ANDREA MELLO FRANCO ROSENFELD

Retenção láctea: fator etiológico predisponente às inflamações da
glândula mamária de bovinos.

Características físico-químicas, celulares e microbiológicas do leite

São Paulo
2005

ANDREA MELLO FRANCO ROSENFELD

Retenção láctea: fator etiológico predisponente às inflamações da glândula
mamária de bovinos.

Características físico-químicas, celulares e microbiológicas do leite

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Clínica Veterinária da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Medicina Veterinária

Departamento:
Clínica Médica

Área de concentração:
Clínica Veterinária

Orientador:
Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel

São Paulo
2005

confido p/ Efr
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
15/2/05

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 1480
FMVZ

Rosenfeld, Andrea Mello Franco

Retenção láctea: fator etiológico predisponente às inflamações da glândula mamária de bovinos. Características físico-químicas, celulares e microbiológicas do leite / Andrea Mello Franco Rosenfeld. – São Paulo : A. M. F. Rosenfeld, 2005.
128 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, 2005.

Programa de Pós-graduação: Clínica Médica.
Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel.

1. Retenção láctea. 2. Fator predisponente. 3. Mastite animal.
4. Constituintes do leite. I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: ROSENFELD, Andrea Mello Franco

Título: Retenção láctea: fator etiológico predisponente às inflamações da glândula mamária de bovinos. Características físico-químicas, celulares e microbiológicas do leite

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

Eu dedico este trabalho aos meus pais pela presença constante na minha vida e pelos princípios ensinados que marcaram minha personalidade

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel pela sua dedicação, paciência e muito carinho por esta tese e pela minha pessoa

Ao meu marido Fernando Galis pela paciência e compreensão durante este período

Agradecimentos

À Edilaine e Milton pela ajuda com os animais e nas colheitas do material

À Cláudia Regina Stricagnolo pela sua ajuda e participação indispensável e fundamental para realização desta tese.

Ao Prof. Dr. Pierre Soares pela ajuda na confecção dos dados e na realização da análise estatística

À Alice Maria Melville Paiva Della Libera pela sua presença forte na minha vida profissional e pessoal e pela sua capacidade de orientar e direcionar nas horas necessárias.

À Regina Mieko Sakata Mirandola pelos ensinamentos, treinamentos constantes, perseverança e pela amizade.

À Paula Andréa de Santis Bastos pela ajuda de grande importância na parte experimental

À Edna Santana por ajudar na limpeza e organização do material de laboratório

RESUMO

ROSENFELD, A. M. F. **Retenção láctea**: fator etiológico predisponente às inflamações da glândula mamária de bovinos. Características físico-químicas, celulares e microbiológicas do leite. [Milk retention: etiologic factor predisposing mammary gland of bovines to inflammatory processes. Physical-chemical, cellular and microbiological characteristics of milk]. 2005. 128 f. Dissertação (Mestrado Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

As mamites ou mastites, processos inflamatórios da glândula mamária, foram consideradas responsáveis por grandes prejuízos na pecuária leiteira; para a instalação das mamites considerou-se ser necessária a interação de dois fatores etiológicos fundamentais. Os fatores etiológicos predisponentes a instalação de um processo inflamatório da glândula mamária podem ser divididos em: condições ligadas à fisiologia dessa glândula (descida do leite, aumento do volume de leite residual e velocidade de ordenha); condições relacionada à estrutura anatômica do úbere e favorecendo a ocorrência de traumatismos (alterações morfológicas da mama, incluindo os tetos, edema e congestão mamária) e associação a condições predisponentes ligados a enfermidades sistêmicas ou da própria mama (afecções, infestações e infecções). A perfeita descida do leite permite uma adequada ordenha da vaca, restando nestas circunstâncias apenas um pequeno volume de secreção láctea nas cisternas da glândula e no sistema de ductos galactóforos, favorecendo a higidez do órgão. A retenção de maior volume de leite nos ductos e ácinos glandulares foram consideradas por si só indutora de inflamação do tecido epitelial de revestimento interno da mama, sendo por isso considerado significativo fator predisponente à colonização e desenvolvimento de infecções bacterianas intramamárias. Objetivou-se avaliar a influência da retenção láctea nos constituintes físico-químicos, bioquímicos, celulares e

microbiológicos da secreção da glândula mamária de bovinos. As vacas utilizadas nesta pesquisa foram selecionadas em um rebanho criado e mantido no Estado de São Paulo (Natividade da Serra), produtor de leite e cujo manejo leiteiro utiliza o sistema manual de ordenha, com duas ordenhas diárias. As vacas selecionadas permitiram a formação de três grupos experimentais seguir: Grupo Experimental - G1, vacas submetidas a 10% de retenção de leite; Grupo Experimental - G2, vacas submetidas a 15% de retenção de leite e Grupo Experimental - G3, vacas submetidas a 20% de retenção de leite. Os parâmetros lácteos estudados foram as determinações físico-químicas (pH, eletrocondutividade, concentração de cloretos e cálculo do índice cloreto/lactose); dosagens bioquímicas do leite (teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais); caracterização das células somáticas (avaliação indireta do número de células e contagem eletrônica dessas células) e; avaliação microbiológica das amostras de leite. A análise dos resultados obtidos permitiu concluir que: a retenção láctea determinou variações significativas na constituição físico-químicas, bioquímicas e microbiológica do leite; os valores da eletrocondutividade, das concentrações lácteas de cloreto, do índice cloreto/lactose e a frequência de isolamentos bacteriológicos positivos aumentaram significativamente com o aumento do período de retenção; em contraposição os teores lácteos de lactose diminuíram; os valores dos teores de cloreto e índice cloreto/lactose aumentaram de forma diretamente proporcional ao aumento do volume da retenção láctea, os demais parâmetros foram influenciados pela retenção, independentemente do volume de leite retido; o número de células somáticas do leite não sofreu variações que pudessem ser atribuídas à retenção láctea; porém a avaliação qualitativa da celularidade determinada pelo CMT demonstrou que a retenção láctea determinava o aparecimento de escores de maior magnitude, retornando aos escores iniciais

negativos após a supressão da retenção; a retenção láctea, independentemente do seu volume, determinou aumento marcante da frequência de isolamentos bacteriológicos positivos, e em muitos casos, o isolamento ocorria, também, após a supressão da retenção láctea; comprovou-se a existência de correlação positiva e significativa entre as seguintes variáveis estudadas: teor de cloreto e eletrocondutividade; índice cloreto/lactose e teor de cloreto; índice cloreto/lactose e eletrocondutividade e; concentração de sólidos totais e de gordura. A correlação foi negativa e significativa entre: teor de lactose e eletrocondutividade e concentração de lactose e cloreto; as manifestações clínicas da retenção láctea, detectadas pela determinação de alterações dos elementos constituintes do leite e a frequência de isolamentos, caracterizou um processo inflamatório incipiente, representando um fator etiológico predisponente à ocorrência de mastites; pelo desempenho das provas utilizadas para a avaliação dos efeitos da retenção láctea na secreção da glândula mamária, recomendou-se para complementação do exame físico da mama a realização dos seguintes exames subsidiando o diagnóstico clínico: prova do CMT, determinações da eletrocondutividade, dos teores de cloreto e lactose, com cálculo do índice cloreto/lactose e isolamento microbiológico com identificação das cepas bacterianas isoladas.

Palavras chave: Retenção Láctea. Fator predisponente. Mastite Animal. Constituintes do leite

ABSTRACT

ROSENFELD, A. M. F. **Milk retention**: etiologic factor predisposing mammary gland of bovines to inflammatory processes. Physical-chemical, cellular and microbiological characteristics of milk. [Retenção láctea: fator etiológico predisponente às inflamações da glândula mamária de bovinos. Características físico-químicas, celulares e microbiológicas do leite]. 2005. 128 f. Dissertação (Mestrado Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

Mastitis, the inflammatory process of the mammary gland is responsible for great losses in dairy production. Factors that predispose the mammary gland to mastitis may be divided into: conditions connected to the physiology of milk (milk release, increase in the volume of residual milk and speed of milking); conditions related to the anatomy of the udder, favoring the occurrence of injuries (morphological changes of the udder and teats, mammary edema and congestion); association with predisposing conditions of systemic or mammary diseases (illnesses, infestation and infections). The perfect release of milk enables adequate milking of the cow. In this kind of circumstance, little residual milk is present in the cistern of the gland and in galactophorous ducts, leading to a healthy udder. Retention of greater volume in ducts and glandular acini have been considered, *per se*, as capable of inducing inflammation of internal epithelial tissue of the mammary gland, and because of this, retention milk is considered as a significant predisposing factor to the colonization and development of intramammary bacterial infections. The objective of the present trial was to evaluate the influence of milk retention on physical-chemical, biochemical, cellular and microbiological characteristics of bovine milk. Animals used in the present study were selected from a herd bred and kept in the state of Sao Paulo, in the city of Natividade da Serra. Cows were milked manually twice a day. Three experimental groups were formed: G1, with 10% of milk

retention; G2, with 15% of milk retention and G3, with 20% of milk retention. The following physical-chemical parameters were studied (pH, electroconductivity, chloride concentration and chloride / lactose rate); biochemical analyses were: fat, protein, lactose and total solid contents; somatic cell characterization (indirect evaluation of the number of cells and electronic cell count) and microbiological evaluation of the samples. The analysis of the results enabled the following conclusions: milk retention determined significant variations in the physical-chemical, biochemical and microbiological characteristics of the milk. Electroconductivity, chloride content, chloride / lactose rate and frequency of samples positive in bacterial isolation significantly increased with greater milk retention periods. On the other hand, increase in milk retention volume led to decreased lactose content and increased chloride content and chloride / lactose rate. The rest of the parameters were influenced by retention, no matter the volume of milk retained. The number of somatic cells in milk was not affected in a way that changes could be attributed to milk retention. However, the qualitative evaluation of cells as determined by CMT demonstrated that milk retention determined greater scores, and initial negative scores were obtained with the suppression of retention. Milk retention, no matter the volume, determined a marked increase in the frequency of positive bacterial isolation, and in many cases, isolation also occurred after retention was suppressed. There was a positive and significant correlation between the following variables: chloride content and electroconductivity; chloride / lactose rate and chloride content; chloride / lactose rate and electroconductivity; total solid and fat content. Negative significant correlations were observed between lactose content and electroconductivity; and lactose and chloride contents. Clinical signs of milk retention as detected by changes in milk constituents and frequency of isolation demonstrated an incipient inflammatory

process, and milk retention was then considered to be a predisposing etiological factor to the occurrence of mastitis. Due to the performance of the tests used in the evaluation of the effects of milk retention in the mammary gland, it is recommended that in order to aid clinical diagnosis, physical examination of the udders should be performed together with CMT, electroconductivity, chloride and lactose contents, calculation of chloride / lactose rate and microbiological examination with identification of strains isolated.

Key words: Milk retention. Predisposing factor. Animal Mastitis. Milk constituents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Freqüência dos resultados do CMT, segundo a intensidade das reações (negativa, traços, 1+, 2+ e 3+) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 10% do volume produzido, por ordenha, distribuídas segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005.....	63
Figura 2-	Valores logarítmicos do número de células somáticas de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 10% do volume produzido, por ordenha, distribuídas segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005.....	64
Figura 3-	Freqüência do isolamento bacteriano (negativo ou positivo) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 10% do volume produzido, por ordenha, distribuídas segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005.	66
Figura 4-	Freqüência dos resultados do CMT, segundo a intensidade das reações (negativo, traços, 1+, 2+ e 3+) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 15% do volume produzido, por ordenha, distribuídas segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005.....	73
Figura 5-	Valores logarítmicos do número de células somáticas de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 15% do volume produzido, por ordenha, distribuídas segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005.....	75
Figura 6-	Freqüência dos resultados do isolamento bacteriano (negativo ou positivo) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 15% do volume produzido, por ordenha. Distribuída segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005.....	76
Figura 7-	Freqüência dos resultados do CMT, segundo a intensidade das reações (negativo, traços, 1+, 2+ e 3+) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 20% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momento e horas de colheita – São Paulo – 2005.....	83
Figura 8-	Valores logarítmicos do número de células somáticas de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 20% do volume produzido, por ordenha, distribuídas segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005.....	85

Figura 9-	Freqüência dos resultados do isolamento bacteriano (negativo ou positivo) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 20% do volume produzido, por ordenha. Distribuída segundo momentos e horas de colheitas – São Paulo – 2005.....	86
Figura 10-	Valores médios de pH de amostras de leite de vacas submetidas à retenção láctea de 10, 15 e 20% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005.....	89
Figura 11-	Valores médios da eletrocondutividade (mS/cm) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção láctea de 10, 15 e 20% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005.....	89
Figura 12-	Valores médios do teor de cloreto (mg/dl) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção láctea de 10, 15 e 20% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005.....	90
Figura 13-	Valores médios da relação cloreto/lactose de amostras de leite de vacas submetidas à retenção láctea de 10, 15 e 20% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005.....	90
Figura 14-	Valores médios gordura (g/dl) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção láctea de 10, 15 e 20% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005.....	91
Figura 15-	Valores médios proteína (g/dl) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção láctea de 10, 15 e 20% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005.....	91
Figura 16-	Valores médios lactose (g/dl) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção láctea de 10, 15 e 20% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005.....	92
Figura 17-	Valores médios sólidos totais (g/dl) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção láctea de 10, 15 e 20% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005.....	92

Figura 18-	Número de células somáticas – transformação logarítmica em base 10 de amostras de leite de vacas submetidas à retenção láctea de 10, 15 e 20% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005.....	93
Figura 19-	Frequência (%) do isolamento bacteriano de amostras de leite de vacas submetidas à retenção láctea de 10, 15 e 20% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005.....	93
Figura 20-	Correlação entre a eletrocondutividade e os teores de cloreto em amostras de vacas submetidas à retenção láctea – São Paulo - 2005.....	97
Figura 21-	Correlação entre os teores de cloreto e lactose em amostras de vacas submetidas à retenção láctea – São Paulo - 2005.....	98
Figura 22-	Correlação entre os teores de gordura e sólidos totais em amostras de vacas submetidas a retenção láctea – São Paulo - 2005.....	98
Figura 23-	Correlação entre eletrocondutividade e os teores lactoses em amostras de vacas submetidas a retenção láctea – São Paulo – 2005.....	99
Figura 24-	Correlação entre os teores cloreto e relação cloreto/lactose em amostras de vacas submetidas a retenção láctea – São Paulo – 2005.....	99
Figura 25-	Correlação entre eletrocondutividade e relação cloreto/lactose em amostras de vacas submetidas a retenção láctea – São Paulo – 2005.....	100

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Caracterização dos momentos de colheita das amostras de leite e horas de retenção láctea na glândula mamária de bovinos – São Paulo - 2005.....	48
Quadro 2-	Coeficientes de correlação entre os parâmetros: eletrocondutividade. Cloreto, pH, gordura, proteína, lactose, sólidos totais, índice cloreto/lactose e número de células somáticas de amostras de leite de vacas submetidas a retenção láctea – São Paulo – 2005.....	50
Quadro 3-	Coeficientes de correlação entre os parâmetros: eletrocondutividade. cloreto, pH, gordura, proteína, lactose, sólidos totais, índice cloreto/lactose e número de células somáticas de amostras de leite de vacas submetidas à retenção láctea – São Paulo – 2005.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Resultados das determinações do pH, eletrocondutividade, teor de cloreto e relação cloreto/lactose, distribuídos segundo os momentos de colheita de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 10% do volume produzido, por ordenha. Valores expressos em termos médios e desvio padrão – São Paulo – 2005.....	58
Tabela 2-	Resultados da determinação dos teores gordura, proteína, lactose e sólidos totais, distribuídos segundo os momentos de colheita, de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 10% do volume produzido, por ordenha. Valores expressos em termos médios e desvio padrão – São Paulo – 2005.....	60
Tabela 3-	Frequência dos resultados do CMT, segundo a intensidade das reações (negativo, traços, 1+, 2+ e 3+) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 10% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005.....	62
Tabela 4-	Resultados da avaliação do Número de Células Somáticas (expressos em valores log em base 10), distribuídos segundo momentos e horas de colheita, de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 10% do volume produzido, por ordenha. Valores expressos em termos médios e desvios padrão – São Paulo – 2005.....	64
Tabela 5-	Frequência de isolamento bacteriano (resultados expressos como negativo ou positivo) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 10% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005.....	65
Tabela 6-	Resultados das determinações do pH, eletrocondutividade, teor de cloreto e relação cloreto/lactose, distribuídos segundo os momentos de colheita, de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 15% do volume produzido, por ordenha. Valores expressos em termos médios e desvio padrão – São Paulo – 2005.....	68
Tabela 7-	Resultados da determinação dos teores gordura, proteína, lactose e sólidos totais, distribuídos segundo momentos de colheita, de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 15% do volume produzido, por ordenha. Valores expressos em termos médios e desvios padrão – São Paulo – 2005.....	70

Tabela 8-	Freqüência dos resultados do CMT, segundo a intensidade das reações (negativo, traços, 1+, 2+ e 3+) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 15% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005.....	72
Tabela 9-	Resultados da avaliação do Número de Células Somáticas (expressos em valores log na base 10), distribuídos segundo os momentos e horas de colheita, de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 15% do volume produzido, por ordenha. Valores expressos em termos médios e desvios padrão – São Paulo – 2005.....	74
Tabela 10-	Freqüência dos resultados do isolamento bacteriano (negativo ou positivo) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 15% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005.....	76
Tabela 11-	Resultados das determinações do pH, eletrocondutividade, teor de cloreto e relação cloreto/lactose, distribuídos segundo momentos e horas de colheita, de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 20% do volume produzido, por ordenha. Valores expressos em termos médios e desvios padrão – São Paulo – 2005..	78
Tabela 12-	Resultados da determinação dos teores lácteos, de gordura, proteína, lactose e sólidos totais, distribuídos segundo momentos e horas de colheita, de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 20% do volume produzido, por ordenha. Valores expressos em termos médios e desvio padrão – São Paulo – 2005...	80
Tabela 13-	Freqüência dos resultados do CMT, segundo a intensidade das reações (negativo, traços, 1+, 2+ e 3+) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 20% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005.....	82
Tabela 14-	Resultados do número de Células Somáticas (expressos em logarítmico em base 10), distribuídos segundo momento e horas de colheita, de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 20% do volume produzido, por ordenha. Valores expressos em termos médios e desvios padrão – São Paulo – 2005.....	84

Tabela 15-	Freqüência dos resultados do isolamento bacteriano (negativo ou positivo) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 20% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005.....	86
Tabela 16-	Constituição físico-química, bioquímica, celular e microbiológica do leite de vacas submetidas à retenção láctea de 10, 15 e 20%. Valores expressos em termos médios e desvio padrão – São Paulo – 2005.....	88

SUMÁRIO

	Páginas
1 INTRODUÇÃO	23
1.1 OBJETIVO.....	26
2 REVISÃO DA LITERATURA	27
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	27
2.2 PARAMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DO LEITE.....	30
2.3 PARAMETROS CELULARES DO LEITE.....	37
2.4 PARAMETROS MICROBIOLÓGICOS DO LEITE.....	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	42
3.2 FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	42
3.3 EXAME CLÍNICO DA GLÂNDULA MAMÁRIA.....	43
3.3.1 Exame Físico do Úbere	43
3.3.2 Exame Macroscópico do Leite	44
3.4 COLHEITA DAS AMOSTRAS DE LEITE.....	45
3.4.1 Colheita de Amostras de Leite Antes da Ordenha	46
3.4.2 Colheita de Amostras de Leite Depois da Ordenha	46
3.5 EXAME DO LEITE.....	48
3.5.1 Provas para Avaliação do Número de Células Somáticas no Leite	49
3.5.1.1 <i>California Mastitis Test – CMT</i>	49
3.5.1.2 Contagem Eletrônica do Número de Células Somáticas.....	51

