ruminal foi reduzida linearmente de acordo com a redução do BCAD. No presente estudo, a associação positiva entre o BCAD, o pH ruminal e a digestibilidade da FDN são similares aos resultados descritos por DePeters et al. (1984), que relataram aumento da digestibilidade da FDN com a inclusão de bicarbonato de sódio na dieta de vacas leiteiras.

O aproveitamento dos minerais pelo metabolismo digestivo, sanguíneo e renal, e a utilização destes elementos pelos tecidos, depende não apenas da concentração dietética de cada mineral, mas também de suas interações e do equilíbrio iônico sanguíneo. No presente estudo, os coeficientes de absorção dos minerais aniônicos, Cl e S, aumentaram de forma quadrática e linear, respectivamente, de acordo com a redução do BCAD. O Cl é absorvido no intestino em troca iônica com Na endógeno, que é excretado no lúmen intestinal. Em resposta ao maior fluxo de ânions dietéticos no trato gastrointestinal, o HCO_3^- da corrente sanguínea é secretado no intestino para neutralizar os ácidos neste local, o que em consequência pode reduzir o pH sanguíneo e resultar em acidose metabólica (BLOCK, 1994). Nesta situação, o HCO_3^- é excretado no lúmen intestinal em troca da absorção de ânions, como o Cl, o que resulta em maior absorção intestinal e aumento da concentração sérica deste mineral (BLOCK, 1994). Desta forma, em vacas acidóticas o HCO_3^- substituí parcialmente o papel do Na nas trocas iônicas no intestino para a absorção dos ânions, de modo que a redução do BCAD pode resultar em maior fluxo intestinal de cloretos e sulfatos, aumentar a excreção intestinal de HCO_3^- e a digestibilidade dos minerais aniônicos devido às trocas iônicas de HCO_3^- /ânions no epitélio intestinal. Estes resultados são similares aos relatados por Delaquis e Block (1995), que observaram aumento da concentração plasmática de S em resposta a redução do BCAD. Tais resultados foram atribuídos à maior absorção de S, que posteriormente foi regulado pelo sistema renal, para manter o pH próximo a homeostasia.

No presente estudo, o BCAD também alterou as trocas iônicas no intestino dos minerais catiônicos, Na e K. O coeficiente de absorção do Na aumentou de forma quadrática de acordo com a redução do BCAD. Esta resposta metabólica pode ter ocorrido para compensar a maior concentração de ânions no sangue resultante da redução do BCAD. Com a acidificação dos fluidos corporais em resposta à redução do BCAD, o coeficiente de absorção do Na e a excreção urinária de ânions pode ser aumentada para reestabelecer o equilíbrio cátion-aniônico do sangue. O Na é absorvido em todo o trato digestivo, e o controle metabólico sobre este mineral pode ser bastante eficiente para aumentar sua retenção em

situações de carência deste mineral, ou de compensação aniônica em um quadro de acidose metabólica, uma vez que durante a evolução dos bovinos, as dietas apresentavam baixa concentração de Na, de forma que o metabolismo destes animais desenvolveu mecanismos para conservar Na (NRC, 2001). Contrariamente ao Na, o coeficiente de absorção do K foi reduzido de forma linear com a redução do BCAD. O coeficiente de absorção do K está negativamente correlacionado com o coeficiente de absorção do magnésio (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999). Desta forma, devido às interações no processo de absorção destes minerais, como resposta a redução do BCAD, a digestibilidade do Mg pode ser aumentada para compensar os ânions na corrente sanguínea, em detrimento da absorção intestinal do K.

O efeito do BCAD sobre a digestibilidade dos nutrientes pode depender dos limites do BCAD avaliados, das alterações na fermentação ruminal em função da modificação dos ingredientes dietéticos, da natureza destes ingredientes e ao nível de produção individual das vacas (SHARIF et al., 2010). A maioria dos estudos sobre o BCAD para vacas em lactação avaliaram apenas miliequivalência positiva, o que reduz a necessidade de restringir o fornecimento de bicarbonato de sódio, e resulta em ausência ou pouco efeito do BCAD sobre a fermentação ruminal e a digestibilidade dos nutrientes (TUCKER; XIN.; HENKEN, 1991).

4.4.2 Variáveis sanguíneas

A acidificação sanguínea pode ocorrer com elevada frequência em vacas leiteiras, e, em condições normais, é rapidamente compensada pelo aumento da concentração sanguínea de cátions. No presente estudo, a concentração sérica de HCO_3^- e o pH sanguíneo foram reduzidas linearmente de acordo com o aumento da negatividade do BCAD. Estes resultados foram semelhantes aos relatados por Salles et al. (2012), que avaliaram o efeito de duas relações volumoso:concentrado da dieta (60:40 e 40:60) associadas ao aumento do BCAD (-100 a 400 mEq/kg de MS) de novilhos, e relataram que o pH sanguíneo e as concentrações séricas de HCO_3^- foram diminuídas com a redução do BCAD.

