VALÉRIA APARECIDA CAOBIANCO SANT'ANA

Proteinograma do leite de vacas: padrões e variabilidade

São Paulo
2004

VALÉRIA APARECIDA CAOBIANCO SANT'ANA

Proteinograma do leite de vacas: padrões e variabilidade

Tese 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 Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:
Clínica Médica

Área de concentração:
Clínica Veterinária

Orientador:
Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel

São Paulo
2004

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1400 FMVZ	<p>Sant'Ana, Valéria Aparecida Caobianco Proteinograma do leite de vacas: padrões e variabilidade / Valéria Aparecida Caobianco Sant'Ana. - São Paulo : V. A. C. Sant'Ana, 2004. 161 f. : il.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, 2004.</p> <p>Programa de Pós-graduação: Clínica Veterinária. Área de concentração: Clínica Veterinária.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel.</p> <p>1. Proteinograma do leite. 2. Vaca leiteira. 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida. 4. Fatores de variabilidade. 5. Mamites. 6. Mastites. I. Título.</p>
----------------	---

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: SANT'ANA, Valéria Aparecida Caobianco
Título: Proteinograma do leite de vacas: padrões e variabilidade

Tese 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 Doutor em Medicina Veterinária

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Ao Renato, pelo nosso amor que cresce a cada dia e gerou um fruto maravilhoso.

À Julia, a frutinha que me ensinou a sorrir nas horas mais difíceis.

*Aos meus pais, Ivone e Harley pelo apoio incondicional,
Aos meus irmãos, Junior e Adriano, pelo carinho.
Aos meus cunhados, cunhadas, sobrinhos e Da. Edite, pela amizade.*

*Ao Caríssimo Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel, pela orientação, fundamental
na minha formação e, muito mais pela amizade e confiança durante todos
esses anos.*

*À querida amiga Regina S. M. Mirandola, pela amizade e todo o apoio
técnico e pessoal nunca negados.*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel pela eterna orientação.

Ao Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Jr., que colaborou de forma definitiva para realização desta tese.

Ao Prof. Dr. Jurandir Fagliari pelas importantes sugestões e fundamental colaboração para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos Profs. Drs. Wilson Roberto Fernandes, Wanderley P. de Araújo, Fernando J. Benesi, Enrico Lippi Ortolani, Alice M.M.P. Della Libera, Mitika, Márcia Mery, Maria Helena Larsson e Carlos Eduardo Larsson e demais professores do Departamento de Clínica Médica, pela convivência e valiosas sugestões.

Ao amigo Dr. Juarez Távora, pelo apoio, experiência e amizade.

Aos queridos colegas de pós-graduação Sandra Kitamura, Andréa Rosenfeld, Andréa Parra, Paula Andréa de Santis, Daniela, Márcio, Marta Lizandra, e demais colegas e, especialmente ao Pierre Soares, pelo tempo de convívio e troca de experiências.

À Tereza Abujanra que muito ajudou nos procedimentos técnicos.

Às funcionárias do laboratório do Departamento de Clínica Médica, Marli, Cláudia e Carmen, pelo apoio técnico e convivência agradável.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica, em especial a Adelaide pelo carinho e amizade.

Ao Prof. Dr. Vicente Borelli e ao Luis Arthur Giufrida pela confiança no meu trabalho.

Ao querido Sebastião P. de Faria Jr. pela grande amizade e exemplo de profissionalismo, pela ajuda e apoio efetivos e fundamentais durante esses anos.

Aos amigos e colegas professores Marilene, Emílio, Kolber, Bruner, Fábio Futema, Aline, Cláudio Camargo, Luis Biondi, Carol, Viviane, Hector por compartilhar as mesmas experiências e proporcionar alegria no convívio do trabalho.

Ao Luis Cláudio, Raquel e Pedro pela amizade e companheirismo.

À Maria de Fátima que, com carinho, cuidou de minha filha, nos meus momentos de ausência.

Aos meus alunos pela oportunidade de renovação.

Aos funcionários da biblioteca da FMVZ-USP pelo auxílio aliado à simpatia.

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Departamento de Clínica Médica pela oportunidade de tanto aprendizado.

À FAPESP por ter aprovado projeto de pesquisa, embora o recurso não tenha sido utilizado por questões administrativas.

RESUMO

SANT'ANA, V. A. C. **Proteinograma do leite de vacas:** padrões e variabilidade. [Cow milk proteinogram: patterns and variability]. 2004. 161 f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

A avaliação das modificações no proteinograma do leite tem sido utilizada como meio de diagnóstico das mamites dos bovinos, pois, em decorrência dos processos inflamatórios na glândula mamária, ocorrem alterações, tanto na concentração dos componentes protéicos do leite, como também, surgimento de compostos protéicos não elaborados no processo de secreção láctea. A técnica de fracionamento protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida mostrou-se eficiente na detecção de pequenas quantidades de proteínas em fluidos orgânicos. As características das proteínas do leite de vacas sadias, e a avaliação de possíveis fatores de variabilidade foram determinadas em 139 amostras de leite de vacas. Os animais foram, inicialmente, submetidos a exame clínico geral e do úbere, complementado por exames físico-químicos, celulares e microbiológicos do leite, complementares ao diagnóstico das mamites. Do conjunto das amostras, 97 eram de vacas sadias, em plena lactação, sendo utilizadas para estabelecer valores padrões dos constituintes do leite de vacas sadias e avaliar a influência racial – Jersey e Gir; e do número de lactações – animais em primeira lactação, duas ou três lactações e, quatro ou mais lactações sobre o proteinograma lácteo. Além do mais a amostragem serviu de base para a avaliação da fase da lactação sobre o quadro protéico e, permitiram a formação de grupos experimentais para avaliação da influência do número de células somáticas, do isolamento bacteriano e do estado de saúde do úbere no proteinograma lácteo, obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida. Os resultados demonstraram influência significativa de fatores raciais no teor de proteína total do soro lácteo, e de suas frações imunoglobulínica, α_1 -antitripsina, β -lactoglobulina, bem como de um conjunto de proteínas do soro lácteo separadas, mas não identificadas; influência do número

de lactações no teor de albumina de origem plasmática, imunoglobulinas, β -lactoglobulina e α -lactoalbumina. A fase da lactação influenciou de forma significativa os teores de proteína total do leite, assim como nas frações protéicas do soro lácteo de vacas sadias, variações evidentes na fase colostrar da lactação. O número de células somáticas influenciou o proteinograma do leite, apenas nas amostras com mais de 1.500.000 células somáticas/ml. Não foi demonstrada a influência significativa do isolamento bacteriano no proteinograma lácteo de vacas. Entretanto, observou-se significativa influência da mamite no proteinograma do leite de vacas, agindo, principalmente, nas proteínas não sintetizadas no ciclo fisiológico de secreção da glândula mamária.

Palavras chave: Proteinograma do leite. Vaca leiteira. Eletroforese em gel de poliacrilamida. Fatores de variabilidade. Mamites. Mastites.

ABSTRACT

SANT'ANA, V. A. C. **Cow milk proteinogram: patterns and variability.** [Proteinograma do leite de vacas: padrões e variabilidade]. 2004. 161 f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

The evaluation of the modifications in milk proteinogram is used as a diagnostic tool for bovine mastitis, once the inflammation of the mammary glands leads to changes in the concentration of milk proteic components, as well as the appearance of proteic components that are not elaborated in the milk secretion process. The technique of protein fractioning by electrophoresis in polyacrylamide gel is effective in detecting small amounts of proteins in organic fluids. The features of milk proteins of healthy cows and the evaluation of possible variability factors were determined in 139 cow milk samples. Animals were first submitted to general clinical examination and udder examination, and to physical-chemical, cellular and microbiological milk tests, complementary to mastitis diagnosis. Of the total samples, 97 were from healthy cows in full lactation, used to establish reference values for the components of healthy cow milk and to evaluate the influence of breed – Jersey and Gir, and number of lactations – first, two or three lactations, and four or more lactations on milk proteinogram. Additionally, sampling was useful as a base for the formation of experimental groups for evaluation of the influence of the number of somatic cells, bacterial isolation and health condition of the udder on milk proteinogram obtained by electrophoresis in polyacrylamide gel. Results showed a significant influence of breed related factors on the level of total protein and its fractions immunoglobulinic, α_1 -antitripsin, β -lactoglobulin in whey, as well as on the level of a group of separated but not identified whey proteins; influence of the number of lactations on the level of albumin of plasmatic origin, immunoglobulins, β -lactoglobulin and α -lactoalbumin. The lactation phase

influenced the levels of milk serum protein significantly, as well as the proteic fractions of healthy cow milk serum, variation evident in the colostrum phase of lactation. The number of somatic cells influenced milk proteinogram only in samples with more than 1,500,000 somatic cells. No significant influence of bacterial isolation on milk proteinogram was demonstrated. However, a significant influence of mastitis on the proteinogram of cow milk was observed, affecting mostly those proteins not synthesized in the physiologic cycle of mammary gland secretion.

Key words: Milk proteinogram. Dairy cow. Electrophoresis in polyacrylamide gel. Variability factors. Mastitis.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Constituição dos grupos experimentais para avaliar a possível influência racial no proteinograma do leite de vacas sadias, criadas em São Paulo - São Paulo – 2004.....	54
Quadro 2 -	Constituição dos grupos experimentais para avaliação de possível influência do número de lactações no proteinograma do leite de vacas sadias, criadas em São Paulo - São Paulo – 2004.....	55
Quadro 3 -	Constituição dos grupos experimentais formados para a avaliação de possível influência da fase da lactação no proteinograma do leite, de vacas sadias criadas em São Paulo - São Paulo – 2004.....	56
Quadro 4 -	Constituição dos grupos experimentais para avaliação da influência do número de células somáticas do leite no proteinograma lácteo de vacas, criadas em São Paulo - São Paulo – 2004.....	57
Quadro 5 -	Constituição dos grupos experimentais para avaliação da influência do resultado do exame microbiológico das amostras de leite no proteinograma lácteo de vacas, criadas em São Paulo - São Paulo – 2004.....	58
Quadro 6 -	Constituição dos grupos experimentais para avaliação da influência da mamite no proteinograma do leite de vacas, criadas em São Paulo - São Paulo – 2004.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Valores médios e desvios padrão das proteínas do leite e frações protéicas do soro lácteo de 97 vacas sadias, em plena lactação - São Paulo – 2004.....	70
Tabela 2 –	Avaliação da influência racial no proteinograma do leite em amostras colhidas de vacas sadias das raças Jersey e Gir. Resultados expressos em valor médio $\pm$ desvio padrão, em mg/dl - São Paulo – 2004.....	72
Tabela 3 –	Avaliação da influência do número de lactações no proteinograma do leite de vacas sadias, em plena lactação. Resultados expressos em valor médio $\pm$ desvio padrão e, em mg/dl - São Paulo – 2004.....	79
Tabela 4 –	Avaliação da influência da fase da lactação no proteinograma do leite de vacas, em várias fases da lactação, sendo 1– fase colostrar (1 ^o . ao 10 ^o . dia); 2– terço inicial (11 ^o . ao 100 ^o . dia); 3-terço médio (101 ^o . ao 270 ^o . dia); e 4- terço final da lactação (mais de 270 dias de lactação). Valores expressos em termos de média $\pm$ desvio padrão e, em mg/dl - São Paulo – 2004.....	86
Tabela 5 –	Avaliação da influência do número de células somáticas no proteinograma do leite e do soro lácteo de vacas, sendo CCS1- até 100.000 células/ml; CCS2- de 100.000 a 500.000 células/ml; CCS3- de 500.000 a 1.500.000 células/ml; e CCS4 - mais de 1.500.000 células/ml. Valores expressos em termos de média $\pm$ desvio padrão e, em mg/dl - São Paulo – 2004.....	92
Tabela 6 –	Avaliação da influência do isolamento microbiológico no proteinograma do leite de vacas. Resultados estratificados segundo o resultado do exame microbiológico: resultado negativo e positivo e, expressos em valores da média $\pm$ desvio padrão e, em mg/dl - São Paulo – 2004.....	98
Tabela 7 –	Avaliação da influência das mamites no proteinograma do leite colhidas de vacas sadias e com mamite. Resultados expressos em valores da média $\pm$ desvio padrão e, em mg/dl - São Paulo – 2004.....	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Influência racial no proteinograma do leite de vacas sadias, em plena lactação - São Paulo – 2004.....	73
Figura 2 –	Influência do número de lactações no proteinograma do leite de vacas sadias, em plena lactação – São Paulo – 2004.....	80
Figura 3 –	Influência da fase da lactação no proteinograma do leite de vacas sadias - São Paulo – 2004.....	87
Figura 4 –	Influência do número de células somáticas do leite no proteinograma lácteo- São Paulo – 2004.....	93
Figura 5 –	Influência da presença de microrganismos no leite no proteinograma lácteo - São Paulo – 2004.....	99
Figura 6 –	Influência da mamite no proteinograma do leite de vacas - São Paulo – 2004.....	105

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1	Considerações gerais.....	22
2.2	Proteínas do leite e soro lácteo de bovinos.....	25
2.3	A utilização da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida para obtenção do proteinograma do soro lácteo de bovinos.....	34
2.4	Avaliação de fatores de variabilidade no proteinograma do leite.....	36
2.4.1	Avaliação da influência racial das vacas no proteinograma do leite.....	36
2.4.2	Avaliação da influência da idade e do número de lactações no proteinograma do leite de vacas.....	37
2.4.3	Avaliação da influência da fase da lactação e fração do leite no proteinograma do leite de vacas.....	38
2.4.4	Avaliação da influência dos processos inflamatórios da glândula mamária no proteinograma do leite de vacas.....	42
2.4.5	Avaliação da influência da presença de microorganismos no leite no proteinograma lácteo de vacas.....	50
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
3.1	Formação dos grupos experimentais.....	52
3.1.1	Avaliação da influência racial no proteinograma do leite de vacas sadias.....	54
3.1.2	Avaliação da influência do número de lactações no proteinograma do leite de vacas.....	55
3.1.3	Avaliação da influência da fase da lactação no proteinograma do leite de vacas.....	56