3.5.2	Exames Físico-Químicos do Leite.....	51
3.5.2.1	Determinação da Concentração Hidrogeniônica (pH).....	51
3.5.2.2	Determinação da Eletrocondutividade no Leite.....	52
3.5.2.3	Determinação dos Valores de Cloreto no Leite.....	52
3.5.2.4	Determinação dos Teores de Lactose, Gordura, Proteína e Sólidos Totais no Leite.....	53
3.5.2.5	Determinação do Índice Cloreto/Lactose no Leite.....	54
3.6	EXAMES MICROBIOLÓGICOS DO LEITE.....	54
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
4	RESULTADOS.....	57
4.1	DETERMINAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, BIOQUÍMICA, CELULAR E MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE LEITE DE VACAS COM 10% DE RETENÇÃO LÁCTEA (GRUPO 1).....	57
4.1.1	Determinações Físico-Químicas.....	57
4.1.2	Avaliação da Constituição Bioquímica das Amostras Lácteas Colhidas dos Animais do Grupo Experimental 1 – G1.....	59
4.1.3	Avaliação das Características Celulares das Amostras Lácteas Colhidas dos Animais do Grupo Experimental 1 – G1.....	61
4.1.4	Avaliação das Características Microbiológicas das Amostras Lácteas Colhidas dos Animais do Grupo Experimental 1 – G1.....	65
4.2	DETERMINAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, BIOQUÍMICA, CELULAR E MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE LEITE DE VACAS COM 15% DE RETENÇÃO LÁCTEA (GRUPO 2).....	67
4.2.1	Determinações Físico-Químicas.....	67

4.2.2	Avaliação da Constituição Bioquímica das Amostras Lácteas Colhidas dos Animais do Grupo Experimental 2 – G2.....	69
4.2.3	Avaliação das Características Celulares das Amostras Lácteas Colhidas dos Animais do Grupo Experimental 2 – G2.....	71
4.2.4	Avaliação das Características Microbiológicas das Amostras Lácteas Colhidas dos Animais do Grupo Experimental 2 – G2.....	75
4.3	DETERMINAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, BIOQUÍMICA, CELULAR E MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE LEITE DE VACAS COM 20% DE RETENÇÃO LÁCTEA (GRUPO 3).....	77
4.3.1	Determinações Físico-Químicas.....	77
4.3.2	Avaliação da Constituição Bioquímica das Amostras Lácteas Colhidas dos Animais do Grupo Experimental 3 – G3.....	79
4.3.3	Avaliação das Características Celulares das Amostras Lácteas Colhidas dos Animais do Grupo Experimental 3 – G3.....	82
4.3.4	Avaliação das Características Microbiológicas das Amostras Lácteas Colhidas dos Animais do Grupo Experimental 3 – G3.....	85
4.4	RESULTADO PARA AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA INFLUÊNCIA DO VOLUME DA RETENÇÃO LÁCTEA SOBRE OS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS, BIOQUÍMICOS, CELULARES E MICROBIOLÓGICOS DO LEITE.....	87
4.5	AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE OS CONSTITUINTES DO LEITE DE AMOSTRAS DE VACAS SUBMETIDAS A RETENÇÃO.....	96
5	DISCUSSÃO.....	101
5.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	101

5.2	AVALIAÇÃO DA CONSTITUIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, BIOQUÍMICA, CELULAR E MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS LÁCTEAS COLHIDAS DOS ANIMAIS DO GRUPO EXPERIMENTAL 1 – G1.....	103
5.3	AVALIAÇÃO DA CONSTITUIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, BIOQUÍMICA, CELULAR E MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS LÁCTEAS COLHIDAS DOS ANIMAIS DO GRUPO EXPERIMENTAL 2 – G2.....	108
5.4	AVALIAÇÃO DA CONSTITUIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, BIOQUÍMICA, CELULAR E MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS LÁCTEAS COLHIDAS DOS ANIMAIS DO GRUPO EXPERIMENTAL 3 – G3.....	113
5.5	AVALIAÇÃO DA CONSTITUIÇÃO DO LEITE DURANTE A RETENÇÃO LÁCTEA DE 10, 15 E 20% E ESTABELECIMENTO DA CORRELAÇÃO DESSAS VARIÁVEIS.....	117
6	CONCLUSÃO	121
	REFERÊNCIA.....	124

1 INTRODUÇÃO

As mamites ou mastites, processos inflamatórios da glândula mamária, foram consideradas responsáveis por grandes prejuízos na pecuária leiteira (COSTA et al, 2001; PHILPOT, 1984; SCHALM et al, 1957; SINGH & SINGH, 1994). A origem, manutenção e evolução desse processo inflamatório das estruturas internas da glândula mamária, relacionadas ou causadas por alterações de natureza infecciosa, traumática, alérgica e metabólica, bem como outras condições fisiológicas específicas ou de manejo de criação causadora de processos inflamatórios, podem caracterizar-se por distúrbios da secreção láctea, com modificação da constituição do leite e manifestações típicas de inflamação: tumor; calor; dor; rubor e perda da função. Mas para a instalação das mamites considerou-se ser necessária a interação de dois fatores etiológicos fundamentais: os fatores predisponentes, que facilitam a instalação e desenvolvimento dos agentes bacterianos e; os fatores determinantes representados, particularmente, por agentes bacterianos patogênicos (BIRGEL, 1982; BIRGEL, 2004; COSTA, 1991;). Os fatores etiológicos predisponentes a instalação de um processo inflamatório da glândula mamária podem ser divididos em: condições ligadas à fisiologia dessa glândula (descida do leite, aumento do volume de leite residual e velocidade de ordenha); condições relacionada à estrutura anatômica do úbere e favorecendo a ocorrência de traumatismos (alterações morfológicas da mama, incluindo os tetos, edema e congestão mamária) e associação a condições predisponentes ligados a enfermidades sistêmicas ou da própria mama (afecções, infestações e infecções) (BIRGEL, 1982; BIRGEL, 2004).

A perfeita descida do leite permite uma adequada ordenha da vaca, restando nestas circunstâncias apenas um pequeno volume de secreção láctea nas cisternas da glândula e no sistema de dutos galactóforos, favorecendo a higidez do órgão. A descida do leite, em vacas sadias em condições normais de manejo, deve-se à ação da ocitocina, liberada por via reflexa (estímulos da ordenha) do lóbulo posterior da hipófise. Esse hormônio, responsável pela contração das células mioepiteliais, que envolvem os ácinos secretores, por tal razão ele foi considerado responsável pela adequada descida do leite. Todavia, em situações de dor, estresse ou infecções sistêmicas, a glândula supra renal libera adrenalina, cuja ação se antepõe àquela da ocitocina, desfavorecendo a descida do leite. A atuação deletéria da adrenalina dificultando o processo de ordenha determinaria retenção de maior volume de leite residual. A retenção de maior volume de leite nos dutos e ácinos glandulares foram consideradas por si só indutora de inflamação do tecido epitelial de revestimento interno da mama, sendo por isso considerado significativo fator predisponente à colonização e desenvolvimento de infecções bacterianas intramamárias (BIRGEL, 1982; COSTA; REINEMANN, 2004; NICKERSON, 1994).

O leite ordenhado possui algumas frações distintas por sua constituição e características, apesar das discrepâncias de denominações em São Paulo têm-se considerado a existência de quatro frações: leite de retenção; leite da ordenha plena; leite residual e leite complementar (BIRGEL, 1982). **O leite de retenção**, corresponde à fração láctea acumulada nas cisternas da glândula e dos tetos entre as ordenhas, sendo caracterizada por apresentar maior número de bactérias e de células somáticas; **o leite da ordenha plena** representa maior fração láctea, correspondendo ao volume do leite total produzido. No final da ordenha, o perfeito manejo exige a apuração dos procedimentos de ordenha, obtendo-se fração láctea

denominada genericamente de leite de esgotamento, e no contexto da vida dos pecuaristas do gado leiteiro essa pequena fração é a obtida no repasse das vacas (BIRGEL, 1982; COSTA; REINEMANN, 2004; SCHMIDT; GOFF, 1967). O **leite residual** representa o volume de secreção láctea, não retirada da glândula mamária mesmo após ordenhas realizadas em condições ideais, mas volume dessa fração depende diretamente das normas de ordenha. Ao se tornar necessária à obtenção do leite residual, utiliza-se um artifício farmacológico aplicando-se por via endovenosa uma dose de ocitocina e, após 10 minutos reordena-se a vaca (BIRGEL, 1982; OSTENSSON, 1993). Em contraposição, **o leite complementar** corresponde a uma fração do leite que não pode ser extraída da glândula no ato da ordenha, qualquer que seja o artifício utilizado seu volume é clinicamente indeterminado, sendo uma característica constitucional, todavia variaria segundo a produção animal e o tamanho de seu úbere (BIRGEL, 1982).

Apesar de inúmeras situações relacionadas à fisiologia da glândula mamária serem, facilmente conceituadas, às vezes existe grande dificuldade em se elucidar e interpretar a fisiopatologia das infecções da mama, face à complexidade da mamite, considerando suas inúmeras etiologias e formas clínicas, bem como a magnitude das respostas fisiológicas a essas inflamações, dificultando o estabelecimento do diagnóstico clínico, e a variabilidade da eficácia da terapia e controle dessa enfermidade (HARMON, 1994).

1.1 OBJETIVO

O objetivo primordial do delineamento experimental desta pesquisa foi de avaliar a composição físico-químicas do leite (potencial hidrogeniônico – pH, eletrocondutividade, teores de cloreto, lactose, gordura, proteína e cálculo do índice cloreto/lactose), bem como avaliando as contagens celulares do leite, associadas às características microbiológicas do leite de glândulas mamárias sadias e após retenção de leite; evidenciando a ocorrência de distúrbios da secreção láctea, característica no processo inflamatório de origem não infecciosa da glândula mamária, constituindo-se em real fator etiológico predisponente à instalação de mamites de origem infecciosa.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A glândula mamária foi considerada um sistema orgânico fechado, pois o leite elaborado em complexo processo fisiológico não poderia ser removido do interior de suas cavidades e dutos galactóforos sem o auxílio de uma força, determinando aumento da pressão interna positiva, forçando a passagem do leite através do orifício do teto (SCHALM et al, 1971). Além do mais, são fatos bem conhecidos que a manipulação dos tetos e outros estímulos relacionados com a ação da ordenha causem impulsos nervosos sensoriais ativadores do sistema nervoso central, liberando ocitocina do lóbulo posterior glândula pituitária. Após alguns minutos, esse hormônio, transportado, por via sangüínea, atingiria a glândula mamária, determinando a contração das células mioepiteliais que envolvem os ácinos secretores, causando a movimentação do leite no interior do sistema galactóforo. A ocitocina, simultaneamente, determinaria o relaxamento do esfíncter do “ductus papilaris”, facilitando a ordenha. Em más condições de saúde (dor, estresse, medo ou enfermidades sistêmicas) a supra-renal seria estimulada, com conseqüente liberação de adrenalina, que tem ação aposta á descrita para ocitocina e mesmo não sendo a adrenalina considerada como farmacologicamente antagônica à ocitocina não permite a adequada descida do leite e nesta

circunstância não ocorre a descida do leite em condições ideais, sendo a ordenha inadequada, com retenção de maior volume de leite (BIRGEL, 1999; SCHALM et al, 1971; THOMPSON et al, 1973;).

Há uma grande variedade de tipos de classificação e denominações das frações do leite: Urech et al. (1999) dividiram o leite produzido numa ordenha em cinco diferentes frações (leite de retenção, leite principal, leite de esgotamento, leite residual e uma fração que denominou de “young milk”, que talvez correspondesse à fração que denominamos leite complementar), enquanto Paape e Tucker (1966) reconheceram e denominaram as seguintes frações: leite primário, representando os primeiros 20ml da ordenha, leite de esgotamento e leite complementar.

Na presente dissertação de mestrado utilizou-se a seguinte classificação das frações do leite produzido numa ordenha: o leite de retenção, que ficou armazenado na cisterna da glândula mamária (*sinus galactoforos*) e na cisterna do teto (*sinus lactifer*) entre duas ordenhas; sendo essa fração a mais utilizada no exame clínico do úbere e nas investigações sobre mastite; o leite da ordenha plena, representando a maior fração láctea, obtida na fase intermediária, quando se ordenha o grande volume de leite produzido pela vaca; o leite de esgotamento ou repasse, corresponde à uma fração obtida no final da ordenha, representando os últimos jatos da ordenha; no repasse procura-se deixar menor volume de leite na mama; mas mesmo assim permanece no interior dos dutos galactóforos uma considerável quantidade de leite com alto teor de gordura, que não pode ser removido pelo método usual de ordenha, mesmo

em condições ideais, constituindo o leite residual e o leite complementar representaria uma porção do leite residual que não pode ser extraído do úbere mesmo após a aplicação de uma dose complementar de ocitocina (BIRGEL, 1982; GOFF; SCHMIDT, 1967; ISAKSSON; ARNARP, 1988; SCHALM; NOORLANDER, 1971; ÖSTENSSON, 1993).

O volume de leite residual pode ser obtido e mensurado pela administração de ocitocina intravenosa ou subcutânea, determinando nova descida do leite, permitindo, então, a ordenha do leite residual. O volume de leite residual obtido após ordenha em condições ideais, associado à administração suplementar de ocitocina, corresponde em média valores que variam de 12,8% a 14,0% do volume total do leite produzido numa ordenha (SCHALM et al, 1971). Mas uma ordenha agressiva, realizada em condições adversas ou inadequadas poderia aumentar em até 70,0% o volume de leite residual (RUSHEN et al, 1999) e, assim sendo, além da produção láctea ser menor, o volume de leite residual aumentaria de forma exuberante, pois o período de tempo de duração da ação da ocitocina ou sua ação seriam insuficientes para a adequada e total ordenha. Essa anormalidade da ordenha foi relatada como ocorrência indesejável principalmente, quando a vaca fosse manejada em locais estranhos e em circunstâncias com as quais a vaca não estivesse habituada (RUSHEN et al, 2001). Portanto, nas referidas situações a deficiência na lactação estaria diretamente associada ao aumento do leite residual. Essa fração láctea permaneceria armazenada no úbere após a rotineira ordenha, não estando associada a alterações anatômicas do

órgão determinada por traumas ou distúrbios de desenvolvimento da mama (MURUGAIYAH et al, 2001).

2.2 PARAMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DO LEITE

O valor do pH do leite de vacas sadias foi caracterizado por apresentar uma pequena acidez, que segundo Schalm et al (1971) seria decorrente da presença de grupos ácidos de proteínas, citratos e fosfatos livres em sua fase líquida, variando o pH desses animais entre 6,5 a 6,7. Além do mais, as alterações da permeabilidade capilar observadas durante o desenvolvimento de processos inflamatórios dos tecidos da glândula mamária determinariam, segundo os mencionados pesquisadores, modificações da composição do leite, principalmente, aumento de íons de bicarbonato, fator determinante do aumento do pH do leite de vacas com mamite, sendo esse aumento diretamente proporcional à severidade e intensidade das lesões.

Todavia, a determinação do pH lácteo foi considerada uma metodologia de valor limitado para o diagnóstico das mamites, não sendo suficientemente sensível para discriminar todas as formas clínicas das inflamações da glândula mamária (GORDON et al, 1980; SCHALM et al, 1971;). Realmente, na mesma linha de pensamento Ashworth et al. (1967), destacaram dificuldades para utilizar os valores de pH como um teste isolado para o diagnóstico da mamite, pois as diferenças entre os resultados obtidos em leite de animais sadios e de vacas com

mamite seriam de pequena magnitude e não teriam capacidade discriminatórias para, isoladamente, permitir o reconhecimento das inflamações da mama.

A condutividade elétrica foi conceituada como sendo a capacidade de um material, em estado sólido, líquido ou gasoso conduzir a corrente elétrica, sendo o valor da condutividade elétrica obtida pela relação entre voltagem e a amperagem, expressando-se sua grandeza em unidade Siemens por centímetros. A eletrocondutividade no leite se relaciona diretamente à quantidade total de íons presentes na amostra, na sua determinação atuariam fundamentalmente os íons de cloro, sódio e potássio, e em menor proporção dos íons de cálcio, magnésio e fosfatos. Conseqüentemente, qualquer variação na composição iônica do leite foi considerada como fator determinante de alteração da capacidade dessa secreção conduzir corrente elétrica (FERNANDO et al., 1982).

Kangasniemi et al. (1986) consideraram padrões para animais sadios valores de eletrocondutividade no leite variando entre 4,73 e 4,84 mS/cm; todavia D'Angelino *et al.* (1988) observaram, no leite de vacas sadias, criadas em São Paulo, valor médio de eletrocondutividade igual a $5,1 \pm 0,6$ mS/cm; contudo os valores obtidos e referidos por Hillerton e Walton (1991) foram, ainda, maiores, variando entre 5,4 a 5,6 mS/cm.

O uso das determinações dos teores lácteos de cloreto e suas variações como teste de diagnóstico das mamites foi inicialmente ressaltado por Bryan e Trout (1935) que ao analisarem as concentrações de cloreto em amostras de leite de vacas com mamites encontraram valores maiores do que os observados no leite de animais sadios, ressaltando que essa alteração tornava o leite salgado.

Além do mais, verificaram que as variações dos teores lácteos de cloreto eram influenciadas não só pela fase da lactação e da produção leiteira, mas também pela extensão da lesão do tecido secretor da mama. Para os referidos pesquisadores os valores encontrados em animais sadios, representando um padrão de referência, valores variando de 100 a 140 mg/dl.

A lactose, um dissacarídeo formado a partir da glicose e galactose, é considerada o componente mais estável do leite, correspondendo a aproximadamente 52% do extrato seco desengordurado, estando seu conteúdo diretamente relacionado com o volume de leite produzido, sendo responsável, juntamente, com o cloro, sódio e potássio, pelo controle da pressão osmótica da secreção láctea dos bovinos (SCHALM et al ,1971).

Em quartos mamários de bovinos não afetados por mamites, Vanlandigham et al. (1941), encontraram valores médios de lactose de $4,788 \pm 0,007$ g/dl. Porém, Schalm et al. (1971) consideraram como normal de lactose no leite o valor médio de 4,7 g/dl. Em São Paulo, examinando leite de vacas da raça holandesa sadias, Cunha (1988) referiu intervalo de 5,23 a 5,7 g/dl como valores de lactose láctea, considerando-o com o valor padrão de referência em vacas sadias. Berning e Shook (1992) verificaram que os valores de lactose em amostras de leite, nas quais não houve isolamento bacteriano o valor médio era igual a $4,92 \pm 0,25$ g/dl.

O menor conteúdo de lactose no leite de animais com mamite resultariam da diminuição na síntese de lactose, por diminuição no fluxo sanguíneo disponibilizando menor quantidade de glicose para sua síntese. Todavia, a diminuição da concentração láctea de lactose, poderia ser conseqüente à

alteração da atividade enzimática celular, assim como a possibilidade de reabsorção de parte da lactose produzida (KITCHEN, 1981). Por tais razões a determinação quantitativa do teor lácteo de lactose foi considerada excelente meio auxiliar para o clínico estabelecer o diagnóstico das mamites (RENER, 1975).

O índice cloreto/lactose no leite ou número de Koestler, obtido pela divisão dos valores de cloreto pelos valores de lactose e multiplicando o quociente por 100, com o resultado expresso em porcentagem (%). Desde 1941, alterações significativas no conteúdo de lactose e cloreto lácteo foram associadas à mamite. Pois, ao se considerar que algumas glândulas mamárias, nas quais houve evidente diagnóstico de mamite não se demonstraram evidentes alterações da composição láctea, foi realçado que para melhoria da precisão do diagnóstico da mamite o estabelecimento de um índice seria preferível às determinações isoladas dos teores de lactose ou de cloreto, pois as variações anormais da composição láctea seriam mais evidentes na relação entre os teores de cloreto e a lactose, estabelecendo o índice Koestler do que as observadas, isoladamente, em cada um desses componentes do leite (VANLANDINGHAM et al., 1941). A primeira referência sobre a determinação do índice cloreto/lactose em amostras de leite de vacas sadias foi realizada por Vanlandingham et al. (1941), que consideraram como padrão valores médios iguais a $2,61 \pm 0,027\%$. Todavia, Ferreiro et al. (1980) obtiveram resultados significativamente menores em amostras de leite colhidas de glândula mamárias sadias, sendo os valores iguais a 2,09%.