Com a acidificação dos fluídos corporais pela redução do BCAD, no presente estudo, mecanismos fisiológicos para compensar a acidificação metabólica foram desencadeados, de modo que as concentrações séricas de minerais foram alteradas em tentativa de reestabelecer o equilíbrio iônico sanguíneo. No presente estudo, a concentração de cálcio iônico (Ca^{2+}) no

sangue aumentou linearmente de acordo com a redução do BCAD. Resultados similares foram relatados por Marques et al. (2011), que ao incluir 250 g de cloreto de amônia na dieta de vacas em lactação observaram que a concentração de cálcio no sangue aumentou em 0,68 mg/dL, em relação a dieta controle (catiônica). Da mesma forma, Tucker et al. (1992) observaram que vacas alimentadas com dieta aniônica no pré-parto apresentaram maiores concentrações de Ca no sangue do que vacas alimentadas com dietas catiônicas neste mesmo período. Resultados semelhantes foram relatados por Tucker, Xin e Henken (1991); Li, Liu e Wang (2008) e Wu et al. (2008). O cálcio, assim como o sódio e o potássio, são cátions, e o aumento de sua concentração sanguínea é uma resposta metabólica para neutralizar o aumento da concentração de ácidos nos fluídos celulares de vacas em acidose metabólica. A redução do pH do meio extracelular estimula a produção dos hormônios PTH e do $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, e deprime a ação da calcitonina (CT). O PTH e o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ são responsáveis por aumentar a concentração de Ca no sangue, através da absorção intestinal, reabsorção renal e mobilização óssea destes minerais (BLOCK, 1994). Desta forma, o aumento da concentração de cálcio iônico no sangue é uma resposta compensatória do quadro de acidose metabólica.

De forma semelhante ao Ca, as concentrações séricas de Na e K também foram elevadas de acordo com a redução do BCAD. No presente estudo, o aumento das concentrações sanguíneas de Na e K pode ter ocorrido como resultado do controle renal de excreção de cátions, que pode ser reduzido para aumentar a concentração sanguínea de Na e K para compensar à acidose metabólica (BLOCK, 1994). Hu e Murphy (2004) relataram em estudo de meta-análise que o BCAD não alterou a concentração de Na no sangue de vacas leiteiras, porém a concentração sérica de K aumentou de acordo com a redução do BCAD. Diferentemente, Fredeen et al. (1988) relataram que a concentração de Na no sangue foi diminuída com a redução do BCAD. De outra forma, Tucker et al. (1988); West, Mullinix e Sandifer (1991); West et al. (1992) e Marques et al. (2011) não observaram efeito do BCAD sobre a concentração de Na e K do sangue. Desta forma, há divergência de resultados em relação ao efeito do BCAD sobre as concentrações sanguíneas de Na e K. Esta ausência de consenso pode ser atribuída aos diferentes métodos que são adotados para estudar o BCAD, tais como: tipo de sal aniônico ou catiônico utilizado; níveis de BCAD estudados; tipo de dieta (completa ou concentrado ofertado separadamente do volumoso, relação volumoso:concentrado, etc.) e concentração dos minerais entre as dietas estudadas.

Devido aos mecanismos de compensação da acidose metabólica, a acidificação do sangue pode alterar a composição mineral e o equilíbrio iônico do leite, sendo este último um

fator determinante da estabilidade do leite ao tratamento térmico e/ou a reação com o etanol. No presente estudo, a concentração de Ca , Na , K e Cl do leite aumentaram de acordo com a redução do pH sanguíneo, o que indica que as alterações metabólicas desencadeadas em tentativa de manter o pH sanguíneo próximo a homeostasia afetam diretamente a concentração de cátions do leite. O aumento da concentração láctea de cátions bivalentes pode reduzir as cargas negativas das micelas de caseína e a força de repulsão eletrostática entre elas (BARROS et al., 1999; MARQUES et al., 2011; FISHER et al., 2012), o que pode facilitar a coagulação destas proteínas durante a realização do teste do álcool nas fazendas e nas plataformas de recebimento da indústria e ao aquecimento térmico industrial (Capítulo 1 - Figura 5 e Tabela 8), resultando em prejuízos econômicos aos produtores, a indústria e aos consumidores. Alterações no pH sanguíneo de vacas leiteiras podem ocorrer com elevada frequência, pois a acidificação do sangue pode ser resultante da redução do BCAD, da acidose ruminal (PONCE; HERNANDES, 2005) ou da elevada taxa metabólica (FISHER et al., 2012; FAGNANI; BELOTI; BATTAGLINI, 2014) de vacas leiteiras em lactação. Adicionalmente, além da acidificação sanguínea, Stumpf et al. (2013) demonstraram que a deficiência nutricional pode aumentar o espaço intercelular (“junções firmes”) do epitélio mamário, o que pode facilitar a passagem de íons para o leite e alterar o equilíbrio iônico das micelas de caseína, reduzindo a estabilidade destas proteínas ao etanol (FISHER et al., 2012). Desta forma, com base nos resultados do presente estudo, o aumento do BCAD pode manter o pH sanguíneo próximo a homeostasia, reduzir a concentração láctea de cátions bivalentes, e contribuir para evitar problemas com instabilidade das proteínas ao etanol e ao processamento térmico do leite (Capítulo 1 - Tabela 8).