3.1.4	Avaliação da influência do número de células somáticas do leite no proteinograma lácteo de vacas.....	57
3.1.5	Avaliação da influência do resultado do exame microbiológico (negativo ou positivo) no proteinograma do leite de vacas.....	58
3.1.6	Avaliação da influência da mamite no proteinograma lácteo de vacas.....	59
3.2	Colheita das amostras.....	60
3.3	Determinações realizadas nas amostras de leite.....	61
3.3.1	Determinação das características físico-químicas do leite de vacas criadas em São Paulo.....	61
3.3.1.1	Determinação da concentração hidrogeniônica –pH das amostras do leite.....	61
3.3.1.2	Determinação dos valores de eletrocondutividade no leite.....	62
3.3.1.3	Determinação dos valores de cloreto no leite.....	62
3.3.1.4	Determinação da concentração de proteína total do leite.....	63
3.3.2	Determinação das características celulares e microbiológicas do leite.....	64
3.3.2.1	Contagem eletrônica do número de células somáticas.....	64
3.3.2.2	Exame microbiológico.....	65
3.3.3	Determinação do proteinograma do soro lácteo de bovinos.....	65
3.3.3.1	Obtenção das amostras de soro lácteo.....	65
3.3.3.2	Determinação da concentração de proteína total do soro lácteo e da fração caseína do leite.....	66
3.3.3.3	Fracionamento das proteínas do soro lácteo por eletroforese em gel de poliacrilamida.....	66
3.4	Análise estatística.....	68
4	RESULTADOS	69
4.1	Considerações gerais.....	69
4.2	Avaliação das proteínas do leite de vacas sadias, em plena	

	lactação.....	69
4.3	Avaliação de fatores de variabilidade do proteinograma do leite.....	71
4.3.1	Avaliação da influência do número de lactações nas proteínas do leite de vacas sadias, em plena lactação.....	71
4.3.2	Avaliação da influência do número de lactações no proteinograma do leite de vacas sadias, em plena lactação.....	77
4.3.3	Avaliação da influência da fase da lactação no proteinograma do leite de vacas sadias.....	84
4.3.4	Avaliação da influência do número de células somáticas no proteinograma do leite de vacas.....	91
4.3.5	Avaliação da influência do isolamento bacteriano no proteinograma do leite de vacas	97
4.3.6	Avaliação da influência das mamites nas proteínas do leite de vacas.....	103
5	DISCUSSÃO	109
5.1	Considerações gerais.....	109
5.2	Avaliação do proteinograma no leite de vacas sadias, em plena lactação.....	110
5.3	Avaliação de fatores que influenciam o proteinograma do leite de vacas.....	116
5.3.1	Avaliação da influência de fatores raciais no proteinograma do leite de vacas.....	116
5.3.2	Avaliação da influência do número de lactações no proteinograma do leite de vacas.....	118
5.3.3	Avaliação da influência da fase da lactação no proteinograma do leite de vacas.....	121
5.3.4	Avaliação da influência do número de células somáticas no proteinograma do leite de vacas.....	127
5.3.5	Avaliação da influência do isolamento bacteriano no proteinograma do leite de vacas.....	133

5.3.6	Avaliação da influência da mamite no proteinograma do leite de vacas.....	135
6	CONCLUSÕES.....	140
	REFERÊNCIAS.....	143
	APÊNDICE.....	150
	ANEXOS.....	156

1INTRODUÇÃO

A mamite dos bovinos foi considerada um dos principais problemas da pecuária leiteira, quer seja pelos problemas de saúde animal, de saúde pública, como também pelos diretos e significativos prejuízos econômicos, que determina ao agro-negócio de várias regiões do mundo. Tal condição foi referida, tanto nos países desenvolvidos, como aqueles em processo atual de desenvolvimento social e econômico. Além disso, a literatura específica destacou o significativo fator negativo para a indústria de laticínios, que a produção de leite antigênico ou a inclusão, no leite produzido pelo rebanho, um pequeno volume da secreção láctea de vacas acometidas por processos inflamatórios incipientes, resultando na produção de produtos lácteos de péssima qualidade para o consumo das populações.

Mamite ou mastite foram os termos conceituados para representar e definir a inflamação da glândula mamária, caracterizada por específicas alterações físicas do úbere ou químicas do leite, tais como: os sinais cardiais do processo inflamatório – tumor, rubor, calor, dor e alteração ou perda da função (diminuição da produção leiteira). A essas manifestações clínicas sempre presentes associam-se alterações do aspecto do leite (grumos), das características físico-químicas do leite (pH, eletrocondutividade, cloretos, lactose...) e modificação da constituição celular do leite, caracterizada principalmente pelo aumento do número de células somáticas, especialmente dos polimorfos nucleares neutrófilos. As mencionadas manifestações sintomáticas representam uma resposta orgânico-funcional ao estímulo do epitélio de revestimento interno da glândula mamária e do tecido intersticial da mama – com alterações da estrutura vascular, geralmente causada

pela irritação determinada por microrganismos patogênicos ou de toxinas por eles produzidas ou geradas no foco da inflamação. A bem da verdade, deve-se destacar que clínicos veterinários afirmam com convicção que a instalação dos processos inflamatórios de origem infecciosos são, geralmente condicionados pela coexistência prévia de fatores etiológicos considerados predisponentes, envolvendo nesse processo etiopatogênico, tanto o meio ambiente (instalações, tipo de criação, bem como normas de manejo alimentar e de ordenha). Afora esses, existem outros fatores etiológicos predisponentes relacionados às condições anatômicas e fisiológicas da glândula mamária e estágios da lactação (TOLLE, 1975; BIRGEL, 1999).

A infecção bacteriana, considerada como fator determinante das mamites, com real significado na produção láctea, causaria alterações tanto nas estruturas anatômicas da glândula mamária, como também na composição do leite (SCHALM et al., 1971). Birgel (1982) sugeriu, baseado nos conceitos que norteiam o exercício da clínica médico-veterinária, que as mamites dos bovinos deveriam ser classificadas de acordo com as manifestações sintomáticas em: mamite catarral; flegmonosa e apostematosa. E, segundo a evolução da enfermidade, em: aguda e crônica. Ressalte-se, por oportuno, que durante a instalação e evolução do processo inflamatório da glândula mamária, além da diminuição da produção de leite, uma série de outros eventos podem ser observados devido ao aumento da permeabilidade do sistema circulatório capilar, quando se verifica significativa passagem da albumina do plasma sangüíneo para o leite; e esta, seria a primeira manifestação patológica descrita, em vacas, nas mamites incipientes (SCHALM, 1977; HONKANEN-BUZALSKI, 1982). Segundo a experiência de Honkanen-Buzalski (1982) a detecção precoce de proteínas do plasma sangüíneo seria um

adequado marcador das alterações da glândula mamária, destacando, ainda, que a determinação do número de células somáticas não seria processo único e suficientemente seguro para perfeito diagnóstico das mamites nas fases pré-clínicas ou assintomáticas. Além do mais, o referido pesquisador destacou, que sendo mamite um processo inflamatório bem caracterizado, e o diagnóstico deveria ser feito utilizando-se métodos semiológicos baseados em alteração da permeabilidade capilar como, por exemplo, pela determinação das concentrações lácteas de proteínas de pequeno peso molecular, não elaboradas na glândula mamária, pois elas somente seriam detectadas no leite em condições anormais. Por isso, sendo significativo o aumento das frações protéicas transudadas do sangue para o leite, a ocorrência constituir-se-ia em sensível indicador, para predizer quais os quartos da glândula mamária estariam inflamados.

A eficiência do diagnóstico das mamites, utilizando testes indiretos, depende da exatidão da metodologia para a diferenciação das amostras de leite proveniente de glândulas mamárias acometidas por processo inflamatório, daquelas obtidas em vacas sadias (MATTILA et al. 1986). Outros pesquisadores realizaram pesquisas, cujos resultados concordaram com a retro-mencionada afirmação; assim Kato et al. (1989) detectaram, em corridas eletroforéticas de amostras de leite em gel de poliacrilamida, alterações em, pelo menos, doze frações do proteinograma lácteo de vacas portadoras de mamites. Por tais razões, Holdaway et al. (1996), analisando os resultados de suas experiências concluíram, que os testes indiretos para diagnóstico das mamites seriam de grande importância, pois os exames microbiológicos além de serem pouco sensíveis foram considerados demorados e dispendiosos, inviabilizando-os, como exames de rotina para monitoração da saúde dos úberes de animais produtores de leite.

A presente pesquisa, apresenta um delineamento experimental que visa contribuir para o perfeito conhecimento da etiopatogenia das mamites dos bovinos, participando no esclarecimento das manifestações patológicas causadoras das características modificações físicas, funcionais e das características constitucionais do leite, permitindo a normatização do diagnóstico clínico dessas enfermidades da glândula mamária. Objetivou-se, para tanto, a padronização e a determinação do proteinograma no soro lácteo do leite de vacas sadias e de animais acometidos por mamites, estabelecendo, assim, os valores padrões de referência da constituição protéica do soro do leite, fundamentais para o diagnóstico das mamites dos bovinos. Além do mais, como objetivo paralelo programou-se a avaliação de possível influência de fatores raciais, número de lactações, fase da lactação, número de células somáticas, isolamento bacteriano e da mamite sobre o proteinograma do soro lácteo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações gerais

As proteínas do leite originam-se dos aminoácidos livres, presentes na corrente circulatória, sendo alguns desses aminoácidos pré-formados no sangue e incorporados ao leite, outros, previamente, passariam por transformações enzimáticas. Larson (1979) afirmou que as proteínas do leite poderiam originar-se de diferentes formas: na maioria, seriam proteínas específicas da lactação e outras que, estariam presentes no leite, em menor quantidade, entre estas incluiriam-se as proteínas do sangue, em partes derivadas de outros tipos de células e de seus produtos. As proteínas presentes no leite e oriundas do sistema circulatório possuiriam propriedades imunológicas ou enzimáticas, entre outras funções. O conjunto dessas proteínas formaria um complexo sistema protéico no leite. As frações albumina plasmática e gamaglobulina e, uma pequena porção da caseína seriam pré-formadas no sangue, para posteriormente, serem incorporadas ao leite. Ao passo que, outras proteínas lácteas, como as frações: caseína; β -lactoglobulina e α -lactoalbumina, seriam exclusivamente sintetizadas na glândula mamária, durante a galactopoiese, por células altamente diferenciadas (SCHALM et al., 1971; LARSON, 1979). Algumas pesquisas visaram caracterizar, individualmente, as proteínas no leite e objetivaram elucidar inúmeros mecanismos da síntese láctea. Todavia, o assunto não foi, ainda, considerado como elucidado, mas pelo menos tornou evidente a necessidade de se considerar a síntese e a liberação das

proteínas do leite, incluídas num contexto único, sendo todos os constituintes considerados componentes de um delicado sistema de inter-relacionamento fisiológico (LARSON, 1979). Além do mais, foi destacado que esse processo, sofreria influências de fatores nutricionais, hormonais, genéticos e fatores relacionados ao manejo (BOBE et al., 1999).

As proteínas do leite poderiam ser divididas, tendo como base as variações genéticas, assim já foi descrito para outras proteínas do organismo. As mencionadas variações teriam formas moleculares múltiplas de uma mesma proteína, mas não haveria possibilidades de suas identificações por separarem-se na mesma zona eletroforética (SCHALM et al., 1971). Alguns pesquisadores recomendaram o uso da técnica de eletroforese para separar e identificar frações protéicas do soro lácteo como: α -lactoalbumina, β -lactoglobulina e albumina, imunoglobulinas de origem plasmática; além de um grupo de proteínas que, apesar de serem passíveis de separação e identificação foram denominadas de proteose-peptonas. Schalm et al. (1971), ainda, acrescentaram em suas observações que estudos imunoeletroforéticos poderiam esclarecer a dinâmica da movimentação das proteínas sangüíneas para o leite, permitindo distinguir, com segurança as proteínas de origem sangüínea, diferenciando-as daquelas elaboradas no úbere, no momento da produção dessa secreção.

Schalm et al. (1971) teriam destacado, na ampla revisão da literatura, que apresentaram no compêndio "Bovine Mastitis" a composição das proteínas do soro lácteo em valores quantitativos: 40 mg/dl de albumina de origem plasmática; 310 mg/dl de β -lactoglobulina; 110 mg/dl de α -lactoalbumina e 80 mg/dl de frações imunoglobulínicas.

A técnica da separação das frações protéicas do soro por eletroforese tem sido utilizada desde a década de 50 do século passado e foi considerada como importante para o estudo das proteínas do soro lácteo, que iniciaram-se pela avaliação das frações protéicas, tanto do leite, como do soro lácteo, utilizando a técnica de eletroforese em papel. Larson e Kendall (1953), aplicando essa técnica caracterizaram a β -lactoglobulina como a principal proteína do soro lácteo e a α -lactoalbumina e albumina de origem plasmática como frações secundárias, constituindo o que chamaram de fração lactoalbumina. Ao mesmo tempo consideraram o complexo das imunoglobulinas como o principal constituinte da fração lactoglobulina; as demais frações protéicas, detectadas no fracionamento eletroforético foram denominadas de proteose-peptonas. Lecce e Legates (1959), utilizando a técnica de eletroforese em papel, observaram aumento dos teores de albumina de origem plasmática em amostras de leite de vacas com mamite aguda.

Hillier (1976) demonstrou, em pesquisa pioneira, utilizando técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida e com padrões de soro lácteo bovino, que a técnica poderia ser recomendada, com adequada precisão para a mensuração das frações protéicas do soro lácteo. Kato et al. (1989), praticamente confirmaram as referidas recomendações ao destacarem a importância da eletroforese em gel de poliacrilamida para o isolamento e identificação das proteínas e enzimas do leite, contribuindo para o esclarecimento da patogenia das mamites.

2.2 Proteínas do leite e soro lácteo de bovinos

Teores de proteína total do leite e do soro lácteo de bovinos - A concentração de proteína total no leite de vacas varia, na dependência da espécie e da raça dos animais, pois, segundo Schalm et al. (1971) a concentração de proteína total no leite de vacas da raça Holandesa, expressa em valores relativos, seria 3,25% e, em animais da raça Jersey igual a 3,65%. Mas para Haenlein et al. (1973) o valor relativo da concentração média de proteína no leite de vacas, sem distinção racial seria 3,61%. Além do mais, esses pesquisadores, afirmaram, ainda, que a concentração dos teores protéicos não apresentaria variações significativas, mesmo durante a instalação e desenvolvimento de infecção na glândula mamária ou em situações caracterizadas por aumento marcante do número de células somáticas.

No Brasil, Ferreira et al., em 1980, avaliando a influência da mastite na concentração de proteína do leite de vacas mestiças criadas no Estado de Minas Gerais obtiveram, em vacas consideradas sadias e outras acometidas por mastite valores semelhantes, respectivamente: 3.195 mg/dl e 3.390 mg/dl de proteína total no leite. Mais recentemente, Estrella (2001) observou que a concentração láctea de proteína total variava na dependência da fase da lactação, concluindo que o valor padrão de referência desse parâmetro correspondia a 3.433 ± 622 mg/dl. Marques (2003) ao estudar amostras de leite de 297 quartos mamários de vacas sadias da raça Girolando, criadas no Estado de São Paulo, determinou teor médio de proteína total no leite igual a 3.276 ± 375 mg/dl.