Em 1988, Cunha não verificou diferença entre os valores do índice cloreto/lactose determinado em amostras de leite pertencentes a diferentes frações

da ordenha: leite de retenção; da fase intermediária e; leite de esgotamento ou repasse. Os valores, desse índice, obtidos em amostras de leite de retenção, na fração intermediária da ordenha e de esgotamento foram, respectivamente $1,93 \pm 0,48\%$, $2,23 \pm 0,88\%$ e $2,00 \pm 0,59\%$.

A gordura do leite é composta principalmente por triglicérides, sendo 50% da gordura sintetizada nos ácinos da glândula mamária tendo como substrato os ácidos graxos de cadeia curta - acetato e beta hidroxibutirato, produzidos a partir da fermentação de carboidratos no rúmem. Os demais 50% da gordura láctea proviriam de síntese a partir de ácidos graxos de cadeia longa obtidos diretamente da dieta, sem sofrerem alterações no trato digestivo ou, então por mobilização da reserva orgânica de gordura. Por tais razões, os valores de referência para os teores de gordura no leite foram considerados de complexa determinação, pois, além de sofrerem variações intrínsecas, relacionadas ao metabolismo individual, dependeria da dieta e manejo nutricional do animal (CARVALHO, 2000).

Aproximadamente 90% da proteína total do leite é composta pela caseína e outras frações protéicas, principalmente, α lactoalbumina e β lactoalbumina, as quais são sintetizadas no úbere a partir de aminoácidos essenciais e não essenciais provenientes da circulação sangüínea. Mas deve-se ressaltar que a produção das proteínas lácteas está relacionada à disponibilidade de carboidratos fermentescíveis e proteínas degradáveis fornecidas pela alimentação e metabolizadas no rúmem, formando, inicialmente a proteína microbiana ou disponibilizando aminoácidos essenciais, principalmente, metionina e lisina, absorvidos no intestino. Os restantes 10% da proteína total são constituídos por várias frações protéicas e, principalmente

de albumina e globulinas séricas (SCHALM et al., 1971). Os valores de proteína total referidos como padrões de referência por Carvalho (2000), Roy (1980) e Schalm et al. (1971) para o leite de vacas sadias, não devem ser menores que 3 g/dl.

Os sólidos totais compreendem o conteúdo de gorduras, proteínas e outras frações nitrogenadas, açúcares e cinzas do leite e o teor médio em vacas holandesas é igual a 12,7 g/dl (LARANJA DA FONSECA; VEIGA SANTOS, 2000).

A variação do intervalo entre ordenhas ocasiona, tanto alterações no volume de secreção láctea como nos constituintes dessa secreção, com destaque aos teores de sódio, cloreto, potássio, gordura, proteína total, caseína e lactose, sendo que essa ação persistente por um período de tempo variável, até retorno a normalidade. Os diferentes efeitos da mencionada modificação do manejo de ordenha nos constituintes do leite se manifestariam por aumento da concentração de sódio, cloreto e proteína do leite e diminuição dos teores de lactose e de potássio, como demonstraram Wheelock et al. (1966) e Harmon (1994).

O acúmulo de leite no úbere determinaria, em algumas instâncias, aumento relativo e absoluto da concentração láctea de sódio, cloreto, e com significativo aumento do teor de proteínas de origem sangüínea originárias de alterações inflamatórias intramamárias. Ainda foi ressaltado por Schalm et al. (1971) e Harmon (1994) que a maior fonte de sódio e cloreto do leite ocorreria por transudação originária de fluido extracelular, processo que teria maior intensidade nas vacas com retenção da secreção láctea no úbere (HARMON, 1994; SCHALM et al., 1971).

Algumas observações demonstraram que a omissão da ordenha aumentou a concentração láctea de gordura, de proteína total, de cloretos e número de células somáticas avaliadas pelo CMT, com pequena diminuição nos sólidos totais e da lactose. Os maiores efeitos foram visualizados após um período de 24 a 36 horas de omissão da ordenha e conseqüentemente retenção total do leite no úbere, mas depois de uma semana de retorno ao sistema rotineiro de ordenha os mencionados parâmetros retornavam aos valores determinados antes da omissão da ordenha (NATZKE et al, 1965).

Holdaway et al. (1996) demonstraram a ocorrência de diferença da composição do leite em diferentes fases da ordenha para o número de células somáticas, pH, concentração de sódio, potássio e lactose, porém sem determinar variação significativa na eletrocondutividade dessa secreção. Entretanto, segundo Vangroenweche et al. (2002) as determinações da constituição láctea de amostras colhidas em vários momentos da ordenha demonstraram variação significativas dos teores de gordura, proteína e lactose, não detectando, entretanto, diferenças significativas dos teores de sódio, potássio e cloreto.

Pesquisas conduzidas por Hamann e Zecconi (1998) e Hamann e Gyodi (2000) demonstraram que a eletrocondutividade era influenciada, moderadamente, pela concentração láctea da proteína, gordura e lactose, sendo também, dependente da fração do leite utilizada para a mensuração. Além disso, segundo Fernando et al. (1982) e Hamann e Gyodi (2000) a eletrocondutividade foi considerada como a prova mais sensível para diagnosticar inflamações intramamárias em amostras de

leite de esgotamento, do que nas amostras lácteas referentes aos primeiros jatos da ordenha.

2.3 PARAMETROS CELULARES DO LEITE

Nas amostras de leite proveniente de vacas sadias observa-se a presença de um conjunto de células, representadas, principalmente, por leucócitos e células epiteliais de descamação, em conjunto formando o sistema genericamente denominado de células somáticas do leite. Os leucócitos provêm do sangue por diapedese para o tecido mamário, onde devem fazer o controle preliminar das agressões que sofre o referido tecido. Assim sendo, as células somáticas constituíram, particularmente os leucócitos, a barreira de defesa celular, enquanto que as células epiteliais resultantes da descamação do revestimento epitelial dos dutos galactóforos e ácinos glandulares. Por isso, a expressão contagem de células somáticas, inclui tanto os leucócitos, como de células derivadas da descamação epitelial (ARAUJO, 1994).

Pela contagem de células somáticas (CCS) determina-se o número total de células presentes no leite, sendo expressa em número de células por mililitro. As variações desse número de células podem, tanto indicar uma condição fisiológica da glândula mamária ou então, um mecanismo de defesa do tecido mamário a uma agressão, provocada geralmente por um patógeno (DOHOO; MEEK, 1982;

KENNEDY et al, 1982; KIRK, 1984;SCHALM et al, 1971). As inflamações de origem infecciosa foram consideradas como principal fator que influenciaria o significativo aumento das células somáticas no leite (BRITO et al, 1997; HARMON, 1994). Atualmente, o aumento do número de células somáticas (NCS) foi relacionado à resposta celular imune depois de estímulo inflamatório, por isso foi usada e recomendada como um marcador da saúde do úbere e da qualidade do leite (O'BRIEN et al., 1999; VANGROENWECHE et al, 2002). Além do mais, o número de células somáticas do leite caracteriza a integridade da barreira orgânica de defesa que se coloca entre o úbere e o sangue (HAMANN, 2002), podendo esta contagem variar, consideravelmente, nas diferentes frações do leite de uma ordenha (HARMON, 1994; HOLDAWAY et al., 1996; ÖSTENSSON et al., 1988; PAAPE e TUCKER, 1966; VANGROENWECHE et al, 2002), Nesta linha de pensamento, Harmon (1994) e Schalm e Noorlander (1971) sugeriram que o número de células somáticas, expresso pelo NCS/ml e o score do *Califórnia Mastitis Test* (CMT) eram maiores nos primeiros e últimos jatos antecedendo e sucedendo, a fase intermediária da ordenha, do que o número avaliado em amostras de leite colhidas nesta fase. Östensson (1993), Holdaway et al. (1996) e Rushen et al. (1999) apresentaram resultados concordantes com as afirmações mencionadas anteriormente, demonstrando que o número de células somáticas era significativamente maiores nos últimos jatos de leite do que nos primeiros, sendo, evidentemente, maiores no leite residual. Complementando, a avaliação Hamann e Gyodi (2000) demonstraram ocorrência de diferenças entre a celularidade das amostras da ordenha da manhã e a realizada à tarde, detectando maior número de

células somáticas no leite residual.

O exame do leite pelo CMT - *California Mastitis Test* como recomendaram Schalm e Noorlander (1957) foi considerado capaz de detectar alterações iniciais do processo inflamatório na glândula mamária, evidenciando o aumento do número de células somáticas, principalmente leucócitos polimorfonucleares neutrófilos (COSTA et al., 1996). Além disso, a correlação entre o número de células no leite e a intensidade de reação com o CMT, permitiu concluir que o resultado positivo dessa prova seria eficiente indicador qualitativo do aumento da celularidade láctea, podendo ser executado com facilidade e rapidez ao pé da vaca (COSTA et al., 1996; THIERS et al., 1999). Outra vantagem do uso rotineiro, por técnico capacitado, do CMT foi observada na triagem de vacas leiteiras na linha de ordenha, com identificação de animais com distúrbio da secreção láctea, selecionar amostras que devem ser submetidas a exames laboratoriais precisos para o diagnóstico das mamites e servir de base para organização de linhas de ordenha em rebanhos de grande risco (BRITO et al, 1997).

O aumento significativo do número de células somáticas de leite tem sido, em pesquisas específicas, associado à diminuição de concentrações lácteas de lactose, lactoalbumina, gordura por ocorrer concomitante diminuição da capacidade do tecido glandular de sintetizar esses constituintes, como foi descrito por Harmon (1994).

Além do mais, alguns constituintes do leite como potássio, cloreto e lactose e mesmo a magnitude da eletrocondutividade apresentariam diferenças

estatisticamente significativas quando determinadas em amostras de leite, com pequeno ou grande número de células somáticas (HAMANN, 2002).

2.4 PARAMETROS MICROBIOLOGICOS DO LEITE

O exame microbiológico de amostras de leite permite detectar a presença de uma infecção, responsável pela a instalação e desenvolvimento de uma mamite (COSTA et al, 1996). E, essas inflamações da glândula mamária originadas pela ação de agentes bacterianos determinariam aumento significativo do número de células somáticas no leite (COSTA et al., 1996; DOHOO; MEEK, 1982; HARMOM, 1994; SCHALM et al., 1971). Em complementação, a literatura compulsada demonstrou que o aumento do número de células somáticas estaria diretamente relacionada ao grau de patogenicidade do agente infecciosos determinante da mamite (SANDHOLM; MATTILA, 1986), como também à resposta orgânica do animal doente a determinado tipo de lesão anátomo-patológica (BENITES, 1996; COSTA et al., 1996). Todavia, a determinação do número de células somáticas e sua maior ou menor intensidade não permitiria diferenciar o microrganismo causador da inflamação (NATZE et al., 1972; WARD; SCHULTZ, 1972).

A interação entre os efeitos da infecção de estruturas internas da glândula mamária na fração do leite de uma ordenha foi considerada significativa na expressão dos resultados da eletrocondutividade e do pH. Mas de maneira semelhante os resultados da contagem de células somáticas de leite colhido de glândulas mamárias não infectados apresentariam maior celularidade nos jatos finais da ordenha, chegando a praticamente ser igual ao dobro do resultado obtido na

fração láctea intermediária da ordenha. Entretanto, para a eletrocondutividade e pH lácteo considerando os quartos acometidos por processo inflamatório infeccioso encontrou-se aumento de apenas 25,0% (HOLDAWAY, et al., 1996). Todavia, foi destacado na literatura referida que a eletrocondutividade foi moderadamente influenciada pela concentração láctea de alguns constituintes do leite: teores de proteínas; lipídeos e lactose; ao passo que demonstrou significativas variações de resultados por influência da concentração láctea de sais inorgânicos e dos íons liberados. As variações consideradas também estariam na dependência da fração do leite analisada (HAMANN; ZECCONI, 1998; WOOLFORD et al., 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

As vacas utilizadas nesta pesquisa foram selecionadas em um rebanho criado e mantido no Estado de São Paulo (Natividade da Serra), produtor de leite e cujo manejo leiteiro utiliza o sistema manual de ordenha, com duas ordenhas diárias. Para adequado delineamento experimental foram utilizados 29 animais, considerados clinicamente sadios dentro dos padrões e normas recomendadas e aceitas pelo Hospital de Bovinos do Departamento de Clínica Médica – HOVET/FMVZ-USP e que não tinham sido submetidos a tratamento intramamário na presente lactação.

3.2 FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

As 29 vacas selecionadas permitiram a formação de três grupos experimentais denominados G1, G2 e G3 e dos quais foram colhidas 812 amostras de leite distribuídas, como se detalhou a seguir:

Grupo Experimental - G1. Esse grupo foi constituído por 10 vacas submetidas a 10% de retenção de leite e das quais foram colhidas 280 amostras de leite.

Grupo Experimental - G2. Grupo formado por 9 vacas submetidas a 15% de retenção de leite e dos quais foram colhidas a 252 amostras de leite

Grupo Experimental - G3. Esse terceiro grupo experimental foi constituído por 10 vacas submetidas a 20% de retenção de leite, e das quais foram colhidas 280 amostras de leite.

3.3 EXAME CLÍNICO DA GLÂNDULA MAMÁRIA

O exame clínico da glândula mamária comportando, tanto o exame físico das estruturas anatômicas do úbere, como também as características e constituintes do leite, foi realizado segundo Birgel (2004).

3.3.1 Exame Físico do Úbere

A avaliação clínica da glândula mamária foi realizada por exames semiológicos, tanto os exames físicos das estruturas do úbere como das características do leite. O úbere das vacas incluídas nesta pesquisa foi, previamente, avaliado por inspeção e palpação, dentro dos padrões e normas recomendadas e aceitas pelo Hospital de Bovinos do Departamento de Clínica Médica – HOVET/FMVZ-USP e de seu Centro de Pesquisa de Enfermidades de Ruminantes - CPDER, examinando-se a conformação e implantação das glândulas mamárias, a pele que recobre o úbere e os tetos, parênquima da glândula e estruturas internas: *ductos papilaris*, *sinus lactíferos* e *sinus papilaris*. As manifestações clínicas

observadas foram registradas, destacando-se, entretanto que as vacas que apresentavam alterações patológicas significativas da glândula mamária que pudessem interferir com a produção leiteira ou com os resultados da pesquisa seriam descartadas.

3.3.2 Exame Macroscópico do Leite

Após o exame físico da glândula mamária, foram avaliadas as características organolépticas, utilizando para tanto a prova da Caneca Telada ou de Fundo Escuro, segundo recomendações preconizadas por Birgel (1982) e Birgel (2004), observando-se cor, consistência e presença de massas ou grumos no leite, e características macroscópicas do leite realizando a prova do CMT (*Califórnia Mastitis Test*) para avaliação indireta da celularidade do leite. Essas provas serviriam, basicamente, para triagem dos animais, selecionando-os para a inclusão nos grupos experimentais. Todavia, essas provas de avaliação da qualidade do leite foram repetidas, durante todo o período experimental e realizadas antes da colheita das amostras para realização das determinações bioquímicas e exames microbiológicos do leite.

3.4 COLHEITA DAS AMOSTRAS DE LEITE

No procedimento de colheita das amostras e de acordo com o delineamento experimental, inicialmente, foi avaliado o volume de leite produzido pela vaca em cada uma das ordenhas. Essa avaliação foi determinada em cada um dos quartos mamários, por ordenha manual em recipientes graduados, separados e isolados. Após a ordenha, por aplicação de ocitocina por via intra-venosa, foi determinado o volume do leite residual de cada quarto por ordenha manual e em recipientes graduados e separados.

Após a medição do volume de leite produzido pelos animais de cada grupo, ou seja, o volume de leite ordenhado mais o volume do leite residual, calculou-se o volume de leite que deveria ser ordenhado de cada um dos quartos do úbere, para poder-se fazer a retenção de acordo com o planejamento proposto no projeto de pesquisa, formando os grupos experimentais com vacas retendo 10, 15 e 20% do leite produzido.

Os recipientes de ordenha foram previamente identificados com as abreviações AD, PD, AE e PE (respectivamente, quartos anterior e posterior direito; anterior e posterior esquerdo) e no momento da colheita eram marcados com lápis dermatográfico até o volume correto do leite a ser ordenhado, deixando assim no úbere com 10, 15 ou 20% de leite retido, de acordo com o Grupo Experimental – G1, G2 e G3.

3.4.1 Colheita de Amostras de Leite Antes da Ordenha

De acordo com o delineamento experimental, colheram-se amostras antes e depois da ordenha. Na colheita de leite que antecedia a ordenha, os tetos eram inicialmente imersos em solução anti-séptica (solução de iodo glicerinado) e secos com papel toalha individual e em seguida realizava-se a prova de coagem do leite em placa de fundo escuro, segundo Birgel (1982), observando a cor, consistência e presença de massas ou grumos no leite ordenhado. Após a realização dessa prova, executava-se a anti-sepsia do teto e do orifício do teto com algodão embebido em álcool 70%. Foram colhidas, em frascos estéreis com tampa de rosca, as amostras para o exame microbiológico de acordo com as recomendações do *National Mastitis Council* (HARMON et al., 1990). Estas amostras foram transportadas refrigeradas para o Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP, onde os exames programados eram realizados.

3.4.2 Colheita de Amostras de Leite Depois da Ordenha

Após a colheita da amostra para o exame microbiológico obedecendo ao delineamento experimental proposto, iniciava-se a ordenha do leite nos recipientes graduados, os quais estavam, previamente, marcados com o volume que deveria ser ordenhado, como fora anteriormente definido. Depois de finalizada a ordenha os tetos eram, novamente, imersos em solução anti-séptica (solução de iodo com

glicerina). Do volume total de leite obtido na ordenha e contido nos recipientes correspondentes a cada quarto mamário ordenhado, foram colhidas as amostras para análises físico-químicas, contagem de células somáticas (avaliação qualitativa pelo *Califórnia Mastitis Test* – CMT e contagem eletrônica das células somáticas).

Em primeiro lugar, foram realizadas as colheitas das amostras, que constituíram o grupo controle, isto é, antes de ser provocada a retenção láctea nos quartos mamários, considerado como , momento inicial ou 1 (um), servindo de base para análise comparativa dos resultados. A partir deste momento, a cada ordenha, que eram intervaladas por 12 horas, as vacas eram ordenhadas até o volume definido pelo planejamento da pesquisa e para que houvesse a retenção de leite na glândula mamária, conforme detalhado no quadro 1. O procedimento de retenção láctea foi interrompido após o momento 6 (60 horas de retenção). Uma semana após o início do experimento e 108 horas após a supressão da retenção láctea foi realizada nova colheita de leite dos animais, e os resultados das análises realizadas constituíram o momento 7 e serviram para avaliação comparativa dos efeitos da supressão da retenção láctea, nos constituintes da secreção láctea.

Momentos	Horas da retenção	Período da ordenha
1	inicial	manhã
2	12	tarde
3	24	manhã
4	36	tarde
5	48	manhã
6	60	tarde*
7	168**	manhã

*supressão da retenção; ** uma semana após o início da retenção láctea e após 9 ordenhas (108 horas após a supressão da retenção).

Quadro 1 – Caracterização dos momentos de colheita das amostras de leite e horas de retenção láctea na glândula mamária de bovinos – São Paulo- 2005.

3.5 EXAME DO LEITE

Após o exame físico da glândula mamária, realizavam-se as provas macroscópicas de triagem no leite das vacas incluídas nos vários grupos experimentais, avaliando as características organolépticas e físico-químicas, bem como a celularidade do leite, para a seguir serem colhidas às amostras do leite, como descrito anteriormente.

3.5.1 Provas para Avaliação do Número de Células Somáticas no Leite

A avaliação do número de células somáticas do leite foi realizada de forma qualitativa pela prova do CMT e a determinação quantitativa por contagem eletrônica.