No presente estudo, a concentração de bases em excesso no sangue diminuiu de acordo com a redução do BCAD. Resultados semelhantes foram observados por Apper-Bossard et al. (2010) e por Salles et al. (2012), que relataram menores concentrações de bases em excesso no sangue de acordo com a redução BCAD. A variável bases em excesso indica indiretamente a quantidade de tampões do sangue, numa dada temperatura e pressão de dióxido de carbono. Desta forma, a redução das bases em excesso no sangue indica a mobilização de bases dos sistemas tampões como meio de equilíbrio do metabolismo para compensar um quadro de acidose metabólica, e, portanto, a concentração sanguínea de bases em excesso pode ser um bom indicativo do equilíbrio iônico sanguíneo (ORTOLANI, 2003).

No presente estudo, a pCO_2 foi reduzida com o decréscimo do BCAD, o que indica que possivelmente alterações respiratórias nas vacas leiteiras também ocorreram para

compensar a acidificação sanguínea induzida pela redução do BCAD. Resultados semelhantes foram observados por Hu e Murphy (2004) e por Salles et al. (2012), que relataram que a $p\text{CO}_2$ diminuiu linearmente de acordo com a redução do BCAD de 635,70 para -191 mEq/kg de MS e de 400 para -100 mEq/kg de MS, respectivamente. A redução da $p\text{CO}_2$ indica aumento da frequência respiratória, que pode ocorrer para compensar a acidose metabólica, uma vez que o CO_2 é um gás que, dissolvido em água, forma ácido carbônico, que dissocia-se em íons H^+ e HCO_3^- e contribui para acidificar os fluidos biológicos. Desta forma, quando o pH sanguíneo é reduzido, as vacas podem aumentar a frequência respiratória para que ocorra maior eliminação de CO_2 através da respiração, o que reduz a formação de íons de hidrogênio provenientes da reação desse gás com a água (WEST; MULLINIX; SANDIFER, 1991; WEST et al., 1992; BLOCK, 1994; ORTOLANI, 2003). Como resultado, com a acidificação do sangue a $p\text{CO}_2$ é reduzida.

No presente estudo, a concentração de $t\text{CO}_2$ no sangue também foi diminuída de acordo com a redução do BCAD. Da mesma forma que a $p\text{CO}_2$, a $t\text{CO}_2$ também está associada a alterações da frequência respiratória para compensar a acidose metabólica resultante da redução do BCAD. Contrariamente, a $p\text{O}_2$ apresentou tendência de aumentado de acordo com a redução do BCAD. Apesar deste gás não ter envolvimento no reestabelecimento do equilíbrio ácido-básico, quando ocorre decréscimo de pH pode haver maior demanda de O_2 (MARZOCCO et al., 2011). Adicionalmente, a tendência de aumento da $p\text{O}_2$ com a redução do BCAD pode ser decorrente da menor frequência respiratória de vacas acidóticas (WEST; MULLINIX; SANDIFER, 1991; WEST et al., 1992; ORTOLANI, 2003). De outra forma, a $s\text{O}_2$ no sangue não foi alterada pelo BCAD. A saturação de O_2 indica a porcentagem de hemoglobinas do sangue que estão ligadas ao oxigênio, e, também, está relacionada à função tamponante da hemoglobina. Com a acidificação dos fluidos corporais, a hemoglobina perde afinidade com a molécula de O_2 e aumenta sua ligação com os íons H^+ , o que reduz a quantidade desses íons no sangue para manter o pH sanguíneo próximo a homeostasia. No presente estudo, a redução do BCAD possivelmente não alterou a $s\text{O}_2$ devido as demais alterações metabólicas terem sido eficientes para compensar a acidificação sanguínea, uma vez que o sistema tampão $s\text{O}_2$ /hemoglobina pode ser ativado apenas em condições extremas de acidose metabólica. Desta forma, os demais sistemas tampões do organismo podem ter atuado com eficiência para compensar a acidose metabólica antes mesmo que o sistema tampão do $s\text{O}_2$ /hemoglobina fosse ativado (ORTOLANI, 2003).

4.4.3 Excreção renal e balanço de cátions monovalentes

O rim, como órgão filtrador e regulador dos componentes presentes nesse fluido, promove maior ou menor reabsorção das substâncias presentes no organismo de acordo com a necessidade, e, adicionalmente, nos túbulos renais a vitamina D3 é convertida em sua forma ativa, estimulada pelo paratormônio. No presente estudo, o aumento do BCAD elevou a concentração urinária de Na e K. Da mesma forma, Tucker et al. (1988) observaram que ao elevar o BCAD de -100 para 200 mEq/kg de MS, as concentrações urinárias de Na e K aumentaram, enquanto que a de cloretos foi reduzida. Resultados semelhantes também foram descritos por West, Mullinix e Sandifer (1991) e West et al. (1992), que relataram que o balanço cátion-aniônico da urina foi elevado com o aumento do BCAD. Hu e Murphy (2004) relataram que a concentração de K e Cl na urina aumentaram linearmente à medida que as respectivas concentrações dietéticas destes minerais foram elevadas, enquanto que a concentração de sódio na urina foi elevada de forma quadrática com o nível deste mineral na dieta. Apper-Bossard et al. (2010) relataram que em vacas alimentadas com baixo BCAD, 70% dos Cloretos e apenas 16% do Na consumido foram excretados na urina, enquanto que em vacas alimentadas com alto BCAD, 33% dos Cloretos e 53% do Na foram excretados. As alterações observadas na concentração urinária de Na, K e Cl de acordo com a redução do BCAD pode ocorrer pela regulação da reabsorção renal destes minerais para compensar a acidificação metabólica, de forma a aumentar a excreção de ânions (Cl) e reabsorver os cátions (Na e K) reguladores do equilíbrio ácido-base do sangue. Desta forma, o rim exerce a função de manter a constância do meio interno, por meio da regulação da excreção de água e das trocas iônicas, o que representa um importante sistema de compensação da acidose metabólica (BLOCK, 1994; ORTOLANI, 2003).