Larson e Kendall (1953) demonstraram que os valores da concentração de proteína total do soro lácteo, em vacas no segundo terço da lactação, variaram

entre 600 e 1.100 mg/dl. Schalm et al. (1971), baseados em informações experimentais afirmaram, que o leite de vacas apresentava concentração de proteínas, variando em torno de 2,7% de caseínas e, assim sendo, a diferença observada entre esta fração e o teor de proteína total do leite, ou seja, as proteínas do soro lácteo, e corresponderia a associação de outras frações protéicas, a saber: albumina de origem plasmática; β -lactoglobulina; α -lactoalbumina e complexo de imunoglobulinas.

Auld et al. (1995) determinaram em amostras de leite de glândulas mamárias de vacas acometidas por mamite e, apresentando mais de 300.000 células somáticas/ml, menores concentrações de caseína no leite e maiores teores de proteína total no soro lácteo, permanecendo, todavia os valores de proteína total no leite inalterados.

Lactoferrina - A lactoferrina é uma proteína que, ligada ao ferro, relacionar-se-ia às atividades da transferrina, sendo encontrada em inúmeras secreções orgânicas e em grânulos de neutrófilos. A ação da lactoferrina foi atribuída a sua condição de composto de ferro insaturado (KANEKO, 1989). Brown et al. (1996) estimaram que a lactoferrina presente na glândula mamária teria massa equivalente a 78 kDa.

Segundo Schanbacher e Larry Smith (1974) no leite de vacas em lactação plena as principais proteínas lácteas eram α -lactoalbumina e β -lactoglobulina e, o transporte de imunoglobulinas se reduziria nessa fase da lactação. No entanto, na fase de involução da função da glândula mamária, as concentrações lácteas de lactoferrina aumentavam e, no período caracterizado pela formação do colostro a concentração láctea dessa proteína diminuía, significativamente. Os mencionados

pesquisadores consideraram, que o aumento dos teores de lactoferrina na secreção láctea seriam fortes indicativos da ocorrência de involução da glândula mamária. Posteriormente, essas constatações foram confirmadas por Welty et al. (1975) ao observarem que o aumento da concentração de lactoferrina iniciava 2 a 4 dias após supressão da ordenha rotineira, apresentando um aumento linear de 115 mg/dl por dia. A concentração máxima de lactoferrina láctea detectada foi de, aproximadamente, 2.000 mg/dl, obtida 3 a 4 semanas após o início da involução da glândula mamária, preparando-se para a supressão da lactação. Tal aumento teria uma magnitude de até 100 vezes maior do que a concentração de lactoferrina determinada no leite colhido nos períodos de plena lactação. No entanto, Welty et al. (1975) afirmaram existir amplas variações individuais da concentração de lactoferrina nas 15 vacas utilizadas no experimento; demonstraram, ainda, que a concentração de lactoferrina diminuiu sensivelmente antes do parto e início da nova lactação. E, portanto, a lactoferrina seria uma proteína menor no leite normal, mas se tornaria uma das principais proteínas na secreção da glândula mamária em involução.

Harmon et al. (1975) avaliaram a concentração de lactoferrina no soro lácteo de vacas sadias das raças Holandesa, Jersey e mestiças dessas raças, utilizando a técnica de imunodifusão, obtendo o valor médio de 35 mg/dl, demonstrando correlação positiva entre os teores de lactoferrina e o número de células somáticas, bem como com o teor de albumina de origem plasmática durante a lactação e, correlação negativa com a produção diária de leite.

A ação antimicrobiana da lactoferrina foi avaliada “in vitro” por Rainard (1986), concluindo que a lactoferrina inibiu o crescimento de Escherichia coli.

A lactoferrina foi considerada por Furmanski et al. (1989) como a principal substância láctea, com capacidade de se ligar ao ferro no leite, e afirmaram que seria, o principal constituinte dos grânulos de neutrófilos, estando envolvidos em atividade antimicrobiana.

Naidu et al. (1991) destacaram grande capacidade de ligação “in vitro” da lactoferrina bovina às células com Staphylococcus aureus isoladas de leite de vacas com mamite. Porém, demonstraram que a significativa capacidade da lactoferrina bovina ligar-se a células com S. aureus, ocorreria apenas, quando se utilizava o meio de cultura agar sangue, nutritivo ou proteose-peptona.

As pesquisas referentes a ocorrência e ações da lactoferrina evoluíram e, recentemente, Stokes et al. (2002) afirmaram que a ação fisiológica e aumento de estrógeno induziria a atividade da lactoferrina, tanto na glândula mamária como também no útero de mulheres.

Albumina de origem plasmática - A albumina do plasma sangüíneo, com peso molecular de 69 kDa (KANEKO, 1989), e uma das proteínas de origem sangüínea, detectada no leite, ou seja, uma proteína passível de ser transferida do plasma para o leite por transudação, sendo determinadas em maiores concentrações na secreção láctea, no final da lactação (SCHALM et al., 1971). Babajimopoulos e Mikolajcik (1977), utilizando a técnica de eletroimunodifusão, obtiveram valores variando de 16 a 31 mg/dl (valor médio igual a 23,8 mg/dl) de albumina de origem plasmática em amostras de leite colhidas em tanque de resfriamento, de 25 rebanhos leiteiros. Ainda, segundo Honkanen-Buzalski (1982) o aumento do conteúdo dessa fração protéica no leite poderia ser recomendada como sensível

marcador de processos inflamatórios da glândula mamária, face a grande e direta correlação existente entre o teor dessa proteína de origem plasmática no leite e a contagem de células somáticas nessa secreção. No entanto, como afirmou o retromencionado pesquisador, a concentração de albumina de origem plasmática no leite sofre variações significativas conseqüentes às fases da fisiologia da produção leiteira: influências da fase da lactação e do número de lactações das vacas.

Imunoglobulinas - As imunoglobulinas são encontradas no leite, após serem seletivamente transudadas do plasma sangüíneo para o interior da glândula mamária pelas células túbulo-acinares do úbere. As concentrações lácteas dessas frações protéicas foram maiores em amostras de leite de vacas no final da lactação; sendo seus valores exageradamente grandes durante a fase colostrar (SCHALM et al., 1971).

As imunoglobulinas encontradas no leite estariam relacionadas, diretamente com a função protetora da glândula mamária contra agentes patogênicos causadores de mastites. A concentração dessa fração protéica no leite foi considerada como fisiológica ou, então decorrente de infecções ativas de componentes do úbere. A comprovação dessa assertiva mostrou que, seis horas após infusão de toxinas bacterianas na glândula mamária, observava-se, rapidamente, aumento das imunoglobulinas, inicialmente de IgG₁ e depois, mais lentamente, de IgG₂ (SYMONS e WRIGHT, 1974). Caffin e Poutrel (1988), utilizando técnica de imunodifusão radial, obtiveram concentração média de IgG₂ em amostras de soro lácteo de vacas sadias igual a $16,81 \pm 9,43 \mu\text{g/ml}$. Maiores valores foram determinados no início da lactação (até 30 dias) do que no meio da lactação (150

dias de lactação), sendo, ainda maiores as concentrações de IgG₂ no leite na fase final da lactação (270 dias). Tais variações, Caffin e Poutrel (1988) atribuíram ao aumento do número de células somáticas, por terem observado significativa correlação entre esses dois parâmetros lácteos.

Na avaliação da presença da fração imunoglobulina-A no leite, além de se apresentar em pequena concentração, ela permaneceria ligada a glóbulos de gordura do leite, dificultando sua determinação (HONKANEN-BUZALSKI, 1982).

Levieux e Ollier (1999), aplicando a técnica de imunodifusão radial em agar gel em amostras de soro lácteo de cabras recém-paridas, observaram ampla variação nas concentrações de imunoglobulina G, sendo maiores em amostras colhidas nas ordenhas do primeiro dia após o parto, do que nas amostras colhidas 8 dias após o parto. Além do mais, os mencionados pesquisadores observaram, que cabras de primeira cria produziram menor quantidade de imunoglobulinas no colostro do que as cabras que estavam na segunda ou quarta lactação.

α_1 -antitripsina - Na oportuna revisão bibliográfica realizada por Eckersall e Conner (1988) a α_1 -antitripsina nos bovinos era a mesma proteína denominada, anteriormente de inibidora de proteinase e, ocorreria no leite em concentrações maiores do que as detectadas no soro sangüíneo, durante os processos inflamatórios da glândula mamária; confirmou-se, assim o que Conner et al. (1986) observara: maior teor de α_1 -antitripsina no soro sangüíneo de vacas acometidas por mamite, do que os valores determinados no soro sangüíneo de animais sadios.

Os valores das determinações de α_1 -antitripsina no soro lácteo de vacas foram relacionados com a albumina de origem plasmática, aumento do número de

células somáticas e escore do CMT - *California Mastitis Test* no leite e, demonstraram aumentos de magnitude dos valores, de acordo com a severidade e intensidade das mastites, indicando transporte ativo desta proteína para glândula mamária (HONKANEN-BUZALSKI e SANDHOLM, 1981). Honkanen-Buzalski e Sandholm (1981) destacaram, ainda que os inibidores de proteases no leite teriam origem no sangue, e os consideraram agentes de ação reguladora endógena contra a ação de enzimas proteolíticas dos neutrófilos. Esses pesquisadores recomendaram analisar os valores de α_1 -antitripsina determinados por eletroforese em gel de poliacrilamida, cuidadosamente, já que uma banda dessa proteína apresentava tamanho muito semelhante ao da albumina (67.000 Da).

β -lactoglobulina - A β -lactoglobulina foi considerada por Schalm et al. (1971) a proteína sintetizada na glândula mamária, encontrada em maior concentração no soro lácteo. A utilização da eletroforese em papel mostrou que a β -lactoglobulina possuiria de uma a duas frações denominadas de componente A - banda de migração mais rápida e componente B - de movimentação eletroforética mais lenta. Ressalte-se que, anteriormente, haviam sido propostas várias nomenclaturas, para designação dessa fração protéica do leite, mas na evolução de pesquisas específicas chegou-se à conclusão de que as melhores designações seriam A e B, mais apropriada por se tratar de variações genéticas da síntese protéica (BRUNNER et al., 1960).

Em 1977, Babajimopoulos e Mikolajcik, utilizando técnicas imunológicas: imunodifusão simples; imunodifusão radial e eletroimunodifusão quantificaram e compararam as concentrações da fração protéica β -lactoglobulina do leite “in

natura”, proveniente de tanques de resfriamento de 25 rebanhos bovinos. Os resultados obtidos equivaleram-se, pois os valores nas três técnicas utilizadas, não diferiram significativamente. Apesar disto, os mencionados pesquisadores consideraram os valores de concentração de β -lactoglobulina por eletroimunodifusão como determinados por técnica mais rápida e sensível e, variaram entre 300 e 410 mg/dl.

Mais recentemente demonstrou-se que a β -lactoglobulina poderia ser também detectada no soro sangüíneo de vacas gestantes e o resultado poderia ser utilizado como um marcador fisiológico para predizer a futura produção de leite, pois sendo a β -lactoglobulina uma proteína sintetizada pelas células secretoras do tecido epitelial da glândula mamária, ela passaria para o fluido intersticial e seria absorvida pelo sistema circulatório, integrando o plasma sangüíneo (MAO; BREMEL, 1995).

α -lactoalbumina - A α -lactoalbumina foi considerada como a segunda fração protéica mais abundante no soro lácteo (LARSON; KENDALL, 1953; SHALM et al., 1971). Segundo Rolleri et al. (1965), confirmados por Schalm et al. (1972) a concentração de α -lactoalbumina no leite de vacas apresentaria valor aproximado de 110 mg/dl. Porém, maiores valores (178 ± 22 mg/dl) foram encontrados por Randolph et al. (1974), utilizando técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida em amostras, negativas no teste *Wisconsin Mastitis Test*. Em amostras de leite de cabra Levieux e Ollier (1999) determinaram maiores concentrações de α -lactoalbumina, em amostras de leite de cabras colhidas até três dias após o parto, diminuindo lentamente e permanecendo estáveis após o oitavo dia de lactação.

Outras proteínas do soro lácteo - Os danos teciduais ou processos inflamatórios foram considerados capazes de desencadear respostas do organismo a tais excitações orgânicas e, entre as respostas sistêmicas, destacou-se o surgimento na circulação de proteínas de fase aguda. Conner et al. (1986), em pesquisa marcante, compararam as proteínas de fase aguda determinadas no soro sangüíneo de vacas acometidas por mamite e em vacas sadias, com os seguintes resultados, respectivamente, em vacas sadias e nas acometidas por mamite: ceruloplasmina 0,23 e 0,53 unidades; α_1 -antitripsina 269 e 753 UI; haptoglobina – quantidade não detectada pela técnica utilizada e até 114 unidades.

A reação de fase aguda, segundo Eckersall e Conner (1988), incorporaria os fenômenos que se manifestariam nos animais após a ocorrência de lesão tecidual e, particularmente, respostas a processos inflamatórios. Resposta, que poderia ser considerada multifatorial, envolvendo produção e secreção hepática de várias proteínas de fase aguda. Algumas dessas proteínas teriam funções bem estabelecidas, como por exemplo: o fibrinogênio, enquanto de muitas outras não seriam, perfeitamente conhecidas. Além do mais, inúmeras variações quantitativas e qualitativas foram descritas para várias espécies animais. Exemplo significativo foi considerado para a proteína C reativa, importante proteína de fase aguda em humanos e em cães, que estaria também presente no soro sangüíneo de bovinos saudáveis, porém não apresentaria alterações, nesses espécimes durante o desenvolvimento de processos inflamatórios agudos. Porém pesquisadores destacaram que a haptoglobina ao contrário representaria importante proteína de fase aguda detectável no soro sangüíneo de vacas, nas quais foram induzidas experimentalmente mamites, sendo essa fração protéica considerada útil na indicação da severidade da doença em bovinos (HIRVONEN et al., 1996).

A haptoglobina com peso molecular de aproximadamente 100 kDa (KANEKO, 1989), classificada como uma alfa-glicoproteína plasmática teria habilidade de ligar-se a hemoglobina livre na circulação, sendo útil no diagnóstico de doenças hemolíticas (ELSON, 1974; MAKIMURA; SUZUKI, 1982; ECKERSALL; CONNER, 1988).

2.3 A utilização da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida para obtenção do proteinograma do soro lácteo de bovinos

Vários pesquisadores utilizaram e recomendaram a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção de proteínas, mesmo aquelas que ocorreriam em pequenas concentrações no soro sanguíneo (FAGLIARI; SILVA, 2002) ou no leite (HILLER, 1976; KATO et al., 1989; URECH; PUHAN, 1999). Acatou-se implicitamente, a afirmação que Kiddy fizera, em 1964, destacando que a utilização da eletroforese como uma técnica fundamental para o conhecimento das diversas frações protéicas, tanto do sangue como do leite do gado bovino, e assim, permitir-se-ia interpretar as variações de seus valores até então desconhecidas. Além do mais, foi salientado que a utilização da eletroforese em gel de poliacrilamida, no qual, os poros do gel permitiriam uma melhor separação das proteínas, pelo peso molecular, apresentaria resultados mais definidos, sensíveis e específicos do que os obtidos na separação eletroforética em tiras de papel de filtro.