3.5.1.1 *California Mastitis Test* – CMT

Na propriedade, onde as vacas eram criadas, imediatamente após o exame semiológico do úbere, era realizada a avaliação indireta da celularidade do leite de cada glândula mamária pelo CMT, como descrito por Schalm e Noorlander (1957). Para tanto, 2 ml de leite, recolhidos nas raquetes específicas para a realização da prova, adicionava-se igual quantidade do reagente Fatec®, específico para a execução da prova CMT. Após a homogeneização da amostra observava-se a ocorrência de modificações físico-químicas da mistura, por sua gelificação, coagulação, aparecimento de grumos e modificação da coloração, bem como avaliando-se o grau da intensidade da reação. A intensidade da reação foi determinada em cinco graus, caracterizados pelo aumento da viscosidade da mistura, obedecendo às recomendações dos pesquisadores que idealizaram a prova, resumindo a forma e significado da avaliação no quadro 2 (SCHALM et al., 1971).

<i>Escore</i> da reação	Descrição da Reação	Interpretação dos resultados
<i>Negativo</i>	A mistura permanece líquida após a homogeneização dos componentes da reação.	<200.000 células/ml das quais até 25% são leucócitos polimorfonucleares.
T Traços	Discreto aumento da viscosidade, mas sem tendência a formação de gel. A viscosidade se esvae com a movimentação contínua da mistura.	150.000 a 550.000 células/ml das quais 30 a 40% são leucócitos polimorfonucleares.
1+ Fracamente positivo	Há aumento da viscosidade sem tendência à formação de gel, o que deixa o centro do receptáculo descoberto durante a movimentação circular da mistura. A interrupção dos movimentos faz com que a mistura se distribua sobre o receptáculo, cobrindo seu fundo.	400.000 a 1.500.000 células /ml das quais 40 a 60% são leucócitos polimorfonucleares
2+ Nitidamente positivo	A mistura viscosa ocasiona, imediatamente a formação de gel, que deixa o centro do receptáculo descoberto durante a movimentação. Interrompida a movimentação em círculos a mistura se espalha homogeneamente sobre toda a base do receptáculo; evidenciando-se estrias viscosas ao se inclinar a raquete.	800.000 a 5.000.000 células/ml das quais 60 a 70% são leucócitos polimorfonucleares
3+ Fortemente positivo	Ocorre gelificação imediata e evidente com abaulamento no centro do receptáculo durante a movimentação. Convexidade que se mantém, mesmo depois de cessados os movimentos de homogeneização. A viscosidade da mistura é espessa e aderida ao fundo do receptáculo.	Contagem celular maior do que 5.000.000 células/ml, das quais 70 a 80% são polimorfonucleares.

Quadro 2 – Interpretação da Prova *California Mastitis Test*–CMT (SCHALM et al, 1971)

3.5.1.2 Contagem Eletrônica do Número de Células Somáticas

As amostras de leite eram aquecidas em banho maria a 38°C durante 15 minutos, a seguir homogeneizadas e analisadas por citometria de fluxo, utilizando o equipamento SOMACOUNT 500 da Empresa Bentley Instruments Inc.

3.5.2 Exames Físico-Químicos do Leite

As amostras de leite colhidas na fazenda onde os animais eram mantidos, adequadamente embaladas e conservadas eram enviadas aos laboratórios onde seriam manipuladas e realizados os exames. Para tanto utilizavam-se os serviços de dois laboratórios especializados: Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP e Laboratório da Fisiologia da Lactação da ESALQ-USP.

3.5.2.1 Determinação da Concentração Hidrogeniônica (pH)

A determinação da concentração hidrogeniônica do leite foi realizada utilizando-se um potenciômetro modelo B 474 da Micronal, previamente calibrado para a temperatura ambiente e com soluções de pH 7,0 e pH 4,0.

3.5.2.2 Determinação da Eletrocondutividade no Leite

A determinação da eletrocondutividade das amostras lácteas foi efetuada utilizando o aparelho Milku Mastitron, que mede a capacidade dos íons cloro, sódio e potássio, existentes no leite, conduzirem corrente elétrica. Antes do início das determinações, o equipamento era calibrado com uma solução de cloreto de potássio a 0,1 N, em temperatura constante de 25°C, sendo o resultado lido após o equipamento ser ajustado em 12,9 mS/cm.

As amostras de leite colhidas de cada uma das glândulas mamárias eram depositadas diretamente no receptáculo do equipamento, em quantidade suficiente (aproximadamente 10 ml) para cobrir os eletrodos aí localizados, permitindo que ocorresse a passagem da corrente elétrica, sendo a eletrocondutividade registrada e imediata e automaticamente transferida para um visor digital e o resultado expresso em mS/cm (miliSiemens por cm).

3.5.2.3 Determinação dos Valores de Cloreto no Leite

A determinação dos valores de cloreto no leite foi realizada, utilizando-se o analisador de cloretos modelo 925 da Corning. O aparelho analisador de cloretos constituído por circuito composto de eletrodos de prata, que ao receberem a descarga de corrente elétrica liberaria íons de prata numa taxa constante. A reação

se desenvolve em meio ácido, por essa razão, entre os reativos utilizava-se tampão ácido, quando os íons de prata liberados seriam precipitados pelo cloro livre.

Após a calibração do equipamento, uma alíquota de 100 µl de leite era adicionada a solução tampão ácida e, ao se acionar o equipamento os íons de cloro presentes no leite reagiam com a prata liberada em meio ácido formando o sal cloreto de prata. Simultaneamente era acionado o cronômetro, que avaliaria o consumo dos íons cloro presentes na solução tampão; o que se revelava com o aparecimento de íons prata livres, reconhecidos por eletrodo específico. Tal ocorrência interrompe a corrente elétrica responsável pela liberação dos íons de prata e desativa o cronômetro. O tempo de funcionamento do cronômetro é diretamente proporcional ao conteúdo de cloreto na amostra analisada, sendo os resultados expressos em nml/l e convertidos em mg/dl, nessa pesquisa, utilizando o fator 3,55.

3.5.2.4 Determinação dos Teores de Lactose, Gordura, Proteína e Sólidos Totais no Leite

As amostras de leite, inicialmente, eram mantidas em banho maria à 38°C durante 15 minutos, homogeneizadas manualmente, sendo a seguir submetidas às determinações dos valores de lactose, gordura, proteína e sólidos totais, por radiação infravermelha, utilizando-se o equipamento BENTLEY 2000*. Nessas determinações, a alíquota de leite era aspirada pelo equipamento BENTLEY 2000, e exposta à radiação infravermelha, provocando a emissão de ondas luminosas

absorvidas pelos constituintes do leite (lactose, gordura, proteína e sólidos totais), que apresentavam pico máximo de absorbância entre 2 µm e 15 µm, que seriam identificados e quantificados pelo equipamento. Os resultados foram expressos em g/dl.

3.5.2.5 Determinação do Índice Cloreto/Lactose no Leite

O índice cloreto/lactose foi obtido conforme preconizado por Vanlandingham et al. (1940) mediante a divisão do valor determinado para cloreto expresso em mg/dl, pelo valor da lactose, também expresso em mg/dl e multiplicado por 100, sendo os índices apresentados em porcentagem (%).

$$\text{Índice} = \frac{\text{Cloreto}}{\text{Lactose}} \times 100$$

3. 6 EXAMES MICROBIOLÓGICOS DO LEITE

No laboratório de microbiologia, as amostras foram semeadas em placas de Petri contendo meio de ágar-sangue com 5 % de sangue de carneiro e incubadas a 37° C por 24 e 48 horas. Após a incubação, nas culturas de leite que revelaram desenvolvimento bacteriano, foram realizadas as identificações dos microrganismos por provas bioquímicas descritas por Lennette et al. (1985), seguindo-se a classificação dos microrganismos, conforme critérios pré-estabelecidos pelo

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (KNEG; HOLT, 1994), porém na avaliação dos resultados foi considerada, apenas, a ocorrência de provas positivas (com isolamento bacteriano) e negativas (sem o isolamento bacteriano).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação das características das variáveis estudadas apresenta evidências seguras que as determinações de pH, eletrocondutividade, cloreto, lactose, gordura, proteína e sólidos totais apresentaram distribuição normal e, assim, passíveis de submeterem-se aos testes estatísticos paramétricos.

Todavia a contagem de células somáticas no leite não apresentou distribuição normal, sendo por isso necessária a conversão dos resultados em logarítimos na base de 10, para que os testes estatísticos paramétricos pudessem ser utilizados, em suas avaliações, como recomenda Ali E Shokk (1980).

Inicialmente, os resultados foram organizados em dois blocos, o primeiro constituído por aqueles destinados à análise descritiva empregadas na avaliação da dispersão de freqüência absolutas ou relativas; o segundo bloco foi constituído por resultados contínuos, sendo submetidos ao modelo ANOVA de análise estatística.

O programa computacional utilizado foi o SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, 2000), sendo primeiramente verificada a normalidade da distribuição dos resultados dos vários elementos constituintes do leite.

Os resultados da variável – número de células somáticas do leite não atendeu a premissa de normalidade e, por isso os valores foram submetidos à transformação com base logarítmica ($\log X_{10}$) antes de ser submetida a análise de variância, permitindo, assim a transformação aproximou os resultados à distribuição normal e estabilizar a variância entre os grupos (SAMPAIO, 1998).

Os demais resultados que atenderam as premissas da distribuição normal foram submetidos à análise de variância, que separou como causas de variação efeitos de grupos (G10%, G15% e G20%) e tempos de colheitas (inicial; 12; 24; 36; 48; 60 e 168 horas), segundo modelo estatístico $Y_{ij} = \mu + R_i + H_j + RH_{ij} + e_{ij}$ em que Y_{ij} = observações relativas aos percentuais de retenção de leite na glândula mamária (i) e as horas de colheitas (j), nas respectivas interações e na repetição n; μ = média geral da variável; R_i = efeito percentual de retenção de leite; H_j = efeito das horas de colheita; RH_{ij} = efeito da interação percentual de retenção de leite x horas de colheita; e_{ij} = erro aleatório associado a cada observação.

No caso da ocorrência de significância no teste F as médias correspondentes aos grupos e momentos e horas de colheita foram comparados pelo teste de Duncan. Para todas as análises estatísticas realizadas, foi adotado o nível de significância (p) de 5% de probabilidade (SAMPAIO, 1998).

A avaliação estatística dos resultados foi associada à análise de regressão, com determinação dos respectivos coeficientes de correlação, verificando a relação entre pares e variáveis. A significância obtida na regressão foi avaliada por meio do teste F (SAMPAIO, 1998).

4 RESULTADOS

Para tornar a apresentação deste capítulo mais compatível com o delineamento experimental, seus itens consideraram, inicialmente a magnitude da retenção láctea caracterizada nos grupos experimentais: G1- retenção láctea de 10%; G2 – retenção de 15% e; G3 – retenção de 20% do volume de leite produzido diariamente. Cada item do capítulo foi a seguir apresentado segundo características específicas dos parâmetros lácteos estudados: determinações físico-químicas (pH, eletrocondutividade, concentração de cloretos e cálculo do índice cloreto/lactose); dosagens bioquímicas do leite (teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais); caracterização das células somáticas (avaliação indireta do número de células e contagem eletrônica dessas células) e; avaliação microbiológica das amostras de leite.

4.1 DETERMINAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, BIOQUÍMICA, CELULAR E MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE LEITE DE VACAS COM 10% DE RETENÇÃO LÁCTEA (GRUPO 1)

4.1.1 Determinações Físico-Químicas

Nessas determinações foram aferidos os valores do pH, eletrocondutividade, cloreto e a relação cloreto/lactose das amostras lácteas do G1, ou seja, no grupo experimental que reteve 10% do leite diariamente produzido, no período de 12 a

48 horas pós início da retenção cujos resultados foram apresentados na tabela 1, destacando os valores médios e desvios padrão dos parâmetros avaliados.

Tabela 1- Resultados das determinações do pH, eletrocondutividade, teor de cloreto e relação cloreto/lactose, distribuídos segundo os momentos de colheita de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 10% do volume produzido, por ordenha. Valores expressos em termos médios e desvio padrão – São Paulo – 2005

Constituição Físico-químicas	Momentos de Colheita das Amostras							n
	1	2	3	4	5	6	7	
	inicial	12h	24h	36h	48h	60h	168h	
pH	6,73 ^{ab} ± 0,15	6,70 ^b ± 0,11	6,76 ^a ± 0,13	6,77 ^a ± 0,12	6,66 ^{cd} ± 0,09	6,62 ^d ± 0,07	6,69 ^{bc} ± 0,12	10
Eletrocondutividade (mS/cm)	5,17 ^a ± 0,51	4,96 ^a ± 0,40	5,06 ^a ± 0,44	5,04 ^a ± 0,58	5,11 ^a ± 0,46	4,96 ^a ± 0,50	5,04 ^a ± 0,53	10
Cloreto (mg/dl)	105,23 ^a ± 18,32	98,78 ^a ± 19,54	101,32 ^a ± 17,65	98,52 ^a ± 15,84	103,53 ^a ± 16,23	100,92 ^a ± 15,88	99,53 ^a ± 13,12	10
Cloreto:Lactose %	2,33 ^a ± 5,95	2,07 ^a ± 4,37	2,25 ^a ± 5,22	2,28 ^a ± 4,92	2,28 ^a ± 4,52	2,25 ^a ± 4,25	2,09 ^a ± 3,21	10

Letras distintas na mesma linha representam diferenças significativas entre os resultados obtidos nos vários momentos de colheita dentro do grupo ($p \leq 0,05$).

A análise dos resultados apresentados na tabela 1 e delineados nas figuras 10, 11, 12 e 13 referentes às consideradas determinações físico-químicas do potencial hidrogeniônico – pH, da eletrocondutividade, da concentração de cloretos e cálculo do índice cloreto/lactose das amostras lácteas, colhidas de animais, nos quais se produziu retenção de 10% do volume de leite produzido

demonstrou variações de pequena magnitude e que as diferenças entre resultados não foram estatisticamente significativas. Isso foi observado e comprovado apesar dos valores do pH apresentarem tendência a aumentar até as 36 horas após a retenção, seguida de diminuição dos valores e, sendo no momento 7, isto é, 120 horas após a última retenção láctea, esse resultado era equivalente ao obtido no momento 1, que na pesquisa atuou como o grupo controle. Na determinação da eletrocondutividade os resultados não demonstraram diferença estatisticamente significativa, contudo mostrou também uma tendência a aumentar até 48 horas após a retenção, seguido de uma diminuição. Nos teores de cloreto como na relação cloreto/ lactose os resultados não demonstraram diferença estatisticamente significativa.

4.1.2 Avaliação da Constituição Bioquímica das Amostras Lácteas Colhidas dos Animais do Grupo Experimental 1 – G1

Nas determinações bioquímicas das amostras de leite das vacas constituintes do Grupo Experimental – G1, nos quais se reteve 10% da produção láctea de cada ordenha foram determinados os teores de gordura, proteína total, lactose e sólidos totais. Os parâmetros bioquímicos analisados foram apresentados na tabela 2 e distribuídos nas figuras 14, 15, 16 e 17.

Tabela 2- Resultados da determinação dos teores gordura, proteína, lactose e sólidos totais, distribuídos segundo os momentos de colheita, de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 10% do volume produzido, por ordenha. Valores expressos em termos médios e desvio padrão – São Paulo – 2005

Constituição Bioquímicas (g/dl)	Momentos de Colheita das Amostras							n
	1	2	3	4	5	6	7	
	inicial	12h	24h	36h	48h	60h	168h	
Gordura	2,90 ^c ± 0,76	3,85 ^b ± 1,13	3,42 ^{bc} ± 0,99	3,97 ^b ± 1,53	3,59 ^b ± 1,52	3,17 ^a ± 1,52	2,28 ^d ± 1,03	10
Proteína	3,38 ^a ± 0,42	3,33 ^a ± 0,42	3,39 ^a ± 0,43	3,35 ^a ± 0,41	3,41 ^a ± 0,51	3,32 ^a ± 0,44	3,42 ^a ± 0,51	10
Lactose	4,68 ^{ab} ± 0,31	4,74 ^{ab} ± 0,54	4,58 ^{bc} ± 0,32	4,48 ^c ± 0,31	4,61 ^{bc} ± 0,25	4,46 ^c ± 0,27	4,77 ^a ± 0,30	10
Sólidos Totais	11,94 ^{cd} ± 0,99	12,81 ^b ± 1,31	12,34 ^{bc} ± 0,87	12,71 ^b ± 1,68	12,54 ^{bc} ± 1,86	13,91 ^a ± 1,90	11,44 ^d ± 1,33	10

Letras distintas na mesma linha representam diferenças significativas entre os resultados obtidos nos vários momentos de colheita dentro do grupo ($p \leq 0,05$).

Os teores de gordura apresentaram diferença estatística entre os resultados obtidos em vários momentos, demonstrando: aumento até as 36 horas após a retenção e a seguir tendência para diminuição. A análise dos resultados dos teores de proteína não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os vários momentos de colheita das amostras. Entretanto, a concentração láctea de lactose apresentou uma tendência à diminuição a partir de 24 horas de retenção, ocorrendo valores médios mínimos entre 24 e 60 horas após a retenção, cessada a de

retenção (avaliação das amostras do momento 7), os resultados se equivaliam aos obtidos antes do processo de retenção láctea. Durante o período de retenção láctea, o teor de sólidos totais apresentou maior concentração desses elementos no momento 6. A análise dos resultados demonstrou que os valores de sólidos totais obtidos antes da retenção láctea (momento 1) equivaliam-se aos obtidos após o período de retenção de 10% de volume de leite diário (colheitas do momento 7).

4.1.3 Avaliação das Características Celulares das Amostras Lácteas Colhidas dos Animais do Grupo Experimental 1 – G1

A avaliação da celularidade do leite foi, inicialmente, determinada por metodologia indireta, ou seja, pela prova do CMT - *Califórnia Mastitis Test*, utilizando os cinco escores, anteriormente definidos, sendo os resultados representados na tabela 3 e figura 1. A avaliação das freqüências dos escores do CMT (segundo as notações e grau da intensidade da reação: negativo, traços, 1+, 2+ e 3+) demonstrou que a maioria das amostras nos momentos de colheita avaliadas no início de experimento e após 12, 24, 36, 48, 60 horas de retenção láctea de 10%, bem como, momento 7 (168 horas), após a cessação da retenção foram negativas ao CMT.

Tabela 3- Frequência dos resultados do CMT, segundo a intensidade das reações (negativo, traços, 1+, 2+ e 3+) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 10% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005

Momentos e Horas de colheita	Magnitude da Reação do CMT				
	Negativo	Traços	1+	2+	3+
1 – inicial	100,0%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	(40/40)	(0/40)	(0/40)	(0/40)	(0/40)
2 – 12h	80,00%	5,00%	15,00%	0,00%	0,00%
	(32/40)	(2/40)	(6/40)	(0/40)	(0/40)
3 – 24h	77,50%	7,50%	15,00%	0,00%	0,00%
	(31/40)	(3/40)	(6/40)	(0/40)	(0/40)
4 – 36h	65,00%	2,50%	32,50%	0,00%	0,00%
	(26/40)	(1/40)	(13/40)	(0/40)	(0/40)
5 – 48h	70,00%	2,50%	27,50%	0,00%	0,00%
	(28/40)	(1/40)	(11/40)	(0/40)	(0/40)
6 – 60h	67,50%	7,50%	27,50%	0,00%	0,00%
	(27/40)	(3/40)	(11/40)	(0/40)	(0/40)
7 – 168h	92,50%	2,50%	2,50%	0,00%	2,50%
	(37/40)	(1/40)	(1/40)	(0/40)	(1/40)

Figura 1- Frequência dos resultados do CMT, segundo a intensidade das reações (negativa, traços, 1+, 2+ e 3+) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 10% do volume produzido, por ordenha, distribuídas segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005

A seguir a avaliação da celularidade das amostras de leite foi realizada pela contagem eletrônica do número de células somáticas, sendo o resultado transformado em valor logaritmo de base 10. A análise dos resultados, apresentados na tabela 4 e figura 2, demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa entre os valores determinados nas amostras lácteas colhidas nos momentos estabelecidos pelo delineamento experimental.