Como resposta ao controle renal para eliminação de ânions e conservação de Na e K para compensar a acidose metabólica, o pH urinário foi diminuído linearmente de acordo com a redução do BCAD. Hu e Murphy (2004) relataram que o pH urinário foi altamente responsivo às mudanças do BCAD, uma vez que observaram que o pico de pH da urina ocorreu com o BCAD de 620 mEq/kg de MS ($R^2 = 0,86$). A associação positiva entre o BCAD e o pH da urina também foram descritos por West et al. (1992) e por Hu et al. (2007). Ao reduzir o BCAD de 400 para -100 mEq/kg de MS, Salles et al. (2012) também observaram redução do pH urinário de novilhos de corte. As alterações metabólicas para manter o pH

sanguíneo próximo a homeostasia, refletem diretamente na excreção de ânions e de cátions pela urina, de modo a aumentar a excreção de íons aniônicos em vacas acometidas por acidose metabólica. Desta forma, com os mecanismos de compensação da acidose metabólica, o pH sanguíneo permanece mais estável com a redução do BCAD, enquanto que na urina ocorre a excreção dos compostos acidogênicos presentes no sangue, o que faz com que o pH urinário seja um indicador bastante utilizado para estimar o equilíbrio ácido-base dos fluídos corporais (BLOCK, 1994; HU; MURPHY, 2004; SHARFI et al., 2010).

No presente estudo, a redução do BCAD aumentou a retenção (balanço) de Na e K em g/vaca/dia e em percentual do total consumido. Este resultado demonstra que os mecanismos fisiológicos de compensação da acidose metabólica foram eficientes em elevar a retenção de Na e K. Neste caso, o controle renal apresentou papel importante na conservação de Na e K no organismo das vacas, uma vez que com a redução do BCAD a excreção de Na e K na urina foi reduzida linearmente. Ao reduzir o BCAD de 290 para -71 mEq/kg de MS, a excreção de Na e K na urina foi reduzida em 89,69% e 46,06%, respectivamente. Resultados semelhantes foram relatados por Hu e Murphy (2004), que observaram associação positiva da relação Na:creatinina e K:creatinina com o aumento do BCAD. Este resultado demonstra que o aumento do BCAD elevou a excreção de Na e K na urina, contribuindo para a retenção destes minerais para compensação da acidose metabólica.

Diferentemente da excreção urinária, a secreção de Na e K no leite não foi alterada pelo BCAD. Este resultado pode ser associado a menor produção de leite das vacas de acordo com a redução do BCAD (Tabela 5), resultado este decorrente do menor consumo de matéria seca com a inclusão de sais aniônicos na dieta (Tabela 4). Desta forma, o aumento de Na e K no sangue, e, conseqüentemente, a maior disponibilidade deste mineral para a produção de leite pode ocorrer de forma associada a menor produção de leite devido a redução do BCAD, o que, no presente estudo, possivelmente resultou em ausência de efeito do BCAD sobre a secreção de Na e K pelo leite.

4.5 CONCLUSÃO

No presente estudo, pode-se concluir que o pH ruminal é elevado linearmente de acordo com o aumento da positividade do BCAD, o que eleva a digestão ruminal da fibra

dietética, indicada pelo aumento da concentração de ácido acético do fluido ruminal e da digestibilidade aparente total da FDN. Além de alterações digestivas, o aumento do BCAD eleva o pH sanguíneo e reduz a reabsorção renal e a eficiência de utilização do Na e do K para a produção de leite. Com o aumento do pH sanguíneo, as concentrações de Na, K e de Ca do sangue e, conseqüentemente, do leite são reduzidas. Portanto, o aumento do BCAD reduz a eficiência de utilização de cátions para a produção de leite, porém, ao elevar o pH sanguíneo, o aumento da positividade do BCAD pode reduzir a concentração láctea de cátions bivalentes, o que pode contribuir para manter o leite estável durante os processos térmicos industriais.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, M. S. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 7, p. 1447–1462, 1997.
- AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis**. 16. ed. Arlington, VA. Washington (USA): AOAC, 1995.
- APPER-BOSSARD, E.; FAVERDIN, P.; MESCHY, F.; PEYRAUD, J.L. Effects of dietary cation-anion difference on ruminal metabolism and blood acid-base regulation in dairy cows receiving 2 contrasting levels of concentrate in diets. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 4196–4210, 2010.
- BARROS, L.; DENIS, N.; GONZALEZ, A.; NÚÑEZ, A. Prueba del alcohol em leche y relación con calcio iónico. **Revista Prácticas Veterinarias**, v. 9, n. 2, p. 315, 1999.
- BERGMEYER, H. D. Methods of enzymatic analysis. **Stsrch**, v. 37, p. 33, 1985.
- 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.
- DELAQUIS, A. M.; BLOCK, E. The effects of changing ration ingredients on acid-base status, renal function, and macromineral metabolism. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 9, p. 2024-2039, 1995.
- 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.
- 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.
- FISHER, 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.
- HALL, M. B. **Neutral detergent-soluble carbohydrates**. Nutritional relevance and analysis. Gainesville: University of Florida, 2000. 76 p.