Hiller (1976) utilizando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida obteve uma relação linear para as quatro principais proteínas do soro lácteo, a

saber: albumina de origem plasmática; β -lactoglobulina A; β -lactoglobulina B e α -lactoalbumina. O mencionado pesquisador observou, também, pequena variação nas análises quantitativas dessas proteínas, atribuindo essa variação, provavelmente, ao tempo de colheita das amostras e às pequenas diferenças constitucionais e de produção que poderiam ocorrer entre os géis.

Kato et al. (1989) desenvolveram pesquisa comparando as corridas eletroforéticas em gel de poliacrilamida do leite de vacas sadias e de vacas acometidas por mamite. Eles detectaram que pelo menos 12 proteínas se distinguiram nas corridas eletroforéticas ao compararem a migração de leite normal e a migração obtida nas corridas de leite mamítico. Essas modificações caracterizaram-se por aumento da lactoferrina, albumina plasmática, imunoglobulinas, proteína de 43 kDa, caseína de 31 kDa, e as proteínas com os seguintes pesos moleculares: 23 kDa; 22 kDa; 20 kDa e 16 kDa. Mas, algumas frações protéicas apresentaram diminuição de suas concentrações nas amostras de leite de glândulas acometidas por mamite: caseína (28 kDa); proteína de 19 kDa e α -lactoalbumina. Os pesquisadores, ainda, ressaltaram que, dentre as proteínas que apresentaram aumento de concentração nas amostras de leite mamitoso, destacaram-se: as proteínas com pesos moleculares de 43 kDa e 16 kDa (cujo aumento foi de até 100 vezes); proteínas 20 kDa e 23 kDa. Porém os aumentos da lactoferrina, albumina de origem plasmática, caseína (31 kDa) e compostos protéicos de cadeia pesada de imunoglobulina não foram tão significativos. Os referidos pesquisadores ao destacarem, também, que as proteínas de peso molecular de 43 kDa e 16 kDa eram derivadas dos grânulos dos leucócitos polimorfos nucleares granulocíticos neutrófilos; porém, nas amostras de leite com alterações características dos processos inflamatórios da glândula mamária foram

encontradas, também, proteínas de origem do plasma sangüíneo. Em conclusão, afirmaram que as mudanças no padrão das corridas eletroforéticas foram conseqüentes a um complexo de fatores, incluindo a participação de neutrófilos, proteínas de origem sangüínea, proteínas ligadas às células da glândula mamária, produtos dos neutrófilos e proteases bacterianas, como também devido a mudanças na síntese protéica. Vale destacar que nessa pesquisa, seus autores não puderam identificar as proteínas N-acetil- β -D-glucosaminidase -NAG (140 kDa) e α_1 -antitripsina (100 e 50 kDa).

2.4 Avaliação de fatores de variabilidade no proteinograma do leite

2.4.1 Avaliação da influência racial das vacas no proteinograma do leite

A preocupação da influência racial no proteinograma do leite esteve presente nos primeiros trabalhos de pesquisa para avaliação do proteinograma do leite. Em 1953, Larson e Kendall, estudando o fracionamento do soro lácteo de vacas por eletroforese em papel, observaram que vacas da raça Holandesa, após o parto, possuíam 50 a 55% de β -lactoglobulina, enquanto as amostras provenientes de vacas da raça Jersey, nas mesmas condições, apresentavam para essa fração proporções de 60 a 65%. Nesse mesmo ano, Rolleri et al. avaliaram a influência de fatores raciais na composição protéica do soro lácteo, utilizando técnica de eletroforese em papel e, em animais de cinco raças de origem européia (Ayrshire, Brown Swiss, Guernsey, Holandesa e Jersey) observaram que o leite das vacas Holandesas possuía menor quantidade de β -lactoglobulina e maiores concentrações de imunoglobulina, α -lactoalbumina e caseína, do que a obtida nas outras raças

estudadas; bem como verificaram menor teor de albumina no soro lácteo de vacas das raças Jersey e Ayrshire.

Folch et al. (1999) destacaram que a fração β -lactoglobulina do leite apresentaria sete variações genéticas em bovino, sendo: β -lactoglobulina A e B as mais comuns, e poderiam expressar-se de forma diferente nas várias raças de bovinos.

2.4.2 Avaliação da influência da idade e do número de lactações no proteinograma do leite de vacas

Mattila e Sandholm (1985), utilizando técnica colorimétrica, observaram variações nas concentrações de α_1 -antitripsina no leite, realçando que os valores dessa fração aumentavam de acordo com o número de lactações, tanto em vacas sadias quanto naquelas em que havia sido constatada presença de microrganismos no leite.

A minuciosa análise dos resultados apresentados no trabalho desenvolvido por Holdaway et al. (1996) não deixou claro se a idade das vacas exerceria influência em alguns parâmetros clássicos constituintes do leite de bovinos, como concentração de α_1 -antitripsina já que somente, em um dos três rebanhos estudados demonstraram que vacas mais velhas apresentavam menores teores de α_1 -antitripsina do que animais em mais jovens.

Em cabras de primeira cria, Levieux e Ollier (1999) verificaram que as amostras de leite apresentavam menor concentração média de imunoglobulinas no colostro, do que obtido em cabras que estavam na segunda ou quarta lactação.

Porém ao considerar o valor médio de proteína total no leite de vacas, Estrella (2001) não observou diferença significativa ao comparar a concentração média de proteína total do leite de vacas de primeira cria com o de amostras de leite obtidas de vacas que haviam parido mais de uma vez.

A concentração de proteína total de amostras do leite de vacas da raça Girolando, com diferentes números de lactações foi analisada comparativamente por Marques (2003), observando serem menores os valores obtidos em amostras de leite provenientes de vacas que haviam parido quatro ou mais vezes, em comparação com aqueles de vacas com menor número de lactação.

2.4.3 Avaliação da influência da fase da lactação e fração do leite no proteinograma do leite de vacas

Há muito tempo determinou-se, que logo após o parto, a glândula mamária produzia colostro, possuindo composição diferente do leite secretado quando o animal estivesse numa fase de lactação plena. E, assim sendo vários foram as pesquisas que demonstraram as diferenças nas concentrações das proteínas encontradas no leite, especialmente, ao se avaliar o maior teor da fração de imunoglobulinas do leite detectadas nos dias imediatamente, após o parto (SCHALM et al., 1971; LARSON, 1979; LEVIEUX; OLLIER, 1999).

Larson e Kendall (1953) utilizando a técnica de eletroforese em papel, avaliaram o proteinograma de amostras de soro lácteo de vacas, logo após o parto e alguns dias que sucederam esse evento. Os referidos pesquisadores observaram variações nas curvas das frações do proteinograma, assim: a curva de β -

lactoglobulina se manteve constante, durante alguns dias do período pós parto; a fração α -lactoalbumina atingiu concentração máxima um mês após o parto e, a seguir apresentou pequena diminuição de valor com o avançar do período de lactação; as curvas de imunoglobulinas indicaram presença de maior quantidade no primeiro dia após a parturição, provavelmente devido ao acúmulo dessa fração do proteinograma durante o período seco, e de preparo do úbere para a próxima lactação; as concentrações de imunoglobulinas tenderam a diminuir no decorrer da lactação, para ao final da lactação apresentar aumento relativo – em comparação às outras proteínas e à diminuição da produção láctea; a albumina de origem plasmática, assim como para as imunoglobulinas, apresentou maior concentração no primeiro dia após o parto. Avaliando os resultados determinados, os pesquisadores sugeriram que, tanto a α -lactoalbumina, como a β -lactoglobulina seriam sintetizadas na glândula mamária, enquanto a variabilidade dos resultados verificados na determinação dos teores lácteos de imunoglobulinas e albumina plasmática demonstrou que a presença dessas frações protéicas no leite dependeria de outros fatores não elucidados, de forma definitiva pela pesquisa.

Honkanen-Buzalski (1982) mesmo destacando o efeito significativo do estágio da lactação na concentração de albumina de origem plasmática no leite de vacas, salientaram que os menores valores dessa fração foram detectados nos dois primeiros meses da lactação, com gradual aumento com o evoluir da fase da lactação.

Em 1985, Mattila e Sandholm examinaram amostras de leite de vacas sadias e de vacas em que foram isolados microrganismos, observando que, nos dois grupos, os maiores valores de α_1 -antitripsina foram detectados no primeiro mês da lactação e ao seu final.

Schaar e Funke (1986) observaram que a concentração de α_1 -antitripsina era maior no início da lactação, para a seguir, no evoluir do período da lactação permanecerem inalterados, ou, apenas com variações insignificantes.

Östensson (1993) ao examinar amostras de leite de vacas sadias, em vários estágios da lactação - desde dois dias pós o parto (coloostro) até o período final, constatou maior concentração de α_1 -antitripsina e de albumina de origem plasmática em amostras colhidas logo após o parto em comparação àquelas colhidas no final da lactação, explicando essas ocorrências pelo aumento da permeabilidade capilar do sistema circulatório do úbere nos períodos que antecedem ou sucedem, imediatamente, a parturição, resultando, conseqüentemente, no aumento de componentes sangüíneos transudados para o leite. Nos estágios intermediários da lactação, o referido pesquisador não observou variações que pudessem ser atribuídas à fase de lactação sobre os parâmetros lácteos avaliados e que, tanto a albumina, quanto a antitripsina apresentaram os maiores valores no final da lactação.

Em dois rebanhos leiteiros criados na Austrália, Auldist et al. (1995) pesquisaram as variações da constituição láctea no decorrer da lactação de vacas. Um dos rebanhos era constituído por animais da raça Friesian (holandesa) e outro de vacas Friesian e Jersey, bem como de mestiças dessas duas raças. Os resultados obtidos, assim puderam ser descritos: a concentração de proteína total do leite apresentou maiores valores no início e no final da lactação, seguindo o mesmo padrão de variação nos dois rebanhos; os teores de caseína e de proteína total do soro lácteo variaram de forma antagônica, pois a caseína apresentou valores maiores no início e no final da lactação, o teor da proteína total do soro lácteo não apresentou variações significativas, que pudessem ser atribuídas à

influência do estágio de lactação em um dos rebanhos, apesar disso no segundo rebanho, as concentrações de caseína e de proteína total no leite foram maiores no início e no terço final da lactação. Os resultados dessa pesquisa, por serem semelhantes, foram confirmados por Holdaway et al. (1996) que demonstraram aumento da concentração de α_1 -antitripsina nos estágios finais da lactação em um dos rebanhos avaliados.

Levieux e Ollier (1999) utilizando técnica de imunodifusão para avaliar o proteinograma do leite de vacas, demonstraram maiores concentrações de albumina de origem plasmática, imunoglobulina, β -lactoglobulina e α -lactoalbumina no colostro com tendência de diminuição desses valores ao compararem com aqueles obtidos nas colheitas realizadas no 30º dia da lactação. Resultados obtidos por Estrella (2001), confirmaram as afirmações anteriores no que tange aos valores médios de proteína total do leite, em diferentes fases da lactação, pois as concentrações de proteína total do leite eram maiores nos primeiros estágios da lactação, observando-se decréscimo em fase intermediária de lactação (período contido entre o 60º e 120º dia) e final da lactação, ou seja, após 210º. dia de lactação, quando os referidos valores tenderam a novo aumento. Essas observações foram confirmadas por MARQUES (2003), que ao dividir a lactação em três fases (terço inicial – até 100 dias; terço médio – de 100 a 200 dias e; terço final – mais de 200 dias de lactação) detectou diferença estatisticamente significativa, sendo a concentração láctea de proteína total do leite maior nas amostras de vacas, no terço final da lactação.

Ao comparar o teor protéico de amostras de leite colhidas durante a ordenha, e de amostras representando o leite residual pós-ordenha não se demonstrou diferenças significativas nos teores de antitripsina e albumina de origem

plasmática, apesar dessas amostras apresentarem diferenças significativas, tanto para o número total de células somáticas como no número diferencial de leucócitos, expressos em valores relativos (ÖSTENSSON, 1993).

Ao estimarem as concentrações de α_1 -antitripsina em amostras de leite colhidas em várias fases da ordenha, Holdaway et al. (1996) não puderam demonstrar a existência de diferenças significativas entre concentrações lácteas dessa fração protéica, em amostras colhidas no início e no meio da ordenha, diferentemente dos resultados obtidos para o número de células somáticas, atividade de N-acetil- β -D-glucosaminidase e pH que variaram em diferentes fases da ordenha. Além do mais, esses autores afirmaram que as variações eram evidentes em amostras de leite provenientes de quartos infectados.

2.4.4 Avaliação da influência dos processos inflamatórios da glândula mamária no proteinograma do leite de vacas

Os processos inflamatórios da glândula mamária, reconhecidamente apresentam potencial patogênico para alterar a constituição do leite. E, apesar da concentração de proteína total no leite não se alterar de forma significativa nas mamites, as concentrações das várias frações protéicas do soro lácteo variariam consideravelmente (SCHALM et al., 1971; FERREIRO et al. 1980; KITCHEN, 1981; ROGERS et al., 1989; AULDIST et al., 1995). A mencionada variação poderia ser caracterizada, de uma forma simplista, e sumariada, como diminuição das concentrações das proteínas sintetizadas no parênquima da glândula e aumento das proteínas que teriam sua origem no sangue. Na literatura consultada foram encontradas várias pesquisas que demonstraram as alterações do conteúdo

protéico do leite ou soro lácteo, relacionadas aos processos inflamatórios na glândula mamária. Alguns pesquisadores dedicaram-se a desenvolver delineamento de experimentos baseando-se, ao mesmo tempo em alterações protéicas no leite de vacas e a contagens celulares no leite, particularmente em amostras com grande número de células somáticas. Após o estágio colostrar da lactação, o leite, em condições de saúde e boas condições de manejo, se caracterizaria como um líquido mais denso do que a água, de aspecto uniforme e com constituição compatível com as características genéticas e raciais dos animais produtores, podendo entretanto observarem-se variações fisiológicas que ocorreriam normalmente durante a lactação. Os processos inflamatórios da glândula mamária causados por inúmeros fatores etiológicos predisponentes ou determinantes e apresentando diversa patogenia, poderiam induzir e condicionar diferentes respostas da glândula mamária. As variações detectáveis flutuariam desde pequenas alterações na composição do leite até mesmo a ocorrência de secreção anormal com massas ou grumos e até mesmo perdendo a característica de leite. Grandes modificações do leite seriam diretamente proporcionais à severidade e extensão da inflamação (SCHALM et al., 1971; KITCHEN, 1981; ANDERSON; ANDREWS, 1977). Ainda caberia ressaltar que no caso do proteinograma lácteo os resultados (qualitativo e quantitativo) do teor das frações protéicas do soro lácteo poderiam variar na dependência do método utilizado para fracionamento protéico e quantificação das frações.