Tabela 4- Resultados da avaliação do Número de Células Somáticas (expressos em valores log em base 10), distribuídos segundo momentos e horas de colheita, de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 10% do volume produzido, por ordenha. Valores expressos em termos médios e desvios padrão – São Paulo – 2005

Parâmetro	Momentos de Colheita das Amostras							n
	1	2	3	4	5	6	7	
	inicial	12h	24h	36h	48h	60h	168h	
NCS	4,50 ^a	4,64 ^a	4,62 ^a	4,95 ^a	4,73 ^a	4,99 ^a	4,40 ^a	10
	± 1,07	± 1,02	± 1,20	± 1,16	± 1,19	± 1,09	± 0,91	

Letras distintas na mesma linha representam diferenças significativas entre os resultados obtidos nos vários momentos de colheita dentro do grupo ($p \leq 0,05$). NCS = número de células somáticas, com transformação logarítmica.

Figura 2- Valores logarítmicos do número de células somáticas de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 10% do volume produzido, por ordenha, distribuídas segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005

4.1.4 Avaliação das Características Microbiológicas das Amostras Lácteas Colhidas dos Animais do Grupo Experimental 1 – G1

Os resultados foram apresentados na tabela 5 e distribuídos na figura 3. A análise dos referidos resultados demonstrou maior frequência de isolamentos bacterianos, nas vacas, nos períodos de retenção láctea (entre 32,50 e 37,50% de isolamentos). Os resultados ressaltaram, que após cessada a retenção láctea a frequência de isolamento permaneceu maior do que a observada antes da implantação da retenção do leite após ordenha.

Tabela 5- Frequência de isolamento bacteriano (resultados expressos como negativo ou positivo) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 10% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005

Isolamento Bacteriano	Momentos de Colheitas das Amostras						
	1	2	3	4	5	6	7
	inicial	12h	24h	36h	48h	60h	168h
Negativo	100,00%	67,50%	65,00%	65,00%	65,00%	62,50%	62,50%
	(40/40)	(27/40)	(26/40)	(26/40)	(26/40)	(25/40)	(25/40)
Positivo	0,00%	32,50%	35,00%	35,00%	35,00%	37,50%	37,50%
	(0/40)	(13/40)	(14/40)	(14/40)	(14/40)	(15/40)	(15/40)

Figura 3- Frequência do isolamento bacteriano (negativo ou positivo) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 10% do volume produzido, por ordenha, distribuídas segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005

4.2 DETERMINAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, BIOQUÍMICA, CELULAR E MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE LEITE DE VACAS COM 15% DE RETENÇÃO LÁCTEA (GRUPO 2).

4.2.1 Determinações Físico-Químicas

Os resultados obtidos para os parâmetros físico-químicos (pH, eletrocondutividade, cloreto e a relação cloreto/lactose) foram apresentados na tabela 6 e delineados nas figuras 10, 11, 12 e 13.

Tabela 6- Resultados das determinações do pH, eletrocondutividade, teor de cloreto e relação cloreto/lactose, distribuídos segundo os momentos de colheita, de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 15% do volume produzido, por ordenha. Valores expressos em termos médios e desvio padrão – São Paulo – 2005

Constituição Físico-químicos	Momentos de Colheitas das Amostras							
	1	2	3	4	5	6	7	n
	inicial	12h	24h	36h	48h	60h	168h	
pH	6,66 ^a	6,63 ^a	6,68 ^a	6,67 ^a	6,68 ^a	6,64 ^a	6,60 ^a	9
	± 0,15	± 0,16	± 0,14	± 0,13	± 0,16	± 0,16	± 0,10	
Eletrocondutividade	4,78 ^b	4,71 ^b	5,03 ^a	5,13 ^a	5,12 ^a	5,06 ^a	4,73 ^b	9
(mS/cm)	± 0,40	± 0,40	± 0,34	± 0,60	± 0,38	± 0,40	± 0,32	
Cloreto	100,98 ^e	96,20 ^e	115,38 ^{cd}	121,54 ^{cb}	132,63 ^a	128,60 ^{ab}	105,61 ^a	9
(mg/dl)	± 18,68	± 15,99	± 17,94	± 29,05	± 26,84	± 22,69	± 16,12	
Cloreto:Lactose	2,14 ^e	2,04 ^e	2,49 ^{cd}	2,74 ^{bc}	3,01 ^{ab}	3,14 ^a	2,23 ^{de}	9
%	± 2,19	± 3,99	± 5,25	± 8,27	± 8,89	± 8,57	± 4,16	

Letras distintas na mesma linha representam diferenças significativas entre os resultados obtidos nos vários momentos de colheita dentro do grupo ($p \leq 0,05$).

A análise dos resultados observados nas vacas submetidas a 15% de retenção láctea pós ordenha demonstrou que o potencial hidrogeniônico lácteo não apresentou variação significativas durante esse período, ou, mesmo após a supressão da retenção. Ao contrário, a análise dos resultados da eletrocondutividade demonstrou significativo aumento até 48 horas pós a retenção, estabilizando-se até o momento 6 (60 horas pós retenção) para no final o valor do momento de supressão da retenção ser equivalente ao inicial. O teor de cloreto apresentou comportamento semelhante ao descrito para a eletrocondutividade, com aumento no período de retenção e retorno ao valor inicial após a supressão da

retenção. A relação cloreto/lactose apresentou um perfil semelhante a eletrocondutividade, mas com maior valor médio obtido no momento 6, ou seja, após 60 horas de retenção.

4.2.2 Avaliação da Constituição Bioquímica das Amostras Lácteas Colhidas dos Animais do Grupo Experimental 2 – G2

Os constituintes bioquímicos do leite analisados foram teor de gordura, proteína, lactose e sólidos totais e com os resultados obtidos configurou-se a tabela 7 e figuras 14, 15, 16 e 17.

Tabela 7- Resultados da determinação dos teores gordura, proteína, lactose e sólidos totais, distribuídos segundo momentos de colheita, de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 15% do volume produzido, por ordenha. Valores expressos em termos médios e desvios padrão – São Paulo – 2005

Constituição Bioquímicas (g/dl)	Momentos de Colheitas das Amostras							
	1	2	3	4	5	6	7	n
	inicial	12h	24h	36h	48h	60h	168h	
Gordura	3,01 ^{bc} ± 0,89	3,41 ^b ± 1,16	2,67 ^c ± 1,01	3,11 ^{bc} ± 1,16	3,34 ^b ± 1,22	4,74 ^a ± 1,78	3,12 ^{bc} ± 1,13	9
Proteína	3,37 ^a ± 0,33	3,36 ^a ± 0,27	3,41 ^a ± 0,31	3,50 ^a ± 0,30	3,50 ^a ± 0,37	3,40 ^a ± 0,34	3,40 ^a ± 0,25	9
Lactose	4,76 ^a ± 0,29	4,73 ^a ± 0,25	4,69 ^a ± 0,27	4,52 ^b ± 0,29	4,52 ^b ± 0,39	4,23 ^c ± 0,39	4,76 ^a ± 0,22	9
Sólidos Totais	12,19 ^{bc} ± 1,05	12,56 ^b ± 1,15	11,75 ^c ± 1,02	11,95 ^{bc} ± 1,29	12,26 ^{bc} ± 1,15	13,21 ^a ± 1,56	12,33 ^{bc} ± 1,03	9

Letras distintas na mesma linha representam diferenças significativas entre os resultados obtidos nos vários momentos de colheita dentro do grupo ($p \leq 0,05$).

A avaliação dos resultados obtidos demonstrou que a taxa de gordura apresentou uma progressão significativa das médias dos valores obtidos nos períodos de retenção láctea e no momento 6 (60 horas de retenção) encontrou-se o maior teor de gordura, para o seguir esse teor tornar-se semelhante ao do momento 1. Os teores de proteína láctea de vacas durante o processo de retenção de 15% do leite produzido não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Fato observado nas determinações de lactose láctea, pois as

diferença entre os resultados obtidos durante a retenção de leite pós ordenha foram estatisticamente significativas. Ressaltou-se, ainda que os teores de lactose diminuíram progressivamente, mas os valores da fase pós-retenção láctea (momento 7) foram semelhantes àqueles determinados nos animais deste grupo experimental antes do início da retenção (momento 1). A concentração láctea de sólidos totais como já fora observados para os teores de gordura, demonstraram inúmeras oscilações dos valores médios e algumas variações com diferença estatisticamente significativa.

4.2.3 Avaliação das Características Celulares das Amostras Lácteas Colhidas dos Animais do Grupo Experimental 2 – G2

A celularidade do leite das vacas submetidas à retenção de 15% do leite ordenhado foi determinada pela prova do CMT e por contagem eletrônica de células somáticas. A avaliação das frequências dos escores do CMT obtidas nas amostras desse grupo experimental e distribuídas na tabela 8 e figura 4 demonstrou que a totalidade das amostras colhidas antes da retenção e após 12 horas de retenção foi negativa mas entre os momentos 3 e 6 (24 e 60 horas de retenção) apresentaram uma alteração nos escores, sendo nos momentos 4 e 5 (36 e 48 horas de retenção) aqueles que apresentaram a maior frequência de escore positivo (1+).

Tabela 8- Frequência dos resultados do CMT, segundo a intensidade das reações (negativo, traços, 1+, 2+ e 3+) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 15% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005

Momentos e Horas de colheita	Magnitude da Reação do CMT				
	Negativo	Traços	1+	2+	3+
1 – inicial	100,0%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	(36/36)	(0/36)	(0/36)	(0/36)	(0/36)
2 – 12h	100,0%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	(36/36)	(0/36)	(0/36)	(0/36)	(0/36)
3 – 24h	88,89%	0,00%	11,11%	0,00%	0,00%
	(32/36)	(0/36)	(4/36)	(0/36)	(0/36)
4 – 36h	86,11%	0,00%	13,89%	0,00%	0,00%
	(31/36)	(0/36)	(5/36)	(0/36)	(0/36)
5 – 48h	86,11%	0,00%	13,89%	0,00%	0,00%
	(31/36)	(0/36)	(5/36)	(0/36)	(0/36)
6 – 60h	88,89%	0,00%	11,11%	0,00%	0,00%
	(32/36)	(0/36)	(4/36)	(0/36)	(0/36)
7 – 168h	100,0%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	(36/36)	(0/36)	(0/36)	(0/36)	(0/36)

Figura 4- Frequência dos resultados do CMT, segundo a intensidade das reações (negativo, traços, 1+, 2+ e 3+) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 15% do volume produzido, por ordenha, distribuídas segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005

Os resultados da contagem eletrônica de células somáticas das vacas submetidas à retenção de 15% do leite produzido foram apresentados na tabela 9 e figura 5. A avaliação dos resultados das contagens do número de células somáticas, submetidas a transformação logarítmica demonstrou pequenas oscilações dos resultados, não sendo a diferença entre os valores dos vários momentos estatisticamente significativa.

Tabela 9- Resultados da avaliação do Número de Células Somáticas (expressos em valores log na base 10), distribuídos segundo os momentos e horas de colheita, de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 15% do volume produzido, por ordenha. Valores expressos em termos médios e desvios padrão – São Paulo – 2005

Parâmetro	Momentos e Horas de Colheita							n
	1	2	3	4	5	6	7	
	inicial	12h	24h	36h	48h	60h	168h	
NCS	4,15 ^a	4,41 ^a	4,06 ^a	4,33 ^a	4,27 ^a	4,65 ^a	4,32 ^a	9
	± 0,79	± 0,66	± 0,86	± 0,95	± 0,97	± 0,94	± 0,69	

Letras distintas na mesma linha representam diferenças significativas entre os resultados obtidos nos vários momentos de colheita dentro do grupo ($p \leq 0,05$). NCS = número de células somáticas, em transformação logarítmica em base 10.

Figura 5- Valores logarítmicos do número de células somáticas de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 15% do volume produzido, por ordenha, distribuídas segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005

4.2.4 Avaliação das Características Microbiológicas das Amostras Lácteas Colhidas dos Animais do Grupo Experimental 2 – G2

O resultados da frequência de isolamentos bacterianos foi apresentada na tabela 10 e configurados na figura 6.

A avaliação da frequência de isolamento bacteriano neste grupo experimental composto por vacas submetidas a 15% de retenção láctea foi nula, pois em 100% das culturas não houve crescimento bacteriano, isso foi demonstrado em todos os momentos de colheitas das amostras.

Tabela 10- Frequência dos resultados do isolamento bacteriano (negativo ou positivo) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 15% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005

Isolamento Bacteriano	Momentos e Horas de Colheita						
	1	2	3	4	5	6	7
	inicial	12h	24h	36h	48h	60h	168h
Negativo	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
	(36/36)	(36/36)	(36/36)	(36/36)	(36/36)	(36/36)	(36/36)
Positivo	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	(36/36)	(36/36)	(36/36)	(36/36)	(36/36)	(36/36)	(36/36)

Figura 6- Frequência dos resultados do isolamento bacteriano (negativo ou positivo) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 15% do volume produzido, por ordenha. Distribuída segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005

4.3 DETERMINAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, BIOQUÍMICA, CELULAR E MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE LEITE DE VACAS COM 20% DE RETENÇÃO LÁCTEA (GRUPO 3)

4.3.1 Determinações Físico-Químicas

Entre as determinações físico-químicas do leite de vacas submetidas a sistema de retenção de 20% do leite produzido foram quantificados os valores do potencial hidrogeniônico – pH, determinações da eletrocondutividade e dos teores de cloretos, bem como calculado o índice cloreto/lactose. Os resultados foram distribuídos na tabela 11 e configurados nas figuras 10, 11, 12 e 13.

Tabela 11- Resultados das determinações do pH, eletrocondutividade, teor de cloreto e relação cloreto/lactose, distribuídos segundo momentos e horas de colheita, de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 20% do volume produzido, por ordenha. Valores expressos em termos médios e desvios padrão – São Paulo – 2005

Constituição físico-químicas	Momentos e Horas de Colheita							
	1	2	3	4	5	6	7	n
	inicial	12h	24h	36h	48h	60h	168h	
pH	6,47 ^a ± 0,05	6,49 ^a ± 0,07	6,51 ^a ± 0,07	6,51 ^a ± 0,11	6,47 ^a ± 0,08	6,48 ^a ± 0,19	6,53 ^a ± 0,09	10
Eletrocondutividade (mS/cm)	5,01 ^b ± 0,35	5,03 ^b ± 0,35	5,20 ^b ± 0,50	5,53 ^a ± 0,69	5,22 ^b ± 0,54	5,20 ^b ± 0,51	4,45 ^c ± 0,47	10
Cloreto (mg/dl)	110,23 ^c ± 16,43	105,35 ^c ± 14,43	121,68 ^b ± 23,49	135,61 ^a ± 30,62	134,81 ^a ± 27,46	135,61 ^a ± 30,63	104,28 ^c ± 28,82	10
Cloreto:Lactose %	2,32 ^{bc} ± 4,41	2,20 ^c ± 3,73	2,62 ^b ± 6,53	3,12 ^a ± 10,40	3,02 ^a ± 8,86	3,29 ^a ± 12,34	2,24 ^{bc} ± 8,33	10

Letras distintas na mesma linha representam diferenças significativas entre os resultados obtido nos vários momentos de colheita dentro do grupo ($p \leq 0,05$).

A avaliação dos resultados dos constituintes físico-químicos do leite, apresentados na tabela 11, demonstrou que os valores do pH não apresentaram diferença estatística significativa nos vários momentos de colheita das amostras. Ao contrário, a eletrocondutividade láctea com o evoluir das horas de retenção demonstrou-se aumento da magnitude dos resultados, sendo o maior valor médio obtido no momento 4 (36 horas de retenção), e a partir desse momento apresentou

uma grande e abrupta diminuição, tendo o resultado no momento 7 alcançado valor mínimo, significativamente menor do que determinado no momento inicial do experimento. O teor de cloreto lácteo apresentou tendência para aumentar significativamente sua magnitude com a progressão das horas de retenção, mas no momento 7 (168 horas após o início do experimento e após a supressão da retenção) os resultados obtidos foram equivalentes aos obtidos no início do experimento – antes da indução da retenção láctea.

A avaliação da relação cloreto/lactose demonstrou significativo aumento com o evoluir do tempo de retenção, mas a partir do momento 4 (36 horas de retenção) os valores desse índice estabilizaram-se, para no momento 7, correspondente à fase de supressão da retenção diminuírem de magnitude, equivalendo-se àqueles obtidos no início dos procedimentos.

4.3.2 Avaliação da Constituição Bioquímica das Amostras Lácteas Colhidas dos Animais do Grupo Experimental 3 – G3

Entre os constituintes bioquímicos do leite determinados em vacas submetidas a 20% de retenção láctea foram considerados os teores de gordura, proteína total, lactose e sólidos totais, sendo os resultados apresentados na tabela 12 e distribuídos nas figuras 14, 15, 16 e 17.

Tabela 12- Resultados da determinação dos teores lácteos de gordura, proteína, lactose e sólidos totais, distribuídos segundo momentos e horas de colheita, de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 20% do volume produzido, por ordenha. Valores expressos em termos médios e desvio padrão – São Paulo – 2005

Parâmetros Bioquímicos (g/dl)	Momentos e Horas de Colheita							
	1	2	3	4	5	6	7	n
	inicial	12h	24h	36h	48h	60h	168h	
Gordura	2,16 ^c ± 0,64	2,20 ^c ± 0,67	1,34 ^d ± 0,46	1,70 ^d ± 0,65	2,31 ^c ± 0,96	3,23 ^b ± 1,36	3,37 ^a ± 1,09	10
Proteína	3,43 ^c ± 0,24	3,40 ^c ± 0,24	3,41 ^c ± 0,27	3,52 ^{bc} ± 0,25	3,68 ^a ± 0,30	3,62 ^{ab} ± 0,29	3,58 ^{ab} ± 0,27	10
Lactose	4,79 ^a ± 0,23	4,78 ^a ± 0,25	4,71 ^{ab} ± 0,29	4,48 ^c ± 0,42	4,56 ^{bc} ± 0,37	4,30 ^d ± 0,46	4,77 ^a ± 0,35	10
Sólidos Totais	11,41 ^c ± 0,94	11,45 ^c ± 0,81	10,40 ^d ± 0,74	10,51 ^d ± 1,04	11,42 ^c ± 0,93	11,94 ^b ± 1,15	13,20 ^a ± 0,87	10

Letras distintas na mesma linha representam diferenças significativas entre os resultados obtidos nos vários momentos de colheita dentro do grupo ($p \leq 0,05$).

A análise dos resultados demonstrou que o maior volume de leite retido na mama determinou intensas variações nos teores dos constituintes bioquímicos. O teor lácteo de gordura, durante a instalação do processo de retenção diminuiu de forma significativa (momento inicial, $2,16 \pm 0,64$ g/dl e $1,70 \pm 0,65$ g/dl no momento 4 – 36 horas de retenção) A seguir, os resultados permitiram demonstrar-se gradativo e significativo aumento, durante os momentos finais do processo de

retenção láctea (momentos 5, 6 e 7, respectivamente: $2,31 \pm 0,96$ g/dl; $3,23 \pm 1,36$ g/dl e $3,37 \pm 1,09$ g/dl).

A avaliação dos resultados dos teores lácteos de proteína durante a retenção de 20% de leite, demonstrou, que esse constituinte do leite de bovinos apresentaram variações semelhantes às descritas para a concentração de gordura: até 36 horas (momentos 1, 2, 3 e 4) de retenção láctea o teor de proteína se manteve estável; para a seguir aumentar, permanecendo significativamente maiores até após a cessação da retenção láctea. Ao contrário, o teor de lactose após se manterem estáveis até 24 horas de retenção (momentos 1, 2 e 3), seus valores diminuíram de forma significativa, atingindo valores mínimos após 60 horas de retenção; suprimida a retenção láctea os valores de lactose igualaram-se aos do início do experimento. A variação dos valores de concentração láctea de sólidos totais caracterizou-se por diminuição inicial dos valores (momento 3 e 4), para seguir aumentarem de forma evidente, permanecendo significativamente maiores após a cessação da retenção.

4.3.3 Avaliação das Características Celulares das Amostras Lácteas Colhidas dos Animais do Grupo Experimental 3 – G3

A celularidade do leite foi inicialmente avaliada pelo CMT e a frequência dos resultados obtidos foi distribuída na tabela 13 e configurados na figura 7.