- HIROSH, T.; BLOCK, E. Effects of manipulating dietary cation-anion balance on macromineral balance in sheep. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 12, p. 4202-4214, 1991.
- HU, W.; MURPHY, M. R. Dietary cation-anion difference effects on performance and acid-base status of lactating dairy cows. A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 7, p. 2222-2229, 2004.
- HU, W.; MURPHY, M. R.; CONSTABLE, P. D.; BLOCK, E. Conclusions in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 7, p. 3355-3366, 2007.
- JACKSON, J. A.; AKAY, V.; FRANKLIN, S. T.; AARON, D. K. The effect of cation-anion difference on calcium requirement, feed intake, body weight, and blood gases and mineral concentration of dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 1, p. 147-153, 2001.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas**. 2. ed. Piracicaba: Associação Brasileira para a Pesquisa da Potássio e do Fósforo, 1997. 319 p.
- 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.
- 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.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7. rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, DC., 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.
- ORTOLANI, E. L. Diagnóstico e tratamento de alterações ácido-básicas em ruminantes. In: SIMPÓSIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA DA REGIÃO SUL DO BRASIL, 1., 2003, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003. p.17-29.
- 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.
- ROSS, J. G.; SPEARS, J. W.; GARLICH, J. D. Dietary electrolyte balance effects on performance and metabolic characteristics in growing steers. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 7, p. 1842-1848, 1994.
- SALLES, M. S. V.; ZANETTI, M. A.; DEL CLARO, G. R.; NETTO, A. S.; FRANZOLIN, R. Avaliação de colheita de líquido ruminal por fístula ou sonda esofágica em bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 4, p. 438-442, 2003.

SALLES, A.; RIBEIRO, T. M. C.; SARAN NETTO, 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, n. 2, p. 414-420, 2012.

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

SHARIF, M.; SHAHZAD, M. A.; MAHR-un-NISA; SARWAR, M. Dietary cation anion difference: Impact on productive and reproductive performance in animal agriculture. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 47, p. 7976-7988, 2010.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **iCE 3000 series atomic absorption spectrometers: operators manual**. Cambridge: Thermo Fisher Scientific, 2008.

TUCKER, W. B.; HARRISON, G. A.; HEMKEN, R. W. Influence of dietary cation-anion balance on milk, blood, urine, and rumen fluid in lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 2, p. 346-354, 1988.

TUCKER, W. B.; HOGUE, J. F.; WATERMAN, D. F.; SWENSON, T. S.; XIN, Z.; HEMKEN, R. W.; JACKSON, J. A.; ADAMS, G. D.; SPICER, L. J. Role of sulfur and chloride in the dietary cation-anion balance equation for lactating dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 1205-1213, 1991.

TUCKER, W. B.; XIN, B. Z.; HENKEN, R. W. Influence of calcium chloride on systemic acid-base status and calcium metabolism in dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 4, p. 1401-1409, 1991.

TUCKER, W. B.; HOGUE, J. F.; ADAMS, G. D.; ASLAM, M.; SHIN, I. S.; MORGAN, G. Influence of dietary cation-anion balance during the dry period on the occurrence of parturient paresis in cows fed excess calcium. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 4, p. 1238-1250, 1992.

UNDERWOOD, E. J.; SUTTLE, N. F. **The mineral nutrition of livestock**. 3th ed. Wallingford: CABI Publishing, 1999. 614 p.

WEST, J. W.; MULLINIX, B. G.; SANDIFER, T. G. Changing dietary electrolyte balance for dairy cows in cool and hot environments. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 3-6, p. 1662-1671, 1991.

WEST, J. W.; HAYDON, K. D.; MULLINIX, B. G.; SANDIFER, T. G. Dietary cation-anion balance and cation source effects on production and acid-base status of heat-stressed cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 10, p. 2776-2786, 1992.

WHEELER, W. E. **Importance of cation-anion balance in ruminant nutrition**. Nebraska: Science and Education Administration/ Agricultural Research Clay Center, 1980. p. 17-27.

WU, W. X.; LIU, J. X.; XU, G. Z.; YE, J. A. Calcium homeostasis, acid-base balance, and health status in periparturient Holstein cows fed diets with low cation-anion difference. **Livestock Science**, v. 117, n. 1, p. 7-14, 2008.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aumento do BCAD da dieta eleva o consumo de matéria seca, a digestão ruminal dos carboidratos fibrosos e mantém o pH sanguíneo próximo a homeostasia, o que contribui para elevar a produção de leite e os teores lácteos de gordura, lactose e de sólidos totais. Adicionalmente, além de contribuir com o aumento da produção no setor primário, o aumento do BCAD pode contribuir para elevar o rendimento industrial durante a produção de derivados lácteos, uma vez que a estabilidade do leite ao aquecimento térmico aumenta de acordo com o BCAD. Este resultado é importante especialmente para os países que utilizam processamentos térmicos intensos, como o UAT, para o processamento do leite.