A mamite foi considerada como agente causador de diminuição da produção da caseína que, todavia seria, parcialmente, compensada pelo aumento dos teores de imunoglobulinas e albumina de origem plasmática no leite. Como resultante desse fato o processo de coagulação da caseína pela renina seria muito

afetado no leite mamitoso e, para sua ocorrência haveria a necessidade de um longo período de incubação (SHALM et al., 1971; HONKANEN-BUZALSKI, 1982). Ainda, segundo Schalm (1977), a primeira manifestação da alteração de constituição do leite de vacas com mamite seria a passagem de albumina do plasma sangüíneo para o leite, como resultado direto do aumento da permeabilidade capilar, sendo coincidente com o início do edema da glândula.

Na década de 70, do século passado, iniciaram-se as pesquisas utilizando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida para o fracionamento das proteínas lácteas e o efeito da mamite sobre o proteinograma lácteo. Porém, vale ressaltar que alguns pesquisadores utilizaram a avaliação direta ou indireta da celularidade do leite, como único parâmetro para classificação das amostras provenientes de quartos com ou sem mamite, quer fossem de ocorrência natural ou induzida por infusão de bactérias ou seus produtos na glândula. Todavia outros pesquisadores melhores conhecedores da patogenia das mamites utilizaram parâmetros físico-químicos e/ou microbiológicos para auxiliar no diagnóstico dos processos inflamatórios da glândula mamária. Dentro deste contexto de diversidade na metodologia aplicada nos estudos experimentais de patologia da glândula mamária, destacou-se a pesquisa realizada por Haenlein et al. (1973) que observaram que exceto a proteína total do leite, que não se alterava com o aumento de leucócitos no leite, as demais frações protéicas apresentavam variações - diminuição da concentração, a saber: caseína; β -lactoglobulina e α -lactoalbumina; com aumento das concentrações lácteas de albumina e imunoglobulinas de origem plasmática. Essas variações foram observadas em amostras de leite que tinham número de células somáticas maiores que 1.000.000 células somáticas/ml e pH tendendo a neutralidade ($\text{pH} \geq 6.8$). Na mesma linha de pesquisa, Randolph et al.

(1974) avaliaram o soro lácteo de dois grupos de vacas: um formado por amostras de leite com resultado positivo no *Wisconsin Mastitis Test* (resultado > 20mm) e, outro, negativo para essa prova (resultado < 10mm). Em suas avaliações, esses pesquisadores demonstraram que maiores concentrações das frações de imunoglobulinas, albumina de origem plasmática e proteose-peptona foram obtidas nas amostras de soro lácteo positivas para o teste de *Wisconsin*. Algumas bandas de proteínas com pequeno peso molecular ocorreram no perfil eletroforético de algumas das amostras de soro lácteo utilizadas, porém sem que fossem identificadas. A quantificação individual das várias frações de proteínas do soro lácteo demonstrou aumento de 68% no teor de albumina nas amostras positivas e, aumento de três e cinco vezes, respectivamente, das frações imunoglobulinas e proteose-peptona. Em contraposição a concentração de β -lactoglobulina diminuiu sua magnitude em cerca de 25%, na maioria das amostras de soro lácteo de vacas com teste *Wisconsin* positivo. Contudo não observaram diferenças significativas entre os resultados de α -lactoalbumina em amostras de leite positivas e negativas ao já mencionado teste. Os pesquisadores esclareceram, ainda, que alguns resultados tiveram grande amplitude de variação em relação à média determinada.

Harmon et al. (1975) analisaram amostras de soro lácteo colhidas de vacas durante a evolução dos processos de mastites e observaram que as concentrações de lactoferrina aumentaram, significativamente, no 3º e 5º dias de evolução do processo inflamatório, usando como parâmetro de comparação o grupo controle e os dias 1º, 10º e 15º dias pós infecção. O valor de lactoferrina foi igual a 66 mg/dl no primeiro dia pós-infecção, atingindo um pico de 189 mg/dl no 3º dia, para posteriormente retornarem a valores semelhantes aos do início do processo (51 mg/dl). Paralelamente, evidenciou-se a diminuição da severidade dos sintomas

da enfermidade. Os mesmos pesquisadores observaram, pelo fracionamento das proteínas do leite por eletroforese de gel de poliacrilamida, que a banda correspondente a α -lactoalbumina era a que se corava com menor intensidade nas amostras colhidas no período inicial da mamite (um dia de infecção), demonstrando a diminuição da síntese láctea dessa proteína, sendo a concentração de albumina de origem plasmática maior no primeiro dia de infecção, do que o observado pelo grupo controle; tanto que os pesquisadores citados atribuíram com probabilidade de ser a razão do ocorrido a passagem de proteínas do sangue para glândula mamária em consequência às alterações da permeabilidade vascular na região do processo inflamatório.

Em 1977, Anderson e Andrews estudaram, seqüencialmente, as variações das concentrações de proteínas do soro lácteo de amostras de leite colhidas de quartos mamários após inoculação intramamária de *Streptococcus agalactiae* ou endotoxina bacteriana em glândulas mamárias de vacas sadias; para tanto utilizaram o fracionamento eletroforético das proteínas do soro lácteo em gel de poliacrilamida e imunodifusão radial. Os pesquisadores obtiveram o mesmo padrão de aumento na concentração de IgG1, IgG2 e de albumina de origem plasmática: nas vacas que receberam infusão de endotoxina, a concentração de albumina no soro lácteo aumentou rapidamente, atingindo seu valor máximo às 16 horas após a infusão, momento em que passou a ser a principal fração protéica do soro lácteo (39%); após quatro dias o valor da albumina de origem plasmática gradativamente retornou a magnitude dos valores encontrados anteriormente. Entretanto, a concentração de imunoglobulinas aumentou atingindo seu valor máximo um dia após a infusão. As concentrações de α -lactoalbumina e β -lactoglobulina do soro lácteo diminuíram nas primeiras 24 horas após a infusão da endotoxina, retornando

aos valores iniciais no quarto dia após o início do experimento. Destaque-se que Anderson e Andrews (1977) obtiveram respostas semelhantes após a inoculação intra-mamária da bactéria *Streptococcus agalactiae*, porém as alterações demoraram um pouco mais para serem observadas e foram de menor severidade.

As alterações na composição do leite foram, também, estudadas de forma seqüencial, por Guildry et al. (1983), após a indução de processo inflamatório na glândula mamária por infusão de endotoxina de *Escherichia coli*. Esses pesquisadores avaliaram, entre outros parâmetros: a concentração de albumina e imunoglobulina G1, utilizando para tanto a técnica de imunodifusão radial simples. E, obtiveram os seguintes resultados: para as frações albumina e imunoglobulina de origem plasmática, antes e 2 horas após infusão da toxina bacteriana, respectivamente: 38 e 449 mg/dl e 34 e 79 mg/dl. Ressaltaram, ainda, que esses valores aumentaram após quatro horas da indução do processo inflamatório para 937 mg/dl de albumina e 135 mg/dl de IgG1. Nessa pesquisa ficou patente que as concentrações de IgG1, IgG2 e albumina de origem plasmática, no leite dos quartos infundidos atingiram os valores máximos 6 a 12 horas antes que houvesse aumento de número de leucócitos e consideraram como gênese dessa modificação da constituição bioquímica do leite a transferência passiva de componentes do sangue para glândula mamária.

Sheldrake et al. (1983) compararam a utilização de três técnicas auxiliares no diagnóstico da ocorrência de mamites em três rebanhos leiteiros, nas vacas com mamite mas sem manifestações clínicas evidentes, comparando, para tanto: a contagem de células somáticas; a determinação da eletrocondutividade e avaliação da concentração de albumina de origem plasmática no leite. A análise dos resultados permitiu aos pesquisadores afirmarem que, o estabelecimento da

celularidade do leite, aparentemente, foi o melhor indicador de predição da ocorrência de vacas acometidas por mamite num rebanho, durante os períodos, em que a infecção na glândula mamária, ainda, não causou dano epitelial de magnitude suficiente para influenciar a dosagem de albumina origem plasmática no leite.

Na avaliação das alterações do conteúdo lácteo das proteínas durante o desenvolvimento de processos inflamatórios da glândula mamária, destacou-se a pesquisa desenvolvida por Schaar e Funke, em 1986, ao avaliarem o efeito da mamite nas concentrações de: plasmina; plasminogênio e α_1 -antitripsina do leite, sendo a fração protéica α_1 -antitripsina do leite determinada por técnica colorimétrica. O material dessa pesquisa contou com amostras de leite, nas quais houve isolamento de bactérias com possível ação patogênica à glândula mamária, cujas contagens de células somáticas eram menores do que a 300.000 células somáticas/ml. Os resultados evidenciaram aumento de 129% na concentração de antitripsina nas amostras de leite dos quartos de glândula com mamite, em comparação aos resultados da secreção láctea da glândulas sadias. A seguir, em 1989, Rogers et al. correlacionaram os teores lácteos de albumina de origem plasmática com outros elementos constituintes do leite, utilizando, para tanto amostras de leite de vacas separadas em dois grupos: um de amostras de leite com menos que 250.000 células somáticas/ml e negativas ao exame microbiológico; outro grupo por amostras de leite com mais de 250.000 células somáticas/ml e isolamento de patógenos. Os resultados demonstraram correlação positiva entre o log CCS (logaritmo da contagem de células somáticas) e os teores de albumina de origem plasmática e imunoglobulina G; entretanto, a correlação foi negativa com as frações - caseína total, α -lactoalbumina e β -lactoglobulina.

Em 1987, Verdi et al., realizando o fracionamento eletroforético das proteínas lácteas em gel de poliacrilamida no leite, não detectaram diferenças significativas entre os resultados dos teores de proteína total do leite, albumina de origem plasmática, β -lactoglobulina e α -lactoalbumina obtidos em amostras de leite com pequeno número de células somáticas ou com grande número dessas células. Além do mais, os pesquisadores em suas considerações atribuíram a diferença desses resultados, com os referidos na literatura à pequena diferença entre os valores do número de células somáticas nos dois grupos experimentais: o grupo com pequeno número de células somáticas – amostras com até 170.000 e; grupo com grande número de células somáticas – amostras com 670.000 células.

Auldist et al. (1995) observaram que amostras de leite de vacas com mamite, apresentando mais de 300.000 células somáticas/ml apresentavam menores concentrações de caseína, e maiores de proteína total do leite e do soro lácteo.

Maunsell et al. (1998) observaram que glândulas mamárias, nas quais o processo inflamatório (mamite) persistiram durante o período seco, houve, na lactação que se instalava em seguida, modificações qualitativas e quantitativas, consideradas negativas para a produção de colostro, porém, não alteravam, de forma significativa a concentração de imunoglobulinas nas amostras do colostro, demonstrando que a infecção durante o período seco não seria um fator importante para a falha de transferência de imunidade passiva aos bezerros.

Urech e Puhan (1999) avaliaram as variações da concentração de constituintes do leite durante a ordenha e entre ordenhas, relacionando os resultados à saúde da glândula mamária. Os resultados obtidos permitiram aos pesquisadores afirmarem, que a concentração láctea de proteína total em todas as

frações do leite durante a ordenha aumentou nos quartos que apresentavam número de células somáticas entre 200.000 e 500.000 células somáticas/ml. Em suas conclusões os pesquisadores atribuíram esse aumento ao aumento do teor das proteínas associadas à resposta inflamatória da mama (lactoferrina, imunoglobulina e albumina de origem plasmática), compensatória da diminuição da caseína.

2.4.5 Avaliação da influência da presença de microorganismos no leite no proteinograma lácteo de vacas

Os efeitos deletérios nos tecidos da glândula mamária durante o desenvolvimento do processo inflamatório da mamite, segundo Schalm (1977), poderiam variar de acordo com a atuação do patógeno, mas causaria: severas manifestações clínicas da inflamação no parênquima ou do tecido epitelial de revestimento dos ductos e cisternas da glândula; formação de micro-abscessos; necroses; processo fistuloso ou ainda mamites apostematosas e gangrenosas agudas. Pois Harmon et al. (1975) ao avaliarem a concentração de lactoferrina durante o processo de mamite em vacas, já haviam afirmado, que em casos severos de mamite determinadas por coliformes, os valores médios da concentração de lactoferrina (274 ± 141 mg/dl) foram significativamente maiores do que os obtidos em amostras de leite de vacas com mamites determinadas por microrganismos gram-positivos (106 mg/dl), causadores de mamites catarrais.

Em 1986, Mattila et al. examinaram 32 quartos de glândula mamária de vacas, entre os quais, cinco estariam infectados pelas bactérias Staphilococcus aureus, Streptococcus uberis e Streptococcus dysgalactiae, determinando o proteinograma lácteo das amostras colhidas nesses animais: concentrações de

albumina de origem plasmática; antitripsina; N-acetil- β -D-glucosaminidase; número de células somáticas e exames microbiológicos. A análise dos resultados permitiu comparar os resultados dos quartos infectados com aqueles dos quartos sadios dos mesmos animais, concluindo que a N-acetil- β -D-glucosaminidase e α_1 -antitripsina seriam melhores indicadores para detecção de glândulas mamárias infectadas do que as alterações dos teores de albumina de origem plasmática e a contagem de células somáticas no leite.

Holdaway et al. (1996) avaliaram a influência da contaminação bacteriana da glândula mamária sobre parâmetros físico-químicos do leite de vacas provenientes de três rebanhos, criados na Nova Zelândia, destacando os efeitos significativos da infecção bacteriana no número de células somáticas do leite, eletrocondutividade, atividade de N-acetil- β -D-glucosaminidase e concentração de α_1 -antitripsina.

Ao examinar amostras de leite de vacas clinicamente sadias, nas quais não houve isolamento bacteriano e, comparando esses resultados com os obtidos em amostras com isolamento bacteriano, Estrella (2001) afirmou não existir diferença estatisticamente significativa entre os valores de proteína total do leite. Mas, o valor da proteína total do leite foi maior (3.613 mg/dl) nas amostras de leite de vacas com mamite do que nas vacas sadias, sem sinais clínicos da enfermidade, independente do isolamento bacteriano. De forma semelhante, Marques (2003) não observou diferença estatisticamente significativa entre os teores de proteína total do leite em amostras de leite de vacas da raça Girolando, sadias e sem sinais clínicos de mamite, porém algumas com e sem isolamento bacteriano; os resultados obtidos foram 3.276 e 3.297 mg/dl, respectivamente.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Formação dos grupos experimentais

De uma população de 37 vacas leiteiras, criadas no Estado de São Paulo foram colhidas 139 amostras de leite, distribuídas em diferentes grupos experimentais, estabelecidos no delineamento da pesquisa proposta nesta tese. Mas, para inclusão nos grupos formados, inicialmente, os animais eram submetidos a exame clínico, dando-se, especial atenção, ao exame físico da glândula mamária, procurando evidenciar possíveis sinais de inflamação nos casos de mamite aguda ou alterações de consistência da glândula e/ou presença de abscessos nos casos crônicos, observando-se, também, possíveis alterações das características macroscópicas do leite e de sua qualidade físico-química. Ressalte-se, ainda que o leite produzido nos criatórios dessas vacas era considerado higienicamente produzido e distribuído pela indústria de laticínios para consumo, após pasteurização.