Tabela 13- Frequência dos resultados do CMT, segundo a intensidade das reações (negativo, traços, 1+, 2+ e 3+) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 20% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005

Momentos e Horas de colheita	Magnitude da Reação do CMT				
	Negativo	Traços	1+	2+	3+
1 – inicial	100,0%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	(40/40)	(0/40)	(0/40)	(0/40)	(0/40)
2 – 12h	95,0%	0,00%	5,00%	0,00%	0,00%
	(38/40)	(0/40)	(2/40)	(0/40)	(0/40)
3 – 24h	95,0%	0,00%	5,00%	0,00%	0,00%
	(38/40)	(0/40)	(2/40)	(0/40)	(0/40)
4 – 36h	85,00%	0,00%	10,00%	2,50%	2,50%
	(34/40)	(0/40)	(4/40)	(1/40)	(1/40)
5 – 48h	95,0%	0,00%	0,00%	2,50%	2,50%
	(38/40)	(0/40)	(0/40)	(1/40)	(1/40)
6 – 60h	95,0%	0,00%	0,00%	2,50%	2,50%
	(38/40)	(0/40)	(0/40)	(1/40)	(1/40)
7 – 168h	100,0%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	(40/40)	(0/40)	(0/40)	(0/40)	(0/40)

A avaliação dos referidos resultados demonstraram diminuição do número de amostras negativas até o momento 4 (36 horas de retenção) para a seguir, iniciar-se um aumento de ocorrência de resultados negativos para no momento 7 quando já fora suprimida a retenção láctea, a freqüência de resultados negativos voltar a ser 100%.

Figura 7- Freqüência dos resultados do CMT, segundo a intensidade das reações (negativo, traços, 1+, 2+ e 3+) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 20% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momento e horas de colheita – São Paulo – 2005

Os resultados das contagens eletrônicas das células somáticas do leite de vacas submetidas a 20% de retenção láctea foram apresentados na tabela 14 e na figura 8 e a análise das variações demonstraram não haver diferença estatística entre os valores obtidos nos vários momentos da retenção láctea.

Tabela 14- Resultados do número de Células Somáticas (expressos em logarítmico em base 10), distribuídos segundo momento e horas de colheita, de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 20% do volume produzido, por ordenha. Valores expressos em termos médios e desvios padrão – São Paulo – 2005

Parâmetro	Momentos e Horas de Colheita							n
	1	2	3	4	5	6	7	
	inicial	12h	24h	36h	48h	60h	168h	
NCS	4,14 ^a	4,22 ^a	4,14 ^a	4,21 ^a	4,06 ^a	4,22 ^a	4,17 ^a	10
	± 0,62	± 0,58	± 0,76	± 0,84	± 0,74	± 0,79	± 0,72	

Letras distintas na mesma linha representam diferenças significativas entre os resultados obtidos nos vários momentos de colheita dentro do grupo ($p \leq 0,05$). NCS = número de células somáticas, em transformação logarítmica em base 10.

Figura 8- Valores logarítmicos do número de células somáticas de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 20% do volume produzido, por ordenha, distribuídas segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005

4.3.4 Avaliação das Características Microbiológicas das Amostras Lácteas Colhidas dos Animais do Grupo Experimental 3 – G3

O resultado da frequência de isolamento bacteriano em amostras de leite colhidas de vacas submetidas à retenção láctea de 20% foram apresentadas na tabela 15 e configurada na figura 9.

Tabela 15- Frequência dos resultados do isolamento bacteriano (negativo ou positivo) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 20% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005

Isolamento Bacteriano	Momentos e Horas de Colheita						
	1	2	3	4	5	6	7
	inicial	12h	24h	36h	48h	60h	168h
Negativo	100,00%	92,50%	90,00%	90,00%	87,50%	90,00%	90,00%
	(40/40)	(37/40)	(36/40)	(36/40)	(35/40)	(36/40)	(36/40)
Positivo	0,00%	7,50%	10,00%	10,00%	12,50%	10,00%	10,00%
	(0/40)	(3/40)	(4/40)	(4/40)	(5/40)	(4/40)	(4/40)

Figura 9: Frequência dos resultados do isolamento bacteriano (negativo ou positivo) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção de 20% do volume produzido, por ordenha. Distribuída segundo momentos e horas de colheitas – São Paulo – 2005

A análise dos resultados apresentados demonstrou que a frequência de isolamento bacteriano nas amostras de leite de vacas, que constituíram o grupo experimental submetido a retenção láctea de 20% da produção diária, apresentou uma frequência de 100% de isolamentos negativo no momento inicial do experimento, mas uma vez iniciada a retenção láctea houve aumento dos número de isolamentos de cepas bacterianas. A frequência desses isolamentos atingiu o valor máximo após 48 horas de retenção láctea, quando houve 12,5% de isolamentos positivos. Ressaltou-se ainda, que mesmo após a cessação da retenção quatro amostras apresentaram isolamento de cepas bacterianas (frequência 10,0%).

4.4 RESULTADO PARA AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA INFLUENCIA DO VOLUME DA RETENÇÃO LÁCTEA SOBRE OS PARAMETROS FISICO-QUIMICOS, BIOQUIMICOS, CELULARES E MICROBIOLOGICOS DO LEITE

O delineamento experimental proposto nesta dissertação de mestrado permitiu que se fizesse o estudo comparativo dos efeitos do grau de retenção láctea (G1 – 10%; G2 – 15% e G3 – 20%) sobre alguns constituintes do leite. Assim sendo, os resultados obtidos nos vários grupos experimentais foram reunidos e apresentados na tabela 16 e detalhados nas figuras 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19.

Tabela 16- Constituição físico-química, bioquímica, celular e microbiológica do leite de vacas submetidas à retenção láctea de 10, 15 e 20%. Valores expressos em termos médios e desvio padrão – São Paulo – 2005

Variáveis	Graus de Retenção Láctea – Grupos Experimentais		
	G1 - 10%	G2 - 15%	G3 - 20%
pH	6,70 ± 0,12 ^a	6,65 ± 0,15 ^b	6,50 ± 0,11 ^c
Eletrocondutividade (mS/cm)	5,05 ± 0,49 ^a	4,94 ± 0,45 ^b	5,09 ± 0,58 ^a
Cloreto (mg/dl)	101,0 ± 16,70 ^c	114,42 ± 24,98 ^b	121,10 ± 28,43 ^a
Relação Cloreto:Lactose	2,22 ± 4,80 ^c	2,54 ± 7,69 ^b	2,69 ± 9,24 ^a
Gordura (g/dl)	3,60 ± 1,50 ^a	3,34 ± 1,36 ^b	2,38 ± 1,17 ^c
Proteína (g/dl)	3,47 ± 0,45 ^b	3,41 ± 0,31 ^b	3,52 ± 0,28 ^a
Lactose (g/dl)	4,62 ± 0,35 ^a	4,60 ± 0,36 ^a	4,62 ± 0,39 ^a
Sólidos Totais (g/dl)	12,53 ± 1,61 ^a	12,32 ± 1,26 ^a	11,47 ± 1,27 ^b
NCSlog10/ml	4,69 ± 1,10 ^a	4,31 ± 0,86 ^b	4,17 ± 0,27 ^b
Isolamento bacteriano durante e após a retenção*	35,4% (85/240)	0,00% (0/216)	10,0% (24/240)

Letras distintas na mesma linha representam diferenças significativas entre os resultados obtidos nos vários momentos de colheita dentro do grupo ($p \leq 0,05$). NCSlog10 = número de células somáticas - transformação logarítmica em base 10. * em termos gerais houve 109 isolamentos em 696 amostras de leite colhidas nos momentos de retenção e pós-retenção, ou seja, 15,7% de isolamento.

Figura 10- Valores médios de pH de amostras de leite de vacas submetidas à retenção láctea de 10, 15 e 20% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005

Figura 11- Valores médios da eletrocondutividade (mS/cm) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção láctea de 10, 15 e 20% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005

Figura 12- Valores médios do teor de cloreto (mg/dl) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção láctea de 10, 15 e 20% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005

Figura 13- Valores médios da relação cloreto/lactose de amostras de leite de vacas submetidas à retenção láctea de 10, 15 e 20% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005

Figura 14- Valores médios gordura (g/dl) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção láctea de 10, 15 e 20% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005

Figura 15- Valores médios proteína (g/dl) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção láctea de 10, 15 e 20% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005

Figura 16- Valores médios lactose (g/dl) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção láctea de 10, 15 e 20% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005

Figura 17- Valores médios sólidos totais (g/dl) de amostras de leite de vacas submetidas à retenção láctea de 10, 15 e 20% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005

Figura 18- Número de células somáticas – transformação logarítmica em base 10 de amostras de leite de vacas submetidas à retenção láctea de 10, 15 e 20% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005

Figura 19- Frequência (%) do isolamento bacteriano de amostras de leite de vacas submetidas à retenção láctea de 10, 15 e 20% do volume produzido, por ordenha. Distribuição segundo momentos e horas de colheita – São Paulo – 2005

A análise dos resultados apresentados na tabela 16 e nas correspondentes e mencionadas figuras demonstrou que o volume de leite retido na glândula mamária após a ordenha determinou significativas variações nos constituintes físico-químicos, bioquímicos, celulares e microbiológicos do leite, variações dependentes, na maioria das vezes do volume de leite retido. Assim sendo, os resultados demonstraram as seguintes variações: o pH diminuiu significativamente com o aumento do volume de leite retido (10% - $6,70 \pm 0,12$; 15% - $6,65 \pm 0,15$ e 20% - $6,50 \pm 0,11$); ao contrário os teores de cloreto lácteos aumentaram de maneira significativa com o aumento do volume de leite retido (10% - $101,0 \pm 16,70$; 15% - $114,42 \pm 24,98$ e 20% - $121,10 \pm 28,43$ mg/dl); a eletrocondutividade do leite apesar de apresentar diferença estatisticamente significativa, não demonstraram tendência definitiva de aumento ou diminuição segundo maior volume de leite retido na pós ordenha (10% - $5,05 \pm 0,49$; 15% - $4,94 \pm 0,45$ e 20% - $5,09 \pm 0,58$ mS/cm); apesar da lactose ter mantido valores constantes nos três graus de volume de retenção láctea a relação cloreto/lactose aumentou gradativa e significativamente com o maior volume de leite retido na glândula mamária (10% - $2,22 \pm 4,80$; 15% - $2,54 \pm 7,69$ e 20% - $2,69 \pm 9,24$); a proteína apresentou diferença significativa, demonstrando uma tendência de aumento segundo maior volume de leite retido (10% - $3,47 \pm 0,45$; 15% - $3,41 \pm 0,31$ e 20% - $3,52 \pm 0,28$) já, os teores de gordura do leite diminuíram significativamente com o aumento do volume de leite retido na glândula mamária (10% - $3,60 \pm 1,50$; 15% - $3,34 \pm 1,36$ e 20% - $2,38 \pm 1,17$ g/dl); a concentração de lactose não apresentou variações significativas dependente do volume de leite retido (10% - $4,62 \pm 0,35$; 15% - $4,60 \pm 0,36$ e 20% - $4,62 \pm 0,39$ g/dl); a quantidade de sólidos totais no leite diminuiu de forma significativa quando houve a retenção de 20% de leite na glândula mamária (10% - $12,53 \pm 1,61$; 15% - $12,32 \pm 1,26$ e 20% - $11,47 \pm 1,27$

g/dl); apesar dos resultados da contagem de células somáticas apresentar diferença significativa entre os resultados dos grupos experimentais com diferentes volumes de retenção láctea, não demonstrou tendência persistente de aumento ou diminuição da celularidade (10% - $4,69 \pm 1,10$; 15% - $4,31 \pm 0,86$ e 20% - $4,17 \pm 0,27$ NCSlog10/ml) e, evidenciou-se que a retenção láctea era responsável pelo aumento de isolamentos bacterianos nas amostras de leite, sem conseguir-se estabelecer uma relação direta entre o aumento de volume de retenção com o aumento da frequência de isolamento bacteriano nas amostras (10% - frequência de 3,54% isolamentos positivos; 15% - ausência de isolamento positivo e 20% - frequência de 10,0% de isolamentos positivos), além do mais calculando o valor geral de isolamento, destacou-se, que em 812 exames de isolamento microbiológicos realizados, a frequência de resultados negativos foi igual a 86,6% (703/812) e a frequência de exames positivos foi 13,4% (109/812), todavia as frequências de isolamento microbiana foi nula antes do início do procedimento de retenção láctea, pois as 116 provas realizadas (G1 com 40 amostras, G2 com 36 amostras e G3 com 40 amostras), foram negativas e nos 696 exames realizados durante a retenção ou após a supressão lácteas a frequência de isolamento foi igual a 15,7% (109/696) e a frequência de resultados negativos foi de 84,3% (587/696).

4.5 AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE OS CONSTITUINTES DO LEITE DE AMOSTRAS DE VACAS SUBMETIDAS A RETENÇÃO

No quadro 3 foram apresentados os coeficientes de correlação entre as variáveis estudadas, destacando-se as mais importantes correlações nas figura 18, 19, 20, 21, 22 e 23, sendo a - fortemente positivas e significativas nos casos da eletrocondutividade e cloreto; eletrocondutividade e índice cloreto/lactose; cloreto e índice cloreto/lactose e gordura e sólidos totais; b - mediana positiva e significativa nas correlações entre eletrocondutividade e NCS; pH e gordura; pH e NCS; gordura e NCS; proteína e sólidos totais e; índice cloreto/lactose e NCS; c - com correlação baixa e significativa para as variáveis - eletrocondutividade e pH, cloreto e pH, cloreto e proteína, cloreto e NCS, pH e sólidos totais; pH e índice cloreto /lactose; gordura e proteína; proteína e índice cloreto/lactose; proteína e NCS e; sólidos totais e NCS.

	EC	Cloreto	pH	Gordura	Proteína	Lactose	Sólidos Totais	Cloreto/lactose	NCS
EC	1	0,75*	0,29*	-0,26*	-0,14*	-0,65*	-0,54*	0,76*	0,32*
Cloreto		1	0,12**	-0,12**	0,11**	-0,66*	-0,35*	0,94*	0,26*
pH			1	0,30*	-0,15*	-0,39*	0,12**	0,22*	0,45*
Gordura				1	0,12**	-0,35*	0,92*	0,03 ^{NS}	0,44*
Proteína					1	-0,07 ^{NS}	0,32*	0,12**	0,15*
Lactose						1	-0,03 ^{NS}	0,80*	-0,55*
Sólidos Totais							1	-0,24*	0,27*
Cloreto/lactose								1	0,35*
NCS									1

- Significativo $p < 0,0001$; ** Significativo $p < 0,01$; ^{NS} Não significativo $p < 0,05$. EC – eletrocondutividade, NCS – número de células somáticas.

Quadro 3- Coeficientes de correlação entre os parâmetros: eletrocondutividade, cloreto, pH, gordura, proteína, lactose, sólidos totais, índice cloreto/lactose e número de células somáticas de amostras de leite de vacas submetidas à retenção láctea – São Paulo – 2005

Figura 20- Correlação entre a eletrocondutividade e os teores de cloreto em amostras de vacas submetidas à retenção láctea – São Paulo - 2005

Figura 21- Correlação entre os teores de cloreto e lactose em amostras de vacas submetidas à retenção láctea – São Paulo - 2005

Figura 22- Correlação entre os teores de gordura e sólidos totais em amostras de vacas submetidas à retenção láctea – São Paulo - 2005

Figura 23- Correlação entre eletrocondutividade e os teores lactoses em amostras de vacas submetidas a retenção láctea – São Paulo - 2005

Figura 24- Correlação entre os teores cloreto e relação cloreto/lactose em amostras de vacas submetidas a retenção láctea – São Paulo - 2005

Figura 25- Correlação entre eletrocondutividade e relação cloreto/lactose em amostras de vacas submetidas a retenção láctea – São Paulo - 2005

5 DISCUSSÃO

5.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O delineamento experimental, objetivando avaliar a ação da retenção láctea em alguns parâmetros constituintes do leite de bovinos deu particular ênfase àqueles que apresentassem real valor para o estabelecimento do diagnóstico de processos inflamatórios da glândula mamária. Além do mais, na proposição do tema desta pesquisa objetivou-se contribuir ao esclarecimento da atuação da retenção láctea controlada como eventual fator etiológico predisponente das mamites.

A análise da literatura especializada demonstrou que poucas foram as pesquisas que estudaram a ação da retenção láctea sobre a constituição do leite e sua ação predispondo os tecidos mamários à ocorrência das mamites, particularmente às de origem infecciosa. Apesar dessa deficiência, encontraram-se alguns trabalhos, demonstrando a preocupação de se conhecer a constituição do leite, como também de se estabelecer os fatores que poderiam influir nos resultados dos parâmetros lácteos utilizados como exames complementar para o diagnóstico clínico das enfermidades da glândula mamária ou que interferissem na produção higiênica do leite de consumo das populações ou constituindo a matéria prima da indústria de laticínios. Assim sendo, alguns pesquisadores dedicaram-se a avaliação da constituição do leite em condição de omissão da ordenha (NATZKE et al., 1965); variação de intervalo de tempo entre as ordenhas (WEELOCK et al., 1966); e da frequência de repetições da ordenha (AYADI et al., 2004; HAMANN; GYODI, 2000); ordenhas sem repasse e esgotamento do úbere (GOFF; SCHMIDT, 1967), além de

avaliarem as modificações da constituição do leite produzido por vacas sadias e vacas acometidas por mamites (HOLDAWAY et al., 1996; URECH et al., 1999). A observação apurada da literatura compulsada permitiu vislumbrar-se maior preocupação dos pesquisadores em caracterizar as frações do leite ordenhado e a avaliação do leite residual, pós-ordenha e o significado da variação dos resultados obtidos nos exames dessas frações lácteas (CHRITOFEN et al., 1994; FERNANDO et al, 1982; ISAKSSON; ANARP, 1988; ÖSTENSSON et al., 1988; ÖSTENSSON et al., 1993;).

Apesar da publicação das retromencionadas pesquisas em importantes revistas científicas, não se observou preocupação em se avaliar a ação da retenção láctea sobre as delicadas estruturas anátomo-funcionais da glândula mamária. O que foi, intensamente, avaliado nesta dissertação de mestrado, pois o delineamento experimental permitiu que se avaliasse as variações da constituição láctea em vacas nas quais se induziu retenção de 10, 15 e 20% do leite da ordenha diária. Ressalte-se que o referido grau de retenção não ultrapassou o período de 12 horas, pois as vacas eram sadias e pertenciam a uma linha de produção comercial de leite, e, caso ocorresse um grave contratempo (ocorrência de mamite severa – o animal seria retirado do grupo experimental e submetido a tratamento).

5.2 AVALIAÇÃO DA CONSTITUIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, BIOQUÍMICA, CELULAR E MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS LÁCTEAS COLHIDAS DOS ANIMAIS DO GRUPO EXPERIMENTAL 1 – G1

A análise dos resultados obtidos em vacas submetidas a 10% de retenção láctea demonstrou não ser essa retenção responsável por significativas variações dos valores determinados para a eletrocondutividade, teores de cloretos e do índice cloreto/lactose.

O potencial hidrogeniônico manteve-se estabilizado até 36 horas de retenção, para seguir diminuir significativamente, retornando aos valores iniciais após a supressão da retenção. O aumento temporário da acidez evidenciada após 48-60 horas de retenção láctea não permitiu a afirmação de ocorrência de evidente processo inflamatório, pois nesse caso haveria alcalinização do leite pela transudação de componentes químicos do sangue para o leite, confirmando o que fora afirmado por Harmon (1994), concordando com os valores padrões considerados por Schalm et al. (1971) e com Holdaway et al. (1996) que observaram essas diferenças do pH em frações lácteas.