Problemas com a baixa estabilidade do leite sem acidez resultante de ação microbiana ocorreram em várias regiões do Brasil e do mundo, mas as causas ainda não estão totalmente elucidadas, o que contribui com os grandes prejuízos que o leite instável não ácido causa à cadeia agroindustrial do leite. Com base nos resultados do presente estudo, o aumento do BCAD reduz a concentração láctea de cálcio iônico e, conseqüentemente, aumenta linearmente a estabilidade do leite ao etanol e ao aquecimento térmico. O aumento da concentração de cálcio iônico no leite pode reduzir as cargas negativas das micelas de caseína e a força de repulsão eletrostática entre elas, o que facilita a coagulação destas proteínas. Adicionalmente, o aumento da concentração láctea de cálcio iônico pode potencializar a reatividade da β -lactoglobulina com a κ -caseína na micela, o que pode facilitar a coagulação.

A acidificação dos fluídos corporais das vacas leiteiras é um distúrbio bastante comum nos sistemas de produção de leite, uma vez que pode ocorrer em resposta à redução do BCAD; decorrente da acidose ruminal; ou então resultante da alta taxa metabólica das vacas em lactação. Desta forma, as alterações metabólicas desencadeadas para manter o equilíbrio ácido base do sangue é um fator importante que pode contribuir para a alta ocorrência de leite instável não ácido. No presente estudo, a redução da estabilidade do leite foi linear quando o BCAD foi reduzido de 290 para -71 mEq/kg de MS, o que indica que mesmo em balanço positivo alterações metabólicas foram desencadeadas e reduziram a estabilidade do leite. Portanto, o aumento do BCAD pode contribuir para evitar problemas de ocorrência de leite instável não ácido por meio da manutenção do pH sanguíneo próximo a homeostasia, o que evita o aumento da concentração de cátions bivalentes do sangue e do leite.

Outros estudos conduzidos na região sul do Brasil (ZANELA et al., 2006; BARBOSA et al., 2009) indicaram que a deficiência de nutrientes também é um fator que pode reduzir a estabilidade do leite. Porém, em busca do atendimento da elevada exigência nutricional de vacas leiteiras, ao adicionar altas quantidades de concentrado associado à deficiência ou inadequado fornecimento de FDN efetivo e de alcalinizantes ou tamponantes na dieta de vacas leiteiras, a acidose metabólica pode ocorrer como resultado da acidose ruminal, o que também pode reduzir a estabilidade do leite. Desta forma, problemas com leite instável não ácido decorrentes de dietas desbalanceadas podem ocorrer tanto em pequenos rebanhos de baixa produção de leite e baixo nível tecnológico empregado (baixa disponibilidade de forragens durante o vazio forrageiro sem a disponibilidade de volumosos alternativos) quanto em grandes rebanhos de vacas de alta produção com adequada disponibilidade de alimentos (por meio da acidificação dos fluídos corporais decorrentes principalmente da acidose ruminal e/ou da alta taxa metabólica). Portanto, para prevenir a ocorrência de leite instável não ácido, a elevada demanda nutricional das vacas em lactação deve ser atendida com a utilização de alimentos concentrados; porém, medidas como o adequado fornecimento de FDN efetivo e uso de tamponantes e/ou alcalinizantes devem ser considerados para prevenir distúrbios digestivos e metabólicos e para aumentar o BCAD. Adicionalmente, trocas sem adaptação prévia de ingredientes (volumosos, concentrados e/ou de suplementos mineral/vitamínico) também devem ser evitadas para prevenir problemas digestivos e alterações no BCAD.

Por fim, no presente estudo foi observada média ($r= 0,45$; $P<0,01$) correlação entre o teste do álcool e o tempo de coagulação do leite ao aquecimento a 140° C. Este resultado indica a necessidade de estudos sobre a utilização de métodos alternativos ao teste do álcool para estimar a estabilidade térmica do leite de forma acurada e precisa. A identificação adequada de leite de baixa estabilidade pode reduzir os prejuízos no setor primário e industrial, contribuindo para maior eficiência econômica e sustentável da cadeia agroindustrial do leite. Adicionalmente, com testes mais acurados e precisos, as tomadas de decisão para implementação de medidas de correção dos problemas de instabilidade do leite poderão ter maiores chances de sucesso.