Para realização desta pesquisa, inicialmente, as 139 amostras de leite de vacas utilizadas foram distribuídas em dois grupos experimentais fundamentais, cuja caracterização foi descrita a seguir.

Grupo I – O primeiro grupo experimental foi constituído por 113 amostras de leite provenientes de vacas clinicamente sadias e, cujos antecedentes demonstravam que, recentemente, não foram acometidas por mamite ou submetidas a tratamento dessa enfermidade.

Grupo II - O segundo grupo experimental foi formado por 26 amostras de leite de vacas acometidas por mamites, em uma de suas formas clínicas catarrais.

Para o diagnóstico das mamites e, por consequência, qualificação das amostras de leite dos quartos mamários de vacas, para serem incluídas no primeiro ou segundo grupo experimental (amostras de leite de vacas sadias e com mamite), foram utilizadas as técnicas de diagnóstico de uso rotineiro, como recomendou BIRGEL (1982), a saber: determinação do pH; dosagem de cloretos; estabelecimento do valor da eletrocondutividade; e avaliação do número de células somáticas.

As amostras de leite dos dois grupos experimentais foram submetidas a exames microbiológicos, para isolamento e identificação dos grupos de germes patogênicos possíveis de determinarem mamites, segundo técnica preconizada por Lennete et al. (1995). Por essa avaliação microbiológica as amostras foram definidas como positivas ou negativas, ou seja, respectivamente, amostras com ou sem isolamento de agentes microbianos, possíveis de serem considerados agentes etiológicos determinantes de mamites e foram caracterizados como positivos ou negativos.

As vacas consideradas acometidas por uma das formas clínicas de mamite apresentavam pelo menos, bem evidenciáveis, três das seguintes alterações no exame preliminar: sinais de inflamação aguda na glândula mamária (tumor, calor, rubor, dor e diminuição da produção leiteira); presença de grumos no leite; pH maior que 6,8; eletrocondutividade maior que 6,6 mS; determinação de cloretos maior do que 154,31 mg/dl e; mais de 700.000 células somáticas por mililitro de leite, conforme recomendações de Estrella (2001), além do mais deveriam ser positivas no exame microbiológico.

3.1.1 Avaliação da influência racial no proteinograma do leite de vacas sadias

A possibilidade da influência racial sobre o proteinograma do leite foi avaliada na presente pesquisa. Para tanto, foram utilizadas 97 amostras de leite de vacas das raças Jersey e Gir, formando dois subgrupos, respectivamente V-J e V-G. As amostras de leite que participaram dos grupos experimentais formados eram provenientes de animais em plena lactação e considerados sadios, pertencentes e definidas no Grupo I, excluindo-se as vacas recém paridas e, portanto, em fase colostrál. O Quadro 1 mostra o número de amostras incluídas em cada um dos dois subgrupos experimentais destinados à esta avaliação.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	RAÇA	NÚMERO DE AMOSTRAS
V-J	Jersey	65
V-G	Gir	32
Total		97

Quadro 1 – Constituição dos grupos experimentais para avaliar a possível influência racial no proteinograma do leite de vacas sadias, criadas em São Paulo - São Paulo - 2004

3.1.2 Avaliação da influência do número de lactações no proteinograma do leite de vacas

O estudo da possível influência do número de lactações no proteinograma do leite utilizou 97 amostras de leite de vacas sadias, em plena lactação. O delineamento proposto permitiu avaliar o leite de vacas na primeira lactação e de animais com mais lactações. Para tanto, constituíram-se três grupos, assim formados: L-1 - com 35 amostras de leite de vacas de primeira cria; L-2 – com 30 amostras de leite de vacas na 2ª ou 3ª lactação e; L-3 - com 32 amostras de leite de vacas que estavam na 4ª ou mais lactações. Os grupos constituídos para avaliação da possível influência de número de lactações sobre o proteinograma do leite de bovinos foram disponibilizado no Quadro 2.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	NÚMERO DE LACTAÇÕES	NÚMERO DE AMOSTRAS
L-1	Uma lactação (primeira lactação)	35
L-2	Duas ou três lactações	30
L-3	Quatro ou mais lactações	32
Total		97

Quadro 2 - Constituição dos grupos experimentais para avaliação de possível influência do número de lactações no proteinograma do leite de vacas sadias, criadas em São Paulo - São Paulo - 2004

3.1.3 Avaliação da influência da fase da lactação no proteinograma do leite de vacas

Para avaliação da influência da fase da lactação no proteinograma do leite foram utilizadas as 113 amostras referidas como pertencentes ao Grupo I, ou seja, aquelas colhidas em vacas sadias. Para obtenção de maior número de informações, as amostras foram distribuídas em quatro subgrupos conforme a fase da lactação em que as vacas se encontravam, e ficaram assim constituídos: G I -1 - amostras de leite de vacas recém paridas, no máximo 10 dias pós parto, caracterizando a fase colostrar; G I – 2 - amostras de leite colhidas de vacas que estavam entre o 11º e 100º dia de lactação, caracterizando o terço inicial da lactação; G I – 3 - amostras colhidas entre o 101º e 270º dias de lactação, considerado o terço médio da lactação e; G I – 4 - amostras colhidas de vacas que se encontravam na fase final da lactação, ou seja, com mais de 270 dias de lactação. A característica deste grupo experimental foi delineada no Quadro 3.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	FASE DA LACTAÇÃO	NÚMERO DE AMOSTRAS
G I – 1	Fase colostrar (1º ao 10º dia)	16
G I – 2	Terço inicial da lactação (11º ao 100º dia)	44
G I – 3	Terço médio da lactação (101º ao 270º dia)	38
G I - 4	Terço final da lactação (mais de 270 dias de lactação)	15
Total		113

Quadro 3 – Constituição dos grupos experimentais formados para a avaliação de possível influência da fase da lactação no proteinograma do leite de vacas sadias, criadas em São Paulo - São Paulo - 2004

3.1.4 Avaliação da influência do número de células somáticas do leite no proteinograma lácteo de vacas

A possível influência do número de células somáticas (contagem de células somáticas - CCS) sobre o proteinograma do leite foi avaliada utilizando-se 139 amostras de leite de vacas. Os subgrupos experimentais foram constituídos de acordo com a contagem dessas células nas amostras, a saber: CCS - 1 – amostras de leite com até 100.000 células somáticas/ml; CCS - 2 – amostras de leite com CCS entre 100.000 e 500.000 células somáticas/ml; CCS - 3 – amostras com 500 a 1.500.000 células somáticas/ml e; CCS - 4 – constituído por amostras de leite que possuíam mais de 1.500.000 células somáticas/ml. O número total e parcial de observações pode melhor ser observado no Quadro 4.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	NÚMERO DE CÉLULAS SOMÁTICAS/ML	NÚMERO DE AMOSTRAS
CCS – 1	Menos de 100.000	64
CCS – 2	Entre 100.000 e 500.000	40
CCS – 3	Entre 500.000 e 1.500.000	16
CCS – 4	Mais de 1.500.000	19
Total		139

CCS = contagem de células somáticas.

Quadro 4 – Constituição dos grupos experimentais para avaliação da influência do número de células somáticas do leite no proteinograma lácteo de vacas criadas em São Paulo - São Paulo - 2004

3.1.5 Avaliação da influência do resultado do exame microbiológico (negativo ou positivo) no proteinograma do leite de vacas

Para avaliação de possível influência do resultado do exame microbiológico sobre o quadro protéico do leite foram analisadas 139 amostras de leite, que foram distribuídas em dois grupos, um constituído por amostras que tiveram resultado negativo ao exame microbiológico e, outro com aquelas cujos resultados foram positivos. O Quadro 5 mostra mais claramente a distribuição das amostras utilizadas em cada subgrupo experimental.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	RESULTADO DO EXAME MICROBIOLÓGICO	NÚMERO DE AMOSTRAS
1	negativo	77
2	positivo	62
Total		139

Quadro 5 – Constituição dos grupos experimentais para avaliação da influência do resultado do exame microbiológico das amostras de leite no proteinograma lácteo de vacas, criadas em São Paulo - São Paulo - 2004

3.1.6 Avaliação da influência da mamite no proteinograma lácteo de vacas

Finalmente, formaram-se dois grupos experimentais para avaliar comparativamente o proteinograma do leite em amostras consideradas provenientes de animais sadios, formando um grupo sadio, com amostras de leite colhidas de vacas assintomáticas – física e pelas características do leite e outro grupo com mamite, onde as manifestações características do processo inflamatório eram evidentes como detalhado anteriormente. No Quadro 6 apresentou-se a descrição dos dois grupos experimentais formados.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	OCORRÊNCIA OU NÃO DE MAMITE	NÚMERO DE AMOSTRAS
1	sadio	113
2	mamite	26
Total		139

Quadro 6 – Constituição dos grupos experimentais para avaliação da influência da mamite no proteinograma do leite de vacas, criadas em São Paulo - São Paulo - 2004

3.2 Colheita das amostras

As amostras utilizadas para a determinação do proteinograma do leite de vacas, foram colhidas em quatro propriedades produtoras de leite, localizadas no Estado de São Paulo.

Após desprezar os primeiros jatos de leite, procedeu-se a inspeção do leite, conforme orientações de Birgel (1982) e então era feita a imersão dos tetos em solução anti-séptica a base de iodophor a 0,6%, seguido da secagem dos mesmos utilizando-se papel toalha individual.

As amostras de leite foram colhidas, em seguida, de forma asséptica, fazendo-se a limpeza do orifício do teto com chumaço de algodão embebido em álcool 70%. As amostras destinadas ao exame microbiológico foram colhidas em frascos estéreis, e outra amostra de 30 ml foi colhida em frasco plástico, descontaminado de íons, destinado aos exames físico-químicos. As amostras eram acondicionadas em caixas de isopor mantidas refrigeradas durante o transporte aos laboratórios do Centro de Pesquisa e Diagnóstico de Enfermidades de Ruminantes - CPDER do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sendo os exames concluídos antes de decorridas 24 horas de conservação.

Após a colheita dessas amostras, em frascos plásticos contendo duas pastilhas de conservante bronopol (2-bromo 2-nitro propano – 1,3 –diol), colhia-se cerca de 40 ml de leite, destinado à contagem das células somáticas e determinação da concentração de proteína total. Essas amostras eram encaminhadas ao Laboratório de Análises de Leite do Programa de Análises de Rebanho do Paraná,

da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa e da Universidade Federal do Paraná, aonde, num prazo máximo de sete dias após a colheita do leite eram processadas.

3.3 Determinações realizadas nas amostras de leite

3.3.1 Determinação das características físico-químicas do leite de vacas criadas em São Paulo

As características físicas e químicas do leite, previamente, avaliadas na presente pesquisa foram as seguintes: concentração hidrogeniônica – pH; eletrocondutividade; cloreto e; proteína.

3.3.1.1 Determinação da concentração hidrogeniônica –pH das amostras do leite

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

3.3.1.2 Determinação dos valores de eletrocondutividade no leite

A determinação dos valores de eletrocondutividade foi efetuada na sala de ordenha das propriedades, ao final da colheita do material, utilizado-se o **aparelho Milku Mastitron**, que media a capacidade dos íons livres de 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., e a 25°C. O valor obtido no equipamento era, então, ajustado para 12,9 mS/cm.

As amostras de leite de cada quarto mamário eram depositadas diretamente no receptáculo do equipamento, em quantidade suficiente (aproximadamente 10 ml) para cobrir os eletrodos existentes no receptáculo, permitindo que ocorresse a passagem de corrente elétrica, que, automaticamente, era registrada, em um visor digital. O resultado expresso em mS/cm (miliSiemens por cm).

3.3.1.3 Determinação dos valores de cloreto no leite

A determinação de cloreto no leite foi realizada utilizando analisador específico **modelo 925 da Corning**, por titulação coulométrica. O aparelho analisador de cloretos apresenta um circuito composto de eletrodos de prata que recebem, quando se aciona o equipamento uma corrente elétrica e que libera íons

de prata numa taxa constante. Essa reação ocorre em meio ácido, por essa razão emprega-se um tampão ácido.

Após a calibração do equipamento, eram adicionados 100 μ l de leite numa solução tampão ácida. Com o acionamento do equipamento, os íons de cloro presentes no leite reagiam com a prata liberada em meio ácido, formando cloreto de prata; concomitante a essa reação o cronômetro era acionado. Após o consumo dos íons de cloro presentes na solução tampão, apareceria em quantidade crescente de íons de prata livre na solução. O reconhecimento da presença desses íons, por um eletrodo específico, interrompia-se a corrente elétrica responsável pela liberação dos íons de prata, parando o cronômetro. O tempo de funcionamento do cronômetro é diretamente proporcional ao conteúdo de cloreto na amostra de leite analisada. Os resultados eram expressos em mmol/l e convertidos nessa pesquisa pelo fator de 3,55, transformando sua unidade em mg/dl.

3.3.1.4 Determinação da concentração de proteína total do leite

As amostras de leite, antes do início da análise, eram mantidas em banho maria à 38°C, durante 15 minutos, homogeneizadas, manualmente, e a seguir era determinada a concentração de proteína total do leite, por radiação infravermelha, utilizando-se o equipamento **BENTLEY 2000 da Empresa Bentley Instruments Inc.** Uma alíquota da amostra de leite, depois de ser aspirada pelo equipamento BENTLEY 2000, era exposta a uma fonte de radiação infravermelha, provocando a emissão de um espectro de ondas e, a leitura por absorbância era identificada e quantificada, automaticamente, pelo equipamento. Os resultados desse parâmetro do leite de bovinos foram expressos em mg/dl.