As vacas com 10% de retenção láctea não apresentaram variações significativas da eletrocondutividade láctea, pois não ocorreu significativo aumento da concentração de cloretos no leite, como também não se vislumbrou alteração no índice cloreto/lactose. Tais alterações, entretanto só ocorreriam se houvesse a participação de outros fatores, como as relacionadas à fase da lactação (BRYAN; TOUT, 1935) ou se houvesse tempo de ocorrer lesões mais severas do epitélio de revestimento interno da mama, como afirmaram alguns pesquisadores (HARMON, 1994; NATZKE et al., 1965; SCHALM *et al.*, 1971; WHEELLOCK *et al.*, 1966).

Os determinados valores da eletrocondutividade láctea foram coerente com os resultados da concentração de cloretos, pois não havendo aumento de íons cloro no leite, não haveria possibilidade de aumento da condução elétrica através da secreção láctea. Os resultados obtidos concordaram com os obtidos em vacas sadias por D'Angelino et al. (1998); Hillerton e Walton (1991) e Kangasmiemi et al. (1986).

Não se demonstrando variações significativas da concentração láctea de cloretos nem do teor de lactose das amostras de leite de vacas com 10% de retenção, seria lógico não ocorrer alterações significativas do índice cloreto/lactose.

A retenção láctea de 10% determinou alterações significativas na constituição bioquímica do leite, particularmente nos parâmetros mais representativos de qualidade da secreção da glândula mamária a ser utilizada para o consumo humano ou como matéria prima da indústria de laticínios. Pois no desenvolvimento da retenção láctea houve significativo aumentos dos teores de gordura e de sólidos totais nas amostras de leite em animais com 10% de retenção. Semelhantes resultados foram observados por Natzke et al. (1965) em casos de omissão de ordenha e por Wheelock et al. (1966) em retenção láctea entre 6 e 36 horas e por Ayadi et al. (2004) avaliando amostras de leite alveolar colhidas de 4 a 24 horas, intervaladas por período de 4 horas. Por coerência, sendo a gordura láctea o constituinte que mais intensamente participa da fração sólidos totais, foi a razoável observar-se que este parâmetro apresentou comportamento semelhante ao dos lipídeos lácteos.

Os teores protéicos e de lactose em amostra de leite colhidas de vacas submetidas a processo de 10% de retenção láctea não apresentaram variações significativas dos resultados, que pudessem ser atribuídos ao processo de retenção. As observações concordaram com as afirmações de Kitchen (1981), destacando que a concentração protéica não apresentaria variações significativas nos casos de inflamação do úbere, porém ao se realizar um proteinograma lácteo algumas bandas demonstrariam variações significativas. Todavia, as proteínas sintetizadas na glândula mamária nos processos inflamatórios apresentariam significativa diminuição, compensada pelo aumento dos teores das proteínas transudadas do sangue e, conseqüentemente a concentração de proteína total do leite permaneceria inalterada ou com pequenas variações.

A avaliação da celularidade de amostras de leite colhidas de vacas submetidas a 10% de retenção láctea demonstrou haver influência desse procedimento nos resultados da prova CMT, pois: no início do experimento, antes de submeter o animal à retenção láctea de 10% a reação em todos os casos foi negativa e já, após 12 horas houve 20% de reações traços e positivo (1+); ocorrendo maior número de reações positivas após 48 horas de retenção. Após a supressão da retenção ainda ocorreram dois resultados positivos. Paradoxalmente, o número de células somáticas determinado por contagem eletrônica não demonstrou diferença estatisticamente significativas entre os vários momentos de colheita. Essas observações concordaram com as conclusões apresentadas por Goff e Schmidt (1967), não observando variações significativas da reação CMT e diferenças entre o número de leucócitos do leite de vacas ordenhadas sem repasse e perfeito esgotamento, ao final da ordenha. Todavia, discordaram dos resultados

apresentados por Natzke et al. (1965), que em animais com omissão de ordenha, apresentavam maior número de células somáticas. Parcialmente, houve concordância com as observações apresentadas por Hamann e Gyodi (2000), detalhando aumento do número de células somáticas nas vacas ordenhadas a cada 4 horas e menor número dessas células nas ordenhas espaçadas por período de 12 horas. Em contra partida, Östensson (1993) demonstrou a amplitude da reação da glândula mamária frente a estímulos relacionados à ordenha e frações do leite produzido, ao comprovar que o leite residual obtido por aplicação endovenosa de ocitocina apresentava maior número de células somáticas, com predomínio de polimorfonucleares neutrófilos do que amostras de leite da ordenha plena. Por tais razões, acreditou-se que a retenção de 10% de leite por períodos de até 60 horas, mas mantendo o sistema usual de ordenha, com períodos intercalares de 12 horas, não foi suficiente para alterar a celularidade do leite.

Antes dos animais serem submetidos a retenção láctea de 10% os exames bacteriológicos foram, em todas os casos negativos, porém após 12 horas de retenção 32,5% dos exames laboratoriais demonstraram isolamento de cepas bacterianas. O valor máximo de isolamentos positivos foi observado nas amostras colhidas após 60 horas de retenção. Ressalte-se que 37,5% das amostras mantiveram-se bacteriologicamente positivas após a supressão da retenção.

Os possíveis esclarecimentos da observação da ocorrência de isolamentos bacteriológicos em amostras de leite de vacas com 10% de retenção láctea, não acompanhada de sinais evidentes de inflamação foram a seguir detalhados:

1 – As bactérias isoladas devem além de colonizarem-se no o tecido epitelial de revestimento da mama, manifestar em plena patogenicidade para desenvolver o processo inflamatório infeccioso. De fato, Emanuelson et al. (1987), afirmaram baseados em suas pesquisas: “embora haja isolamento bacteriano no leite, isso não seria equivalente à ocorrência de mastite”.

2 – A retenção exagerada de leite pós-ordenha, representaria por si só condição irritativa das estruturas internas da mama, sendo por isso considerada fato predisponente a instalação e colonização bacteriana, como foi demonstrado na presente pesquisa. Tal condição confirmou observação anterior de Goff e Schmidt (1967), que em procedimento de omissão de ordenha destacaram maior número de leucócitos no leite residual com predomínio de polimorfonucleares neutrófilos e detecção de cerca de 17% de mamites, nos animais utilizados na pesquisa.

3 – A produção de quadro sintomático de mamite, com alterações significativas de alguns constituintes lácteos com evidente valor diagnóstico, seria dependente do tempo de atuação dos estímulos dos agentes causadores das alterações da mama e de sua patogenicidade. Por tal razão, na presente dissertação de mestrado, não foram observadas significativas modificações dos constituintes lácteos das vacas com 10% de retenção, como foram salientadas por Holdaway et al. (1996). Esses pesquisadores observaram aumento dos valores do pH, eletrocondutividade, número de células somáticas detectadas em amostras de úberes infectados. Nesses animais ocorreria, também, a diminuição do teor de lactose láctea. Por conveniência e elucidação de duvidas Emanuelson et al.

(1987) afirmaram, discordando de Gieseck e Viljoen (1974), que a combinação de dois indicadores para o diagnóstico das mamites determinariam apenas um pequeno aperfeiçoamento no diagnóstico clínico.

5.3 AVALIAÇÃO DA CONSTITUIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, BIOQUÍMICA, CELULAR E MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS LÁCTEAS COLHIDAS DOS ANIMAIS DO GRUPO EXPERIMENTAL 2 – G2

O aumento do volume de retenção láctea em bovinos determinou significativas variações dos constituintes da secreção da glândula mamária determinados por métodos físico-químicos. A retenção láctea de 15% determinou aumento da eletrocondutividade após 24 horas de retenção, persistindo até 60 horas, para uma vez cessada a retenção haver retorno aos valores iniciais. Comportamento similar observou-se nos teores de cloretos no leite, com uma diferença: suprimida a retenção houve evidente diminuição do valor desse parâmetro, mas ele ainda permaneceria significativamente maior que o inicial. Em contraposição, o índice cloreto/lactose aumentou significativamente 24 horas após o início da retenção, retornando aos valores iniciais uma vez suprimida a retenção. Tal comportamento do índice cloreto/lactose foi conseqüente ao comportamento dessas variáveis após a retenção de 15% de leite: aumento do cloreto e diminuição da lactose.

As retro-descritas variações dos parâmetros constitucionais do leite de vacas com 15% de retenção concordaram com as conclusões apresentadas por Natzke et al (1965) que verificaram aumento da concentração de cloretos após a omissão da

ordenha, causando retenção láctea, com tendência ao retorno dos valores iniciais, após uma semana de aplicação, novamente, do sistema habitual de ordenha. Fernando et al (1982) observaram que o leite residual obtido no repasse da ordenha apresentava maior magnitude da eletrocondutividade, tornando possível imaginar-se que se maior volume dessa fração fosse retida, haveria significativo aumento desses valores na ordenha feita a seguir. Em contrapartida Hamann e Gyodi (2000) verificaram que o aumento do número de ordenhas causaria aumento do teor de cloreto no leite e que o retorno às ordenhas, a cada 12 horas, ocasionaria sua diminuição. Assim sendo, seria lógico supor-se que esse aumento do teor de cloreto determinariam a maior magnitude da eletrocondutividade.

A apreciação dos resultados referidos para os parâmetros físico-químicos demonstrou que a retenção de maior volume de leite diariamente produzido determinava significativas variações, que não foram detectadas, no caso de apenas 10% de retenção láctea. Porém não se observaram diferenças significativas do potencial hidrogeniônico também quando a retenção láctea foi de 15%.

De forma paradoxal, o aumento dos parâmetros lácteos, considerados como constituintes maiores do leite, não determinou significativas variações dos teores de gordura, proteína e sólidos totais. Demonstrou-se, portanto que apesar da retenção láctea determinar algumas variações significativas nesses parâmetros elas não seriam diretamente dependentes do volume da retenção, isto é, 10 ou 15% de retenção láctea. Assim sendo, a concentração de gordura do leite diminuiu após 24 horas e aumentou após 60 horas de retenção; os teores de proteína não apresentou variações significativas, também, durante o processo de 15% de retenção e o

comportamento da concentração de sólidos totais foi idêntico e paralelo ao da taxa de gordura: diminuindo após 24 horas de retenção e aumentando com 60 horas de retenção. A análise crítica comparativa corresponderia às apresentadas anteriormente, ao se considerar as conseqüências da retenção láctea de 15% sobre os parâmetros em questão.

Em relação ao comportamento do teor de lactose no leite de vacas, obtido de animais com 15% de retenção verificou-se gradativa e significativa diminuição de seus valores após 36 horas, retornando à concentração inicial, depois de suprimida retenção. Considerou-se o comportamento desse parâmetro lácteo, de rotineira utilização no diagnóstico dos processos inflamatórios da glândula mamária, coerente com as determinações de cloreto no leite, pois: a relação entre o teor de lactose e concentração de cloreto no leite foi considerada como responsável pela manutenção da isotonia da secreção láctea – o consumo da lactose ou a diminuição da sua formação determinaria a transudação de maior quantidade de íons cloretos plasmáticos, para manter a isotonicidade da secreção (SCHALM et al., 1971).

A avaliação indireta da celularidade láctea, pela prova do CMT, em amostras de leite obtidas de vacas submetidas a processo de 15% de retenção láctea demonstrou variações significativas dos resultados, pois todas as amostras obtidas antes do início do processo de retenção e após sua supressão foram negativas e igual resultados foi detectado após 12 horas de retenção. A seguir, de 24 a 60 horas de retenção até 13,9% das amostras apresentavam prova do CMT com escore igual a 1+. Paradoxalmente, a determinação do número de células somáticas por método eletrônico não demonstrou haver diferença significativa entre os resultados obtidos nos vários momentos de colheitas das amostras. A análise comparativa dos

resultados com as manifestações obtidas na literatura compulsada foram coerentes com a discussão apresentada anteriormente, mas os pesquisadores que se dedicaram ao tema, jamais avaliaram o volume de leite retido na glândula mamária. Os resultados obtidos permitiram que se afirmasse, categoricamente, que a positividade da prova do CMT dependeria, em sua intensidade, do volume de leite retido. Mas restariam ainda duas dúvidas a serem elucidadas.

1 – A aplicabilidade e eficiência da avaliação estatística com transformação logarítmica do número de células somáticas teriam sensibilidade e especificidade suficientes para tais avaliações e, nestas circunstâncias não seria mais recomendável fazer-se apenas uma avaliação biológica dos resultados absolutos obtidos?

2 – Qual seria a eficiência real da avaliação qualitativa da celularidade – prova CMT, em determinar a real quantidade de células somáticas do leite?

A elucidação dessas questões não era objetivo básico da presente dissertação de mestrado e suas respostas deveriam ser programadas para as adequadas respostas, pois inúmeras falhas de interpretação foram apresentadas e consideradas como verdades absolutas na literatura especializada, dando-se ênfase a fato clínico inadmissível – a ocorrência de mamites subclínicas.

Os resultados obtidos nesta pesquisa demonstraram ter havido incoerência das manifestações observadas, pois a expectativa era de que o maior escore de CMT deveria corresponder ao maior número de células somáticas existentes no leite. Assim sendo, o maior escore do CMT não representaria maior celularidade láctea, merecendo o tema novas pesquisas para elucidação definitiva.

Os delineamentos experimentais relacionados às condições de constituição láctea, com fim de diagnóstico, ou de seu aperfeiçoamento tem sido paradoxal e freqüentemente, por especificidades biológicas, não responderiam na forma esperada. Porém os objetivos das pesquisas não visariam apenas resolver situações particulares, mas também e, talvez principalmente, apresentar novas questões para posteriores resoluções. Assim sendo, na avaliação da retenção láctea de 15% observaram-se modificações significativas de parâmetros indicativos da ocorrência de processo inflamatório, sem que houvesse isolamento de agentes microbianos patogênicos ou não, no leite desses animais. À respeito disso, duas considerações poderiam ser apresentadas: em primeiro lugar destacou-se a pequena sensibilidade do isolamento bacteriológico único, para detectar os agentes microbianos e a seguir a resistência orgânica, atividade celular e imunológica desenvolvidas para impedir ou controlar a infecção das estruturas internas da glândula mamária.

Apesar das considerações apresentadas não restara dúvidas que a retenção láctea de 15% representa um significativo fator etiológico predisponente das mamites, confirmando prévias afirmações de Birgel (1982). Além do mais, as alterações das características constitucionais do leite – eletrocondutividade, concentração de cloretos e de lactose, do índice cloreto/lactose e escore do CMT, demonstraram a ocorrência de processo inflamatório não infeccioso, que como recomendado pela Clínica Ginecológica e Obstetrícia da Escola Superior de Veterinária de Hannover, deveria ser denominada de distúrbio da secreção láctea (BIRGEL, 2004).

5.4 AVALIAÇÃO DA CONSTITUIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, BIOQUÍMICA, CELULAR E MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS LÁCTEAS COLHIDAS DOS ANIMAIS DO GRUPO EXPERIMENTAL 3 – G3

O aumento do volume de leite retido manteve similares alterações dos constituintes da secreção da glândula mamária determinados por provas físico-químicas já anteriormente detalhadas. Assim sendo, nas vacas com 20% de retenção láctea, não se observou variação significativa dos resultados do pH que pudessem ser atribuídas à retenção láctea. A eletrocondutividade apresentou valor significativamente maior após 36 horas de retenção, para a seguir 48 e 60 horas após a retenção apresentar resultados equivalentes ao da fase inicial do experimento. Ao contrário do que se observou nos casos de 10 e 15% de retenção láctea, após a supressão da retenção o resultado foi, significativamente, menor de que o observado no momento inicial. Entretanto, variações mais coerentes, com os resultados obtidos em vacas com 10 e 15% de retenção, foram verificadas na concentração de cloreto lácteo, com aumento gradativo e significativo, com o aumento do período de retenção, sem diferenças desse tipo observada após 36 horas de retenção e, após a supressão da retenção esses valores retornaram a normalidade inicial. A partir de 36 horas de retenção, também, houve aumento significativo do índice cloreto/lactose, com o retorno aos valores iniciais após a cessação da retenção.

Por não haver, na literatura citações referentes, a ação quantificada do volume de leite retido sobre os elementos constituintes da secreção da glândula mamária, determinados por provas físico-químicas, não houve a possibilidade de se

fazer uma avaliação comparativa crítica, apenas realçou-se a conveniência de considerar válidos os conceitos e citações, anteriormente, detalhados.

Os constituintes bioquímicos maiores do leite de vacas, com 20% de retenção apresentaram, em termos, variações semelhante às descritas para os outros grupos experimentais. As variações foram estatisticamente significantes, o que demonstra que o maior volume de leite acumulado na glândula mamária no período pós-ordenha tem efeito deletério na qualidade higiênica do produto, impossibilitando ou dificultando sua distribuição para o consumo das populações ou inviabilizando a produção de laticínios de boa qualidade. Tais afirmações concordaram com conclusões anteriormente apresentadas por alguns pesquisadores. Kitchen (1981) afirmou, categoricamente, em sua revisão sobre o progresso da produção leiteira que: “as inflamações da glândula mamária causariam significativas modificações na composição do leite secretado, representando para os produtores grandes prejuízos por diminuição da produção e desqualificação do leite e para os fabricantes de laticínios a diminuição, principalmente, da caseína, o que traria problemas para o processamento da matéria prima, produzindo laticínios de péssima qualidade e de pequeno tempo de prateleira”.

Recentemente, Hamann (2002) em pesquisa relacionado ao número de células somáticas com a composição do leite afirmou, ao concluir, que não estava ainda finalizada a forma de combinar o pagamento da produção láctea, com o atual conhecimento científico das alterações da constituição láctea, quando a produção leiteira não obedecer aos preceitos higiênicos vigentes. Assim recomendou-se levar em conta os interesses econômicos da indústria leiteira, como, também, a exigência natural dos consumidores demandando produtos lácteos de excelente qualidade.

A retenção láctea de 20% da produção diária determinou significativas alterações dos escores da prova do CMT. Os resultados obtidos antes do início da retenção láctea e após a supressão foram em todas vacas negativos. Entretanto, após 12 horas de retenção, apareceram os primeiros resultados positivos e seus escores foram maiores do que os observados nos casos de 10 e 15% de retenção, sendo a maioria dos escores 1+, porém observaram-se escores 2+ e 3+. Assim sendo, a avaliação qualitativa da celularidade láctea demonstrou, associada aos resultados das demais exames, rotineiramente, recomendados para o diagnóstico clínico das enfermidades da mama, que a retenção de 20% de leite pós-ordenha, por períodos maiores do que 12 horas, determinou a ocorrência em vários animais evidentes manifestações de distúrbio da secreção láctea.

Apesar das significativas alterações descritas para os resultados da prova do CMT, paradoxalmente, não se comprovou qualquer variação significativa do número de células somáticas determinadas por contagem eletrônica. Assim sendo, os comentários apresentados ao se discutir esses resultados, nos demais grupos experimentais foram considerados válidos e não serão novamente relatados.

Como ressaltado na avaliação da frequência de isolamento bacteriano positivo em amostras de leite de vacas com retenção de 10 e 15%, colhidas no momento inicial da retenção, a frequência de isolamento negativo foi absoluta, pois em todas as culturas realizadas não houve crescimento bacteriano. Porém, após 12 horas de retenção foram detectados isolamento positivo em 7,5% da amostras, aumentando a

freqüência com o decorrer dos procedimentos de retenção, alcançando a freqüência de 12,5% após 48 horas de retenção. A seguir esses valores diminuíram, em dois momentos – após 60 horas de retenção e depois da supressão da retenção, ambas com freqüência de isolamento igual a 10,0% das amostras examinadas. Não houve a possibilidade de se fazer uma avaliação comparativa com as informações de resultados obtidos na literatura compulsada, pois nas pesquisas referentes ao assunto não houve nenhuma que se referiu ao volume de retenção. Assim sendo, julgou-se suficiente os comentários apresentados anteriormente. Mas aproveitou-se a oportunidade para mais uma vez ressaltar a opinião que a retenção láctea tem ação significativa como fator etiológico predisponente à instalação de agentes infecciosos causadores da mamite.

5.5 AVALIAÇÃO DA CONSTITUIÇÃO DO LEITE DURANTE A RETENÇÃO LÁCTEA DE 10, 15 E 20% E ESTABELECIMENTO DA CORRELAÇÃO DESSAS VARIÁVEIS

O delineamento experimental proposto para esta dissertação de mestrado permitiu que fossem reunidos os resultados obtidos nas amostras colhidas de todos os animais dos três grupos experimentais, a saber, vacas com 10, 15 e 20% de retenção láctea, bem como estudar a correlação entre os resultados obtidos para os vários elementos constituintes do leite.