REFERÊNCIAS

- 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.
- BARBOSA, R. S.; FISHER, 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.; NUÑEZ, A. Prueba del alcohol en leche y relación con calcio iónico. **Revista Prácticas Veterinarias**, v. 9, n. 2, p. 315, 1999.
- BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Review Nutrition**, v. 23, p. 203-227, 2003.
- BEEDE, D. K. The DCAD concept: Transition rations for dry pregnant cows. **Feedstuffs**, n.26, p.12-19, 1992.
- BOTARO, B. G.; LIMA, Y. V. R.; AQUINO, A. A.; FERNANDES, R. H. R.; GARCIA, J. F.; SANTOS, M. V. Polimorfismo da beta-lactoglobulina não afeta as características físico-químicas e a estabilidade do leite bovino. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 42, n. 5, p. 747-753, 2007.
- BOTARO, B. G.; LIMA, Y. V. R.; CORTINHAS, C. S.; PRADA e SILVA, L. F.; RENNÓ, 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.
- BRASIL. Instrução Normativa Nº 62, De 29 De Dezembro De 2011. Alterar o caput, excluir o parágrafo único e inserir os §§ 1º ao 3º, todos do art. 1º, da Instrução Normativa MAPA nº 51, de 18 de setembro de 2002. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, Dez. 2011.
- BRASIL. Instrução Normativa nº51 de 18 de setembro de 2002. Aprova e oficializa o Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru e refrigerado. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 20 set. 2002. Seção 1, p. 13.
- BRASIL. Ministério de Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior - MDIC. Secretaria de Comércio Exterior, do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. **Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior – AliceWeb Mercosul**. 2014. Disponível em: <http://aliceweb.mdic.gov.br/>. Acesso em: 20 maio 2014.
- BYLUND, G. **Dairy Processing Handbook**. Tetra Pak® Processing Systems AB
- CAVALIERI, F. L. B.; SANTOS, G. T. **Balanco catiônico-aniônico em vacas leiteiras no pré-parto**. Artigos técnicos da série Nutrição e Manejo Animal do Núcleo Pluricliplinar de Pesquisa e Estudo da Cdeia Produtiva do Leite. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil. Disponível em: <http://www.nupel.uem.br/balanco.pdf>. Acesso em: 05 maio 2014.

CHAN, P. S.; WEST, J. W.; BERNARD, J. K.; FERNANDEZ, J. M. Effects of dietary cation-anion difference on intake, milk yield, and blood components of the early lactation cow. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 12, p. 4384-4392, 2005.

CHARBONNEAU, E.; PELLERIN, D.; OETZEL, R. Impact of lowering dietary cation-anion difference in non-lactating dairy cows: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 2, p. 537-548, 2006.

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. 346 p.

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.

DEGROOT, M. A.; BLOCK, E.; FRENCH, P. D. Effect of prepartum anionic supplementation on periparturient feed intake, health, and milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 11, p. 5268-5279, 2010.

DELAQUIS, A. M.; BLOCK, E. The effects of changing ration ingredients on acid-base status, renal function, and macromineral metabolism. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 9, p. 2024-2039, 1995.

DESOUZART, O. [Cenário da economia e do agronegócio brasileiro em 2014]. [Palestra]. In: Beef Summit Brasil, 2013, Ribeirão Preto. 2013.

DIMARTINS, 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.

FAIRBAIRN, D. J.; LAW, B. A. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. **Journal of Dairy Research**, v. 53, p. 139-177, 1986.

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.

FISHER, 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. 175 p.

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.

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

GAYNOR, P. J.; MUELLER, F. J.; MILLER, J. K.; RAMSEY, N.; GOFF, J. P.; HORST, R. L. Parturient hypocalcemia in Jersey cows fed alfalfa haylage based diets with different cation to anion ratios. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 10, p. 2525-2531, 1989.

GOFF, J. P. The monitoring, prevention and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. **Veterinary Journal**, v.176, p. 50-57, 2008.

GRÜNBERG, W.; DONKIN, S. S.; CONSTABLE, P. D. Periparturient effects of feeding a low dietary cation-anion difference diet on acid-base, calcium and phosphorus homeostasis and on intravenous glucose tolerance test in high-producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 2, p. 727-745, 2011.

HAMBLING, S. G.; MCALPINE, A. S.; SAWYER, I. **Beta-lactoglobulin**. In: FOX, P. F. (Ed). **Advanced dairy chemistry**. London: Elsevier Applied Science, 1992. v. 1, p. 141-189.

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.

HU, W.; MURPHY, M. R. Dietary cation-anion difference effects on performance and acid-base status of lactating dairy cows. A Meta-Analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 7, p. 2222-2229, 2004.

HU, W.; MURPHY, M. R.; CONSTABLE, P. D.; BLOCK, E. Conclusions in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 7, p. 3355-3366, 2007.

JARDON, P. W. Using urine pH to monitor anionic salt programs. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 17, n. 6, p. 860-866, 1995.

KONTOPIDIS, G.; HOLT, C.; SAWYER, L. Invited review: betalactoglobulin: binding properties, structure and function. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 4, p. 785-796, 2004.

LARSON, S. **We still need to shed light on the darkest place on earth**. Fort Atkinson, WI: Hoard's Dairyman, 2009. p. 210.

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

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.; 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.; 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.; ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R.; STUMPF JUNIOR, W.; FISCHER, V. Ocorrência do leite instável ao álcool 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.

MARTINEZ, N.; RICOS, C. A.; LIMA, F. S.; BISINOTTO, R. S.; GRECO, L. F.; RIBEIRO, E. S.; MAUNSELL, F.; GALVÃO, K. N.; SANTOS, J. E. P. Evaluation of peripartal calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 12, p. 7158-7152, 2012.