3.3.2 Determinação das características celulares e microbiológicas do leite

3.3.2.1 Contagem eletrônica do número de células somáticas

As amostras de leite, antes de serem submetidas aos procedimentos de contagem de células somáticas, eram mantidas em banho maria à 38°C, durante 15 minutos, e a seguir, homogeneizadas, manualmente, sendo a contagem de células somáticas realizada por citometria de fluxo, utilizando-se o equipamento **SOMACOUNT 500 da Empresa Bentley Instruments Inc..**

Nesse procedimento uma alíquota de leite, depois de ser aspirada pelo equipamento SOMACOUNT 500, era misturada com brometo de etídio, que corava o ácido desoxirribonucléico do núcleo das células do leite. Essas células coradas expostas a uma fonte luminosa de laser fluoresciam, sendo eram convertidas, no tubo multiplicador do equipamento, em impulsos elétricos que eram registrados e quantificados.

3.3.2.2 Exame microbiológico

As amostras de leite, descongeladas, eram semeadas em meio de ágar-sangue de carneiro e incubadas a 37°C, sendo realizadas leituras com 24, 48 e 72 horas de incubação. Os exames bacterioscópicos foram realizados em lâminas

coradas pelo Método de Gram. Os microorganismos isolados eram a seguir identificados por provas bioquímicas de acordo com as técnicas descritas por Lennette et al. (1.985) e Cowan (1.985) e, classificados de acordo com as recomendações preconizadas no Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (KRIEG; HOLT, 1994).

3.3.3 Determinação do proteinograma do soro lácteo de bovinos

Numa pesquisa no âmbito das proteínas do soro lácteo de bovinos, como já foi mencionado, houve, inicialmente, o necessário treinamento e padronização da técnica de isolamento e identificação das frações protéicas das amostras de leite separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), como sugerido por Fagliari et al., em 1998, sendo a técnica descrita a seguir e, apresentando as fórmulas dos reagentes e técnicas de preparo destacadas nos Anexos A e B.

3.3.3.1 Obtenção das amostras de soro lácteo

Para obtenção do soro lácteo foi utilizada a técnica sugerida por Schalm et al. (1971) com as modificações necessárias para perfeita adaptação às atuais condições de metodologia e objetivos, pois, as técnicas que foram utilizadas deveriam se enquadrar no uso rotineiro, em laboratórios clínicos para diagnóstico de mamites.

O soro lácteo foi obtido, coagulando-se o leite pela adição de 10% de solução de renina (coalho Estrela[®]), conforme foi anteriormente descrito por Sant'Ana e Birgel (2003). O soro lácteo separado, após a coagulação, era congelado à -70°C, até o momento da realização da eletroforese em gel de poliacrilamida.

3.3.3.2 Determinação da concentração de proteína total do soro lácteo e da fração caseína do leite

A concentração de proteína total do soro lácteo foi determinada, utilizando-se **analisador automático Bioquímico LIASYS**, pela técnica do biureto, adaptada para determinação do teor protéico de fluídos orgânicos com pequena concentração protéica. A concentração de caseína das amostras de leite foi determinada pela subtração dos valores determinados para o teor de proteína total do leite, e o determinado para proteína total do soro lácteo.

3.3.3.3 Fracionamento das proteínas do soro lácteo por eletroforese em gel de poliacrilamida

- Preparo dos reagentes e géis para realização da eletroforese em gel de poliacrilamida

Para a realização da eletroforese do soro lácteo em gel de poliacrilamida foram utilizados vários reativos que devem ser adrede preparados para confecção dos géis, nos momentos que antecedem a realização das provas. A relação e preparo desses reativos foram apresentados, ao final da tese como Anexos A e B.

Para o desenvolvimento da eletroforese em gel de poliacrilamida utilizaram-se dois tipos de gel, preparados em momentos que antecedem a realização da prova: um denominado de gel separados e um outro, de gel de aplicação, cujas preparações foram detalhadas no Anexo B.

- **Preenchimento das placas de suporte do gel de poliacrilamida**

As placas de vidro, previamente limpas, desengorduradas e montadas em posição vertical, eram preenchidas primeiro com o **gel de separação** até a altura correspondente ao tamanho do pente. Após um período de, aproximadamente, 45 minutos, durante o qual ocorreria a solidificação do gel, para então, a seguir proceder-se preenchimento da placa com o **gel de aplicação**. Finalmente, procedia-se a colocação do pente. Decorridos cerca de 30 minutos retiram-se os espaçadores, o pente e as presilhas das placas e adaptava-se a referida placa na **cuba vertical da marca Permathron**, específica para a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida. A seguir, as cubas eram preenchidas com as soluções tampão, tanto a para cuba superior, como a inferior.

- **Padrões de proteína purificada e de peso molecular**

Para perfeita identificação das frações protéicas do soro lácteo, separadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida, foram utilizados como padrões de comparação proteínas de baixo peso molecular (6.500 – 66.000 kDa) e a seguir as mencionadas proteínas purificadas da marca Sigma: β -lactoglobulina, imunoglobulina bovina e α_1 -antitripsina.

- **Preparação das amostras de soro lácteo e padrões de proteína purificada e a corrida eletroforética**

As amostras de soro lácteo eram preparadas de tal forma que para cada 10 microlitros de soro lácteo ou de proteína purificada fossem acrescentados 40 microlitros de soro fetal bovino e 10 microlitros de gel mix. Após a aplicação de cinco microlitros da amostra, previamente preparadas, nos poços de aplicação, conectava-se a cuba à fonte de energia, submetendo o sistema, inicialmente a uma corrente de 30 miliamperes e, após a passagem das amostras para o gel separador, aumentava-se a corrente elétrica para 50 miliamperes.

Após o término de tempo de corrida, que poderia ser de até seis horas, corava-se o gel, mergulhando-o no corante Coomassie Blue, durante 10 minutos; o excesso de corante era retirado pela ação da solução de ácido acético a 7%. Finalmente, as leituras das frações foram realizadas em densitômetro, utilizando para análise o programa para computador **MultiAnalyst – Marca BIO-RAD**.

3.4 Análise estatística

Para determinar a presença ou não de diferenças estatísticas significativas entre os grupos e subgrupos, experimentais programados pelo delineamento desta pesquisa, as concentrações das proteínas foram analisadas pelo uso do ANOVA, seguido de comparação dos contrastes pelo teste Duncan (SAS, 1985). Na análise dos resultados foram considerados significantes valores com $P \leq 0,05$, sendo os valores obtidos expressos em termos de média $\pm$ desvio padrão.

4 RESULTADOS

4.1 Considerações gerais

Os valores médios e respectivos desvios padrão das variáveis estudadas, ou seja, proteína total e caseína do leite e proteína total do soro lácteo, bem como das frações protéicas, separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (lactoferrina, albumina, imunoglobulina, α_1 -antitripsina, β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, e outras proteínas), foram determinadas e apresentadas em sete tabelas e seis figuras. No Apêndice A incluíram-se, além dos resultados preliminares das avaliações das características físicas e bioquímicas do leite, os obtidos para o proteinograma do soro lácteo de todas as amostras incluídas nos vários grupos experimentais.

4.2 Avaliação das proteínas do leite de vacas sadias, em plena lactação

Os resultados apresentados na tabela 1 permitiram afirmar que, na população de animais sadios e em plena lactação ($n=97$), os valores médios e desvios padrão de **proteína total do leite** foram $3.768 \pm 412,7$ mg/dl; **caseína do leite** - $2.697 \pm 378,8$ mg/dl e **proteína total do soro lácteo** $1.071 \pm 133,3$ mg/dl. As frações protéicas do soro lácteo também foram determinadas nesta população, obtendo-se: **lactoferrina** - $63,95 \pm 28,30$ mg/dl; **albumina plasmática** - $70,70 \pm$

21,06 mg/dl; **imunoglobulina** - $132,40 \pm 37,41$ mg/dl; **α_1 -antitripsina** - $14,92 \pm 9,03$ mg/dl; **β -lactoglobulina** - $580,52 \pm 95,10$ mg/dl; **α -lactoalbumina** - $142,33 \pm 28,90$ mg/dl e **demais proteínas do soro lácteo**, que agrupadas, totalizaram $63,36 \pm 40,71$ mg/dl.

Tabela 1 – Valores médios e desvios padrão das proteínas do leite e frações protéicas do soro lácteo de 97 vacas sadias, em plena lactação - São Paulo – 2004

Proteínas e frações protéicas do leite e do soro lácteo	Valores em mg/dl
Proteína total do leite	$3.768 \pm 412,7$
Caseína do leite	$2.697 \pm 378,8$
Proteína total do soro lácteo	$1.070 \pm 133,3$
Lactoferrina	$63,95 \pm 28,30$
Albumina de origem plasmática	$70,70 \pm 21,06$
Imunoglobulina	$132,40 \pm 37,41$
α_1 -antitripsina	$14,92 \pm 9,03$
β -lactoglobulina	$580,52 \pm 95,10$
α -lactoalbumina	$142,33 \pm 28,90$
Outras proteínas do soro lácteo	$63,36 \pm 40,71$

4.3 Avaliação de fatores de variabilidade do proteinograma do leite

4.3.1 Avaliação da influência do número de lactações nas proteínas do leite de vacas sadias, em plena lactação

Na avaliação de uma possível influência racial no proteinograma do leite, foram comparados os resultados obtidos em amostras de leite de duas raças, Jersey e Gir; sendo os resultados apresentados na tabela 2 e distribuídos nos gráficos da figura 1. A análise dos resultados demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa entre valores médios determinados para proteína total e caseína do leite, dos animais das duas raças, sendo os valores do leite das vacas Jersey e Gir, respectivamente: para **proteína total do leite** - $3.758,31 \pm 436,93$ mg/dl e $3.788,75 \pm 364,33$ mg/dl; para **caseína** - $2.748,00 \pm 395,01$ mg/dl e $2.594,38 \pm 325,55$ mg/dl. Não se verificou também, diferença significativa causada pela influência de fator racial nas seguintes frações protéicas do soro lácteo: **lactoferrina**, **albumina de origem plasmática** e **α -lactoalbumina**. As amostras pertencentes à raça Jersey apresentaram os seguintes valores médios e desvios padrão para referidas frações protéicas do soro lácteo: lactoferrina - $67,41 \pm 31,18$ mg/dl; albumina - $69,96 \pm 18,88$ mg/dl e; α -lactoalbumina - $142,85 \pm 28,57$ mg/dl. Para os animais da raça Gir esses valores expressos em mg/dl, foram: lactoferrina - $56,93 \pm 19,96$; albumina de origem plasmática - $72,22 \pm 25,20$ e α -lactoalbumina - $141,27 \pm 29,98$. No entanto, foram observadas diferenças estatisticamente significantes, quando se comparou os valores determinados para os teores de **proteína total do soro lácteo** (Jersey - $1.010,31 \pm 111,34$ mg/dl e Gir - $1.194,38 \pm 77,25$ mg/dl); **fração imunoglobulínica**

(Jersey - $126,89 \pm 30,20$ e Gir - $143,60 \pm 47,50$ mg/dl); α_1 -antitripsina (Jersey - $16,65 \pm 8,97$ e Gir - $11,42 \pm 8,24$ mg/dl); β -lactoglobulina - (Jersey - $538,89 \pm 72,88$ e Gir - $665,11 \pm 77,57$ mg/dl) e; do conjunto formado por **outras proteínas do soro lácteo** (Jersey - $45,11 \pm 25,95$ e Gir - $100,46 \pm 40,27$ mg/dl).

Tabela 2 – Avaliação da influência racial no proteinograma do leite em amostras colhidas de vacas sadias das raças Jersey e Gir. Resultados expressos em valor médio $\pm$ desvio padrão, em mg/dl - São Paulo - 2004

PROTEÍNAS	RAÇA	
	Jersey	Gir
Proteína total do leite	$3.758,31^a$ $\pm 436,93$	$3.788,75^a$ $\pm 364,33$
Caseína do leite	$2.748,00^a$ $\pm 395,01$	$2.594,38^a$ $\pm 325,55$
Proteína total do soro lácteo	$1.010,31^a$ $\pm 111,34$	$1.194,38^b$ $\pm 77,25$
Lactoferrina	$67,41^a$ $\pm 31,18$	$56,93^a$ $\pm 19,96$
Albumina de origem plasmática	$69,96^a$ $\pm 18,88$	$72,22^a$ $\pm 25,20$
Imunoglobulina	$126,89^a$ $\pm 30,20$	$143,60^b$ $\pm 47,50$
α_1 -antitripsina	$16,65^a$ $\pm 8,97$	$11,42^b$ $\pm 8,24$
β -lactoglobulina	$538,89^a$ $\pm 72,88$	$665,11^b$ $\pm 77,57$
α -lactoalbumina	$142,85^a$ $\pm 28,57$	$141,27^a$ $\pm 29,98$
Outras proteínas do soro lácteo	$45,11^a$ $\pm 25,95$	$100,46^b$ $\pm 40,27$

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre as médias ($P \leq 0,05$)

Figura 1 – Influência racial no proteinograma do leite de vacas sadias, em plena lactação - São Paulo – 2004

* continua

* continuação

D

E

F

Figura 1 – Influência racial no proteinograma do leite de vacas sadias, em plena lactação - São Paulo – 2004

* continua

* continuação

G

H

I

Figura 1 – Influência racial no proteinograma do leite de vacas sadias, em plena lactação - São Paulo – 2004

* continua

* continuação

Figura 1 – Influência racial no proteinograma do leite de vacas sadias, em plena lactação - São Paulo – 2004

4.3.2 Avaliação da influência do número de lactações no proteinograma do leite de vacas sadias, em plena lactação

A possível influência do número de lactações sobre o proteinograma do leite de vacas sadias, em plena lactação foi avaliada nesta pesquisa ao formarem-se grupos com amostras de leite provenientes de vacas de primeira lactação (35 amostras), animais com duas ou três lactações (30 amostras) e, o terceiro grupo experimental, composto por amostras provenientes de animais que apresentavam quatro ou mais lactações (32 amostras), sendo os resultados apresentados na tabela 3 e gráficos da figura 2. Como pode ser observado, na análise dos resultados, não houve influência dos fatores de variabilidade relacionada ao número de lactações nos parâmetros do proteinograma lácteo de vacas.

Os resultados foram apresentados a seguir, expressos em valores médios $\pm$ desvio padrão.

Para **proteína total do leite** foram: 1^a. lactação - $3.804,29 \pm 306,91$; 2 ou 3 lactações - $3.790,33 \pm 431,61$ e; 4 ou mais lactações - $3.708,44 \pm 494,27$ mg/dl.

Para **caseína do leite**: 1^a. lactação - $2.702,86 \pm 261,92$; 2 ou 3 lactações - $2.734,33 \pm 409,11$ e; 4 ou mais lactações - $2.656,56 \pm 457,75$ mg/dl.

Para **proteína total do soro lácteo** foram: 1^a. lactação - $1.101,43 \pm 134,49$; 2 ou 3 lactações - $1.056,00 \pm 132,00$ e; 4 ou mais lactações - $1.051,88 \pm 131,21$ mg/dl.