A avaliação e a comparação dos resultados obtidos nas amostras dos três grupos experimentais demonstrou existirem diferenças estatisticamente significativas para as seguintes variáveis: **pH** – o resultado do conjunto de amostras de vacas com 20% de retenção láctea foi significativamente menor daqueles do grupo com retenção de 15% e este foi menor do que o resultado dos animais com 10% de retenção; **eletrocondutividade** – os maiores valores foram obtidos nos animais do grupo experimental com retenção de 10% e 20% de leite, sendo significativamente maiores do que os referidos para vacas com 15% de retenção láctea; **índice cloreto/lactose** e a **concentração láctea de cloreto** – a magnitude do índice e do teor desse constituinte aumentaram gradativa e significativamente com o aumento do volume de leite retido; **os teores de gordura e sólidos totais** – diminuíram gradativamente, com o aumento do volume de retenção láctea, demonstrando, além disso, a dependência da quantidade de sólidos totais e da concentração de gordura láctea; **proteína total** – as variações da fração protéica total láctea de vacas com retenção, apesar de significativas não foram dependentes do volume de leite retido; **lactose** – apesar desse constituinte lácteo ter demonstrado nos grupos

experimentais diminuição significativa e gradativa de seus teores durante a retenção, na presente avaliação foi demonstrado que as diferenças dos resultados foram independentes do volume de leite retido; **número de células somáticas** – os resultados obtidos nos animais com 10% de retenção láctea foram significativamente maiores do que os resultados do grupo experimental com vacas que retinham 15 e 20% de leite; **isolamento bacteriano positivo** – durante e após as retenções lácteas foi demonstrado que a retenção láctea favorecia a instalação de infecções microbianas, comprovada por isolamento de cepas bacterianas, porém as freqüências de isolamento foram independentes do volume de leite retido.

Os referidos resultados obtidos em amostras de leite de vacas, nas quais foi induzida a retenção de leite concordaram com os conceitos apresentados nas pesquisas de Goff e Schmidt (1967), Hamann e Gyodi (2000), Holdaway et al (1996), Natzke et al (1965) e Östensson (1993).

A análise dos resultados obtidos para os diferentes constituintes do leite das vacas dos três grupos experimentais, não demonstraram, a exceção para os teores de cloretos e índice cloreto/lactose, dependência ou relação direta com o aumento do volume de leite retido. Da mesma forma não foi possível estabelecer uma correlação direta entre o volume de leite retido e a freqüência de isolamento de cepas bacterianas das amostras de leite. Entretanto, tais observações não deixaram dúvidas que a retenção láctea determinou sintomas evidentes da ocorrência de processos inflamatórios da glândula mamária, caracterizados por alteração quantitativa ou qualitativa da constituição láctea. As referidas alterações foram observadas nas variáveis de maior significado no diagnóstico das mamites: eletrocondutividade; teores de cloreto lácteo e lactose; índice cloreto/lactose; e avaliação qualitativa da celularidade láctea pela prova de CMT, associadas ao

isolamento bacteriológico de agentes determinantes das mamites. Semelhantes afirmações, mas em circunstâncias diferentes, já foram destacadas por vários pesquisadores como Natzke et al (1965) quando da omissão de ordenha; Emanuelson et al (1987) que ao estudar testes para triagem de mamites, recomendando, no mínimo, a combinação de dois testes para melhorar a presunção da ocorrência das mamites; por Holdaway et al (1996) ao estudar a composição láctea das várias frações de leite obtidos em uma ordenha, comparando vários métodos indiretos de diagnóstico das inflamações incipientes da glândula mamária durante a lactação e; por Urech et al (1999) ao estudar as variações da constituição das frações lácteas da ordenha, objetivando o diagnóstico das mamites incipientes.

O delineamento experimental elaborado para o perfeito desenvolvimento desta dissertação de mestrado permitiu que fossem estabelecidas correlações significativas entre os resultados das determinações dos constituintes do leite das vacas com retenção láctea de 10%, 15% e 20%. As correlações positivas e estatisticamente significativas foram as seguintes: **cloreto e eletrocondutividade**; **índice cloreto/lactose e cloreto**; **índice cloreto/lactose e eletrocondutividade** e; **sólidos totais e gordura**. As duas correlações negativas significativas foram: **lactose e eletrocondutividade** e **lactose e cloreto**. A existência da correlação entre os resultados obtidos em amostras de leite para vários constituintes da secreção da glândula mamária já fora vislumbrado ou comprovado por outros pesquisadores (NATZKE *et al.*, 1965; WEELOCK *et al.*, 1966 E HAMANN & GYODI, 2000).

A comprovação da existência de correlação significativas entre os resultados de vários constituintes do leite permitiu que se afirmasse, ser as anteriormente detalhadas determinações laboratoriais de amostras lácteas, necessariamente, incluídas no exame clínico da mama, como recomendam os modernos semiologistas. Assim sendo, o plano do exame semiológico da glândula mamária ficaria desta forma constituído: exame físico da mama e macroscópico do leite, associados às avaliações laboratoriais - exame físico-químico, bioquímico, celular e microbiológico, fundamentais para o estabelecimento do perfeito diagnóstico das possíveis enfermidades da glândula mamária.

6 CONCLUSÃO

A criteriosa análise dos resultados obtidos nesta dissertação de mestrado, cujo delineamento experimental objetivou avaliar a influência da retenção láctea nos constituintes físico-químicos, bioquímicos, celulares e microbiológicos da secreção da glândula mamária, permitiram as conclusões a seguir detalhadas.

1- A retenção láctea determinou variações significativas na constituição físico-químicas, bioquímicas e microbiológica do leite.

2- Os valores da eletrocondutividade, da concentração láctea de cloreto, do índice cloreto/lactose e a frequência de isolamentos bacteriológicos positivos aumentaram, significativamente, com o aumento do período de retenção; em contraposição os teores lácteos de lactose diminuíram.

3- Os valores dos teores de cloreto e o índice cloreto/lactose aumentaram de forma diretamente proporcional ao aumento do volume da retenção láctea, ao passo que os demais parâmetros foram influenciados pela retenção mas, independentemente, do volume de leite retido.

4- O número de células somáticas do leite não sofreu variações que pudessem ser atribuídas à retenção láctea; porém a avaliação qualitativa da celularidade pela prova do CMT demonstrou que a retenção láctea determinava o aparecimento de escores de maior magnitude, retornando aos escores iniciais negativos após a supressão da retenção.

5- A retenção láctea, independentemente, de seu volume, determinou aumento marcante da frequência de isolamentos bacteriológicos positivos, e em muitos casos, o isolamento se mantinha, após a supressão da retenção láctea.

6- A análise dos resultados comprovou a existência de correlação positiva e significativa entre as seguintes variáveis estudadas: teor de cloreto e eletrocondutividade; índice cloreto/lactose e teor de cloreto; índice cloreto/lactose e eletrocondutividade e; concentração de sólidos totais e de gordura. A correlação foi negativa e significativa entre: teor de lactose e eletrocondutividade e concentração de lactose e cloreto.

7- As manifestações clínicas da retenção láctea, detectadas pela determinação das alterações dos elementos constituintes do leite e a frequência de isolamentos, caracterizaram um processo inflamatório incipiente, representando um fator etiológico predisponente à ocorrência de mamites.

8- Pelo desempenho das provas utilizadas para a avaliação dos efeitos da retenção láctea na secreção da glândula mamária, recomendou-se para complementação do exame físico da mama a realização das seguintes provas subsidiárias ao diagnóstico clínico: prova do CMT; determinações da eletrocondutividade; dos teores de cloreto e lactose; incluindo o cálculo do índice cloreto/lactose e os isolamentos microbiológicos com identificação das cepas bacterianas isoladas.

REFERÊNCIA

- ALI, A. K. A.; SHOOK, G. E. Na optimum transformation for somatic cell concentration in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 3, p. 487-490, 1908
- ARAUJO, W. P. **Constituição Físico-química, celular e microbiológica de leites tipo A, B e especial colhidos de vacas criadas no Estado de São Paulo. Contribuição à semiologia da glândula mamária**. 1994. 54 f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.
- ASHWORTH, U. S.; FORSTER, T. L.; LUEDECKE, L. Relationship between the California Mastitis Test reaction and the composition of milk from opposite quarters. **Journal of Dairy Science**, v. 50, n. 7, p. 1078-1082, 1967.
- AYADI, M.; CAJA, G.; SUCH, X.; ROVAI, M.; ALBANELL, E. Effect of different milking intervals on the composition of cisternal and alveolar milk in dairy cows. **Journal of Dairy Research**, v. 71, p. 304-310, 2004.
- BENITES, N. R. **Estudo dos aspectos microbiológicos e histopatológicos da mastite infecciosa bovina**. 1996. 169 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.
- BERNING, L. M.; SHOOK, G. E. Prediction of mastitis using milk somatic cell count, N-acetyl- β -D-Glucosaminidase and lactose. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 7, p. 1840-1848, 1992
- BIRGEL, E. H. Semiologia da glândula mamária de ruminantes. In: FEITOSA, F. L. **Semiologia Veterinária – arte do diagnostico**. São Paulo: Roca, 2004. p. 352-398.
- BIRGEL, E.H. Avaliação das provas utilizadas no diagnostico da mamite bovina. In: BIRGEL, E. H.; LARSSON, M. H. M. A.; HAGIWARA, M. K.; VASCONCELOS, S. A.; LARSSON, C. E.; OGASSAWARA. S.; BENESI, F. J. **Patologia Clínica Veterinária**. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982, p. 177-213.
- BRITO, J. R. F.; CALDEIRA, G. A. V.; VERNEQUE, R. S.; BRITO, M. A. V. P. Sensibilidade e especificidade do *Califórnia Mastitis Test* como recurso diagnóstico da mastite em relação a contagem de células somáticas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 49-53, 1997.
- BRYAN, C. S.; TROUT, G. M. The influence of streptococci infection of udder on the flavor, chloride content and bacteriological quality of milk produced. **Journal of Dairy Science**, v. 18, n. 2, p. 777-792, 1935.
- CARVALHO, M. P. Manipulação da composição do leite por meio do balanceamento de dietas de vacas leiteiras. In: LARANJA DA FONSCA, L. F.; VEIGAS DOS SANTOS, M. **Qualidade do leite e controle da mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175 p.

COSTA, E. O.; VENZON, P.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T.; GARINO, F.; SILVA, J. A. B. Estimativa de prejuízos devido a mastite subclínica no Estado de São Paulo – Brasil. CONGRESSO PAN AMERICANO DE CIENCIAS VETERINARIAS, 15. 1996, Campo Grande, **Anais....**Campo Grande: [S.N] 1996. p. 256. res. 964.

CUNHA, M. S. **Contribuição ao diagnóstico clínico das mastites. Influência das fases da lactação, fases da ordenha e dos processos inflamatórios na composição físico-química, celular e microbiológica do leite de vacas da raça Holandesa Preta e Branca.** 1998. 97 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

D'ANGELINO, J. L.; BIRGEL, E. H.; CUNHA, M. S.; FUGIMOTO, S. Estudo comparativo do Milk Checker em relação aos parâmetros físico-químico, citológico e microbiológico do leite. In. CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINARIA, 21. 1988, Salvador. **Anais...** P. 235.

DOHOO, I. R.; MEEK, A. H. Somatic cells counts in bovine milk. **Canadian Veterinary Journal**, v. 23, n. 4, p. 119-125, 1982.

EMANUELSON, U.; OLSSON, T.; HOLMBERG, O.; HAGELTON, M.; MATTILA, T.; NELSON, L.; ASTROM, G. Comparison of some screening tests for detecting mastitis. **Journal of Dairy Science** v. 70, n. 4, p. 880-887, 1987.

FERNANDO, R. S.; RINDSING, R. B.; SPAHR, L. Electrical conductivity of milk for detection of mastitis. **Journal Dairy Science**, v. 65, p. 659-664, 1982.

FERREIRO, L.; SOUZA, H. M.; HEINECK, L. A. Influência da mastite bovina subclínica na composição físico-química do leite de gado mestiço. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.35, n.208: p.19-24, 1980.

GIESECK, W. H.; VILJOEN, M. H. The diagnosis of subclinical mastitis in lactating cows. A comparison of cytological methods and a monovalent radical immunodiffusion test. **Journal Veterinary Research**. v. 41, p. 51-56, 1974.

GOFF, K. R.; SCHMIDT, G. H. Effect of Eliminating Machine Stripping of Dairy Cows on Milk Production, Residual Milk, and Mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 50, n. 11, p. 1787-1791, 1967.

GORDON, W. A.; MORRIS, H. A.; PACKARD, V. Methods to detect abnormal milk – a review. **Journal of Food Protection**, v. 43, n. 1, p. 58-64, 1980.

HAMANN, J. Relationships between somatic cell count and milk composition. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n. 372, 2002.

HAMANN, J.; GYODI, P. Electrical conductivity. **Milchwissenschaft**, v. 55, n. 6, p. 302-307, 2000.

HAMANN, J.; ZECCONI, A. Evaluation of the electrical conductivity of milk as a mastitis indicator. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n. 334, p. 5-22, 1998.

HARMON, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 2103-2112, 1994.

HILLERTON, J. E.; WALTON, A. W. Identification of subclinical mastitis with a hand-held electrical conductivity meter. **The Veterinary Record**, v. 128, n. 22, p. 513-515, 1991.

HOLDAWAY, R. J.; HOLMES, C. W.; STEFFERT, I. J. A comparison of indirect methods for diagnosis of subclinical intramammary infection in lactating dairy cows. **The Australian Journal of Dairy technology**, v. 51, p. 64-71, 1996.

ISAKSSON, A.; ARNARP, L. Quantitative estimation of residual milk in bovine udder - a methodological study. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 29: p. 259-262, 1988.

KANGASNIEMI, R.; PELKONEM, S.; TANHUANPAA, E. Absolute and relative effects of bacteria on the level of cell count, NaGase, BSA, Na, K, and electrical conductivity in quarter foremilk of Ayrshire cows. In: SYMPOSIUM ON MASTITIS CONTROL AND HYGIENIC PRODUCTION OF MILK, 1986, Espoo. **Proceedings...** Bruxelles, Belgique: IDF, 1986, p. 173-178.

KENNEDY, B. W.; SETHAR, M. S.; TONG, A. K. W.; MOXLEY, J. E.; DOWNEY, B. R. Environmental factors influencing test-day somatic cell counts in Holsteins. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 65, n. 2, p. 275-80, 1982.

KIRK, J. H. Somatic cells in milk: current concepts. **Compendium on Continuing Education for Practicing Veterinarian** - Large Animal Section, v. 6, n. 4, p.237-243, 1984.

KITCHEN, B. J. Review of the progress of Dairy Science: Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. **Journal of Dairy Research**, v. 48, p. 167-188, 1981.

KNIGHT, C. H.; HIRDT, D.; DEWHURST, R. J. Milk accumulation and distribution in the bovine udder during the interval between milkings. **Journal of Dairy Research**, v. 61, p. 167-177, 1994.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. C. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

LARANJA DA FONSCA, L. F.; VEIGAS DOS SANTOS, M. **Qualidade do leite e controle da mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175 p.

LENNETE, E. H.; BALOWS, A.; HAUSLER, W. J. **Manual of clinical microbiology**. 4. ed. Washington: American Society of Microbiological, 1995.

MURUGAIYAH, M.; RAMAKRISHNAN, P.; OMAR, A. R.; KNIGHT, C. H.; WILDE, C. J. Lactation failure in crossbred Sahiwal Friesian cattle. **Journal of Dairy Research**, v. 68, n. 2: p. 165-174, 2001.

NATZE, R. P.; EVERETT, R. W. Normal milk somatic cell counts. **Journal of Milk Food Technology**, v. 35, n. 5, p. 261-263, 1972.

NATZKE, R. P.; SCHULTZ, L. H.; BARR, G. R.; HOLTMANN, W. B. Variation in mastitis screening tests and milk composition of udder quarters under normal conditions and following omission of a milking. **Journal of Dairy Science**, v. 48, n. 10, p. 1295-1299, 1965.

ÖSTENSOON, K. Variations during lactation in total and differential leukocyte counts, N-acetyl- β -D-glucosaminidase, antitrypsin and serum albumin in foremilk and residual milk from non-infected quarters in the bovine. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 34, p. 83-93, 1993.

ÖSTENSOON, K.; HAGELTORN, M.; ASTRÖM, G. Differential cell counting in fraction-collected milk from Dairy Cows. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 29, p. 493-500, 1988.

PAAPE, M. J.; TURCKER, H. A. Somatic cell content variation in fraction-collected milk. **Journal of Dairy Science**, v. 49, n. 3, p. 265-267, 1966.

RENNER, E. Onvestigations on some parameters of milk for the detection of subclinica mastitis. In: **IDF SEMINAR ON MASTITIS CONTROL**, 1975, 1975, Bruxelles: International Dairy Federation, [197-], p. 53-58.

ROY, J. H. B. **The calf. Manegement and feeding**. 4. ed. Ilife, London: Butterworth, 1980, v. 1.

RUSHEN, J.; DE PASSILLE, A. M.; MUNKSGAARD, L. Fear of people by cows and effects on milk yield, behavior, and heart rate at milking. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 4: p.720-727, 1999.

RUSHEN, J.; MUNKSGAARD, L.; MARNET, P.G.; DE PASSILLE, A. M. Humans contact and the effects of acute stress on cow at milking. **Appl Animal Behavior Science**, v. 73, n. 1, p. 1-14, 2001.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1998. 221 p.

SANDHOLM, M.; MATTILA, T. Mechanisms of infection and inflammation of mammary gland – an overview. In: SYMPOSIUM ON MASTITIS CONTROL AND HYGIENIC PRODUCTION OF MILK, 1986, Espoo. **Proceedings...** Finland, 1986. p. 7-13.

STATISTICAL ANALISYS SYSTEM. **SAS user's guide**: statistics. Cary, SAS, 2000.

SCHALM, O. W.; CARROL, E. J.; JAIN, N. C. **Bovine Mastitis**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1971. 360 p.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, B. S. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 130, n. 5, p. 199, 1957.

THIERS, F. O.; BENITES, N. R.; RIBEIRO, A. R.; COSTA, E. O. Correlação entre contagem direta de células somáticas e o teste de "California Mastitis Test" (CMT) no leite de vacas. **Napgama**, n. 4, p. 9-12, 1999.

THOMPSON, P. D.; PAAPE, M. J.; SMITH, W. J. Residual milk yield as affected by dose and time of injection of oxytocin. **Journal of Dairy Research**, v. 40, p. 21-227, 1973.

URECH, E.; PUHAN, Z.; SCHÄLLIBAUM, M. Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2402-2411, 1999.

VANGROENWEGHE, F.; DOSOGNE, H.; BURVENICH, C. Composition and milk cell characteristics in quarter milk fraction of dairy cows with low cell count. **The Veterinary Journal**, v. 164, p. 254-260, 2002.

VANLANDINGHAM, A. H.; CHAS, E.; WEAKLEY, J. R. MOORE, E. N.; HENDERSON, H. O. Mastitis. I. Relationship of development of mastitis to changes in the chlorine, lactose and casein number of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 24, n. 1, p. 383-398, 1941.

WARD, G. E.; SCHULTZ, L. H. Relationship of somatic cells in quarter milk to type of bacteria and production. **Journal of Dairy Science**, v. 55, n. 10, p. 1428-1431, 1972.

WHEELOCK, J. V.; ROOK, J. A. F.; DODD, F. H.; GRIFFIN, T. K. **Journal of Dairy Research**, v. 33, p. 161-176, 1966.

WOOLFORD, M. W.; WILLIANSOON, J. H.; HENDERSON, H. V. Changes in electrical conductivity and somatic cell count between milk fractions from quarters subclinically infected with particular mastitis pathogens. **Journal of Dairy Research**, v. 65 n. 2, p. 187-198, 1998.