MELLAU, L. S. B.; JØRGENSEN, R. J.; BARTLETT, P. C.; ENEMARK, J. M. D.; HANSEN, A. K. Effect of anionic salt and highly fermentable carbohydrate supplementations on urine pH and on experimentally induced hypocalcaemia in cows. **Acta veterinaria scandinavica**, v. 45, p. 139-147, 2004.

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.

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.

MONGIN, P. Recent advances in dietary anion-cation balance: applications in poultry. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 40, n. 3, p. 285-295, 1981.

MOORE, S. J.; VANDEHAAR, M. J.; SHARMA, B. K.; PILBEAM, T. E.; BEEDE, D. K.; BUCHOLTZ, H. F.; LIESMAN, J. S.; HORST, R. L.; GOFF, J. P. Effects of altering dietary cation-anion difference on calcium and energy metabolism in peripartum cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 9, p. 2095-2104, 2000.

MUTSVANGWA, T.; GILMORE, J.; SQUIRES, J. E.; LINDINGER, M. I.; McBRIDE, B. W. Chronic metabolic acidosis increases mRNA levels for components of the ubiquitin-mediated proteolytic pathway in skeletal muscle of dairy cows. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 558-561, 2004.

NAGY, O.; KOVÁČ, G.; SEIDEL, H.; ZWEISSOVÁ, T. The effect of arterial blood sampling sites on blood gases and acid-base balance parameters in calves. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 49, n. 3, p. 331-340, 2001.

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

O'CONNELL, J. E.; SARACINO, P.; HUPPERTZ, T.; UNIAKE, T.; DE KRUIF, C. G.; KELLY, A. L.; FOX, P. F. Influence of ethanol on the rennet- induced coagulation of milk. **Journal of Dairy Research**, v. 73, n. 3, p. 312-317, 2006.

OETZEL, G. R.; BARMORE, J. A. Intake of a concentrate mixture containing various anionic salts fed to pregnant, nonlactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 6, p. 1617-1623, 1993.

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.

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.

ORTOLANI, E. L. Diagnóstico e tratamento de alterações ácido-básicas em ruminantes. In: SIMPÓSIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA DA REGIÃO SUL DO BRASIL, 1., 2003, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003. p. 17-29.

OVERTON, T. R.; WALDRON, M. R. Nutritional management of transition dairy cows: strategies to optimize metabolic health. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. E105–E119, 2004. Supplement.

PALMQUIST, D. L.; BEAULIEU, A. D.; BARBANO, D. M. Feed and animal factors influencing milk fat composition. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 6, p. 1753-1771, 1993.

PALMQUIST, D. L.; JENKINS, T. C. Fat in lactation rations: review. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 1, p. 1-14, 1980.

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.

RAMOS-NIEVES, J. M.; THERING, B. J.; WALDRON, M. R.; JARDON, P. W.; OVERTON, T. R. Effects of anion supplementation to low-potassium prepartum diets on macromineral status and performance of periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 11, p. 5677-5691, 2009.

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.

ROBITAILLE, G. Influence of kappa-casein and beta-lactoglobulin genetic variants on the heat stability of milk. **Journal of Dairy Research**, v. 62, n. 4, p. 593-600, 1995.

ROCHE, J. R.; DALLEY, D.; MOATE, P.; GRAINGER, C.; RATH, M.; O'MARA, F. A low dietary cation-anion difference precalving and calcium supplementation post calving increase plasma calcium but not milk production in a pasture-based system. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 8, p. 2658-2666, 2003.

SANCHEZ, W. K.; BEEDE, D. K. CORNELL, J. A. Interactions of sodium, potassium and chloride on lactation, acid-base status and mineral concentrations. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 6, p. 1661-1675, 1994.

SANCHEZ, W. K.; BEEDE, D. K. Is there an optimal cation-anion difference for lactation diets? **Animal Feed Science and Technology**, v. 59, n. 1-3, p. 3-12, 1996.

SANCHEZ, W. K.; BLAUWICKEL, R. **Prevention of milk fever by application of dietary cation-anion balance concept. Cooperative extension.** Washington: State University, Subject code 130A, 1994. p. 1-8.

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

SHARIF, M.; SHAHZAD, M. A.; MAHR-un-NISA; SARWAR, M. Dietary cation anion difference: impact on productive and reproductive performance in animal agriculture. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 47, p. 7976-7988, 2010.

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.

STUMPF, M. T.; FISHER, 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.

SUTTON, J. D. Altering milk composition by feeding. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 10, p. 2801-2814, 1989.

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, 2003. v. 1.

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.

TSIOULPAS, A.; GRANDISON, A. S.; LEWIS, M. J. Changes in physical properties of bovine milk from the colostrums period to early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 11, p. 5012-5017, 2007.

TUCKER, W. B.; HARRISON, G. A.; HEMKEN, R. W. Influence of dietary cation-anion balance on milk, blood, urine, and rumen fluid in lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 2, p. 346-354, 1988.

TUCKER, W. B.; XIN, B. Z.; HENKEN, R. W. Influence of calcium chloride on systemic acid-base status and calcium metabolism in dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 4, p. 1401-1409, 1991.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Leche y productos lácteos: tecnología, química y microbiología**. Zaragoza: Editorial Acria, 1995. 474 p.

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

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, n. 5, p. 835-840, 2006.

ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R.; FISCHER, V. 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.