Destacou-se que, para os retromencionados parâmetros, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os resultados dos três grupos experimentais. Não houve também, diferenças estatisticamente significantes entre os resultados obtidos para as frações do soro lácteo, apresentados a seguir.

Lactoferrina: 1^a. lactação - $59,21 \pm 15,89$; 2 ou 3 lactações - $65,46 \pm 34,51$ e; 4 ou mais lactações - $67,72 \pm 32,37$ mg/dl.

α_1 -antitripsina - 1^a. lactação: $14,95 \pm 8,17$; 2 ou 3 lactações - $14,66 \pm 9,37$ e; 4 ou mais lactações - $15,12 \pm 9,85$ mg/dl.

Para **outras proteínas** do soro lácteo: 1^a. lactação - $67,76 \pm 37,85$; 2 ou 3 lactações - $59,25 \pm 50,00$ e; 4 ou mais lactações - $62,41 \pm 34,39$ mg/dl.

Entretanto, observou-se diferença significativa ao se avaliarem a concentração de **albumina de origem plasmática** nas amostras estudadas, pois nas vacas com duas ou três lactações o valor médio dessa fração protéica ($61,75 \pm 16,80$ mg/dl) foi menor do que nos outros dois grupos: 1^a. lactação ($75,72 \pm 19,61$ mg/dl) e 4 ou mais lactações ($73,60 \pm 23,95$ mg/dl).

Em relação à **imunoglobulina**, valores significativamente menores, também, foram obtidos no grupo de amostras de leite colhidas nas vacas de 2^a. ou 3^a. lactações ($117,96 \pm 34,75$ mg/dl); valor médio intermediário foi observado nas amostras de animais de 1^a. lactação ($134,53 \pm 35,92$ mg/dl) e, o maior valor médio da fração imunoglobulínica do soro lácteo foi observado em animais com 4 ou mais lactações ($143,60 \pm 38,11$ mg/dl).

De idêntica forma, observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os teores de **β -lactoglobulina** do soro lácteo obtidos nos três grupos experimentais: amostras provenientes de animais, que haviam parido quatro ou mais vezes, foram menores ($545,94 \pm 70,35$ mg/dl) do que os das amostras do grupo de vacas de primeira lactação, como também nos de duas ou três lactações (respectivamente: $595,51 \pm 104,52$ e $599,93 \pm 99,28$ mg/dl).

O menor valor médio da fração α -lactoalbumina foi observado no grupo constituído por vacas de duas ou três lactações ($135,05 \pm 27,51$ mg/dl), sendo o valor intermediário observado no grupo de animais com quatro ou mais lactações ($139,90 \pm 29,44$ mg/dl) e, o maior valor médio de α -lactoalbumina ($150,78 \pm 28,22$ mg/dl) nas amostras provenientes de vacas de primeira lactação.

Tabela 3 – Avaliação da influência do número de lactações no proteinograma do leite de vacas sadias, em plena lactação. Resultados expressos em valor médio $\pm$ desvio padrão e, em mg/dl - São Paulo - 2004

PROTEÍNAS	NÚMERO DE LACTAÇÕES		
	1	2 ou 3	4 ou mais
Proteína total do leite	3.804,29 ^a $\pm 306,91$	3.790,33 ^a $\pm 431,61$	3.708,44 ^a $\pm 494,27$
Caseína do leite	2.702,86 ^a $\pm 261,92$	2.734,33 ^a $\pm 409,11$	2.656,56 ^a $\pm 457,75$
Proteína total do soro lácteo	1.101,43 ^a $\pm 134,49$	1.056,00 ^a $\pm 132,00$	1.051,88 ^a $\pm 131,21$
Lactoferrina	59,21 ^a $\pm 15,89$	65,46 ^a $\pm 34,51$	67,72 ^a $\pm 32,37$
Albumina de origem plasmática	75,72 ^a $\pm 19,61$	61,75 ^b $\pm 16,80$	73,60 ^a $\pm 23,95$
Imunoglobulina	134,53 ^{ab} $\pm 35,92$	117,96 ^a $\pm 34,75$	143,60 ^b $\pm 38,11$
α_1 -antitripsina	14,95 ^a $\pm 8,17$	14,66 ^a $\pm 9,37$	15,12 ^a $\pm 9,85$
β -lactoglobulina	595,51 ^a $\pm 104,52$	599,93 ^a $\pm 99,28$	545,94 ^b $\pm 70,35$
α -lactoalbumina	150,78 ^a $\pm 28,22$	135,05 ^b $\pm 27,51$	139,90 ^{ab} $\pm 29,44$
Outras proteínas do soro lácteo	67,76 ^a $\pm 37,85$	59,25 ^a $\pm 50,00$	62,41 ^a $\pm 34,39$

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre as médias ($P \leq 0,05$)

A **B** **C**

Figura 2 – Influência do número de lactações no proteinograma do leite de vacas sadias, em plena lactação – São Paulo – 2004

* continua

* continuação

D

E

F

Figura 2 – Influência do número de lactações no proteinograma do leite de vacas sadias, em plena lactação – São Paulo – 2004

* continua

* continuação

G

H

I

Figura 2 – Influência do número de lactações no proteinograma do leite de vacas sadias, em plena lactação – São Paulo – 2004

* continua

* continuação

J

Figura 2 – Influência do número de lactações no proteinograma do leite de vacas sadias, em plena lactação – São Paulo - 2004

4.3.3 Avaliação da influência da fase da lactação no proteinograma do leite de vacas sadias

Na tabela 4 e figura 3 foram apresentados os resultados obtidos em amostras de leite de vacas em diferentes fases da lactação: amostras de secreção láctea de vacas em fase colostrar, com até 10 dias de paridas; fase inicial de lactação, vacas com 11 a 100 dias de parição; fase média da lactação, isto é, entre o 101º. e o 210º. dia da lactação e; fase final da lactação, ou seja com mais de 210 dias de lactação.

Diferenças significativas foram observadas entre os valores médios determinados para a concentração de proteína total e de caseína no leite (respectivamente, nas quatro fases de lactação definidas: para **proteína total do leite** - $4.076,88 \pm 579,58$ mg/dl; $3.496,36 \pm 311,34$ mg/dl; $3.938,95 \pm 321,06$ mg/dl; $4.134,00 \pm 378,39$ mg/dl; e para **caseína** do leite – $2.500,00 \pm 382,73$ mg/dl; $2.465,68 \pm 310,56$ mg/dl; $2.854,74 \pm 279,65$ mg/dl e; $2.978,00 \pm 401,09$ mg/dl).

Apesar de não terem sido detectadas diferenças significativas e marcantes nas diferentes fases da lactação para as frações **lactoferrina** (respectivamente $67,62 \pm 35,80$ mg/dl; $56,91 \pm 26,10$ mg/dl; $71,09 \pm 28,34$ mg/dl e; $66,53 \pm 31,29$ mg/dl) e para **albumina** de origem plasmática do soro lácteo (respectivamente: $86,66 \pm 63,52$ mg/dl; $67,61 \pm 19,15$ mg/dl; $75,14 \pm 19,59$ mg/dl e; $68,53 \pm 28,54$ mg/dl), nas demais frações do soro lácteo e na concentração de proteína total do soro lácteo foram demonstradas diferenças estatísticas detectadas, ao se compararem os valores obtidos, nas quatro fases da lactação avaliadas, sendo maiores nas amostras colhidas de vacas que estavam em fase colostrar da lactação. De fato as diferenças observadas na concentração de **proteína total do soro lácteo**

(respectivamente: $1.576,88 \pm 797,10$ mg/dl; $1.030,68 \pm 123,78$ mg/dl; $1.084,21 \pm 139,33$ mg/dl e; $1.156,00 \pm 100,41$ mg/dl), foi atribuída ao aumento dos teores das frações protéicas não sintetizadas na glândula mamária, juntamente, com o leite, como: **imunoglobulina** ($366,71 \pm 278,18$ mg/dl; $129,77 \pm 31,65$ mg/dl; $139,47 \pm 32,05$ mg/dl e; $122,23 \pm 59,43$ mg/dl); da fração α_1 -**antitripsina** ($38,63 \pm 23,13$ mg/dl; $15,50 \pm 7,83$ mg/dl; $15,43 \pm 8,96$ mg/dl e; $11,94 \pm 12,14$ mg/dl) e do conjunto de frações constituído por **outras proteínas do soro lácteo** ($129,01 \pm 135,24$ mg/dl; $59,11 \pm 46,73$ mg/dl; $64,95 \pm 35,88$ mg/dl e; $71,85 \pm 33,37$ mg/dl).

Semelhante variação verificou-se com uma das proteínas originada durante a elaboração do leite, a fração protéica **β -lactoglobulina**, sendo valor médio maior na primeira e na última fase da lactação ($726,10 \pm 291,20$ mg/dl; $547,55 \pm 70,63$ mg/dl; $584,09 \pm 99,98$ mg/dl e; $668,24 \pm 92,60$ mg/dl, respectivamente). A fração **α -lactoalbumina** apresentou pequena variação no decorrer da lactação ($159,21 \pm 39,38$ mg/dl; $150,64 \pm 25,42$ mg/dl; $131,89 \pm 27,79$ mg/dl e; $144,39 \pm 34,38$ mg/dl).

Tabela 4 – Avaliação da influência da fase da lactação no proteinograma do leite de vacas, em várias fases da lactação, sendo 1– fase colostrar (1°. ao 10°. dia); 2– terço inicial (11°. ao 100°. dia); 3- terço médio (101°. ao 270°. dia); e 4- terço final da lactação (mais de 270 dias de lactação). Valores expressos em termos de média $\pm$ desvio padrão e, em mg/dl - São Paulo – 2004

PROTEÍNAS	FASES DA LACTAÇÃO			
	1	2	3	4
Proteína total do leite	4.076,88 ^a $\pm$ 579,58	3.496,36 ^b $\pm$ 311,34	3.938,95 ^a $\pm$ 321,06	4.134,00 ^a $\pm$ 378,39
Caseína do leite	2.500,00 ^a $\pm$ 382,73	2.465,68 ^a $\pm$ 310,56	2.854,74 ^b $\pm$ 279,65	2.978,00 ^b $\pm$ 401,09
Proteína total do soro lácteo	1.576,88 ^a $\pm$ 797,10	1.030,68 ^b $\pm$ 123,78	1.084,21 ^b $\pm$ 139,33	1.156,00 ^b $\pm$ 100,41
Lactoferrina	67,62 ^a $\pm$ 35,80	56,91 ^a $\pm$ 26,10	71,09 ^a $\pm$ 28,34	66,53 ^a $\pm$ 31,29
Albumina de origem plasmática	86,66 ^a $\pm$ 63,52	67,61 ^a $\pm$ 19,15	75,14 ^a $\pm$ 19,59	68,53 ^a $\pm$ 28,54
Imunoglobulina	366,71 ^a $\pm$ 278,18	129,77 ^b $\pm$ 31,65	139,47 ^b $\pm$ 32,05	122,23 ^b $\pm$ 59,43
α_1 -antitripsina	38,63 ^a $\pm$ 23,13	15,50 ^b $\pm$ 7,83	15,43 ^b $\pm$ 8,96	11,94 ^b $\pm$ 12,14
β -lactoglobulina	726,10 ^a $\pm$ 291,20	547,55 ^b $\pm$ 70,63	584,09 ^b $\pm$ 99,98	668,24 ^a $\pm$ 92,60
α -lactoalbumina	159,21 ^a $\pm$ 39,38	150,64 ^a $\pm$ 25,42	131,89 ^b $\pm$ 27,79	144,39 ^{ab} $\pm$ 34,38
Outras proteínas do soro lácteo	129,01 ^a $\pm$ 135,24	59,11 ^b $\pm$ 46,73	64,95 ^b $\pm$ 35,88	71,85 ^b $\pm$ 33,37

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre as médias ($P \leq 0,05$)

A **B** **C**

Figura 3 – Influência da fase da lactação sobre o proteinograma do leite de vacas sadias - São Paulo – 2004

* continua

* continuação

D

E

F

Figura 3 – Influência da fase da lactação sobre o proteinograma do leite de vacas sadias - São Paulo – 2004

* continua

* continuação

G

H

I

Figura 3 – Influência da fase da lactação sobre o proteinograma do leite de vacas sadias - São Paulo – 2004

* continua

* continuação

J

Figura 3 – Influência da fase da lactação sobre o proteinograma do leite de vacas sadias - São Paulo - 2004

4.3.4 Avaliação da influência do número de células somáticas no proteinograma do leite de vacas

Na avaliação da influência do número de células somáticas no proteinograma do leite, as amostras de leite de vacas foram distribuídas em quatro grupos: com até 100.000 células/ml; com 100.000 a 500.000 células/ml; com contagem entre 500.000 e 1.500.000 células/ml e; amostras de leite com número de células somáticas maior do que 1.500.000 células/ml. Os resultados obtidos foram apresentados na tabela 5 e configurados nos gráficos da figura 4.

A análise dos resultados apresentados na mencionada tabela permitiu que se afirmasse haver influência da contagem de células somáticas sobre o proteinograma do leite, apenas, quando o número de células somáticas era maior do que 1.500.000 células/ml (CCS4), pois a comparação entre os resultados dos demais grupos experimentais não demonstrou haver diferenças estatisticamente significativas.

Assim sendo, destacou-se que no grupo de animais cujo leite com maior número de células somáticas (maior do que 1.500.000 células/ml), apresentava maior concentração de **proteína total no leite**, sem aumento do teor de **caseína** láctea (respectivamente: $4.548,42 \pm 1.109,65$ mg/dl e, $2665,79 \pm 699,43$ mg/dl). Houve também significativo aumento da **proteína total do soro lácteo** ($1.882,63 \pm 954,51$ mg/dl), aumento conseqüente, principalmente, das variações das frações protéicas não sintetizadas na glândula mamária: **Lactoferrina** ($129,96 \pm 99,46$ mg/dl); albumina de origem plasmática ($179,65 \pm 135,88$ mg/dl); **fração imunoglobulínica** ($473,74 \pm 427,58$ mg/dl); α_1 -**antitripsina** ($44,63 \pm 28,46$ mg/dl) e

o conjunto de **outras proteínas do soro lácteo** ($183,88 \pm 112,63$ mg/dl). Destaque-se que a fração **β -lactoglobulina** apresentou pequenas variações dos resultados.

Tabela 5 – Avaliação da influência do número de células somáticas no proteinograma do leite e do soro lácteo de vacas, sendo CCS1- até 100.000 células/ml; CCS2- de 100.000 a 500.000 células/ml; CCS3- de 500.000 a 1.500.000 células/ml; e CCS4 - mais de 1.500.000 células/ml. Valores expressos em termos de média $\pm$ desvio padrão e, em mg/dl - São Paulo - 2004

PROTEÍNAS	NÚMERO de CÉLULAS SOMÁTICAS POR ML			
	CCS 1	CCS 2	CCS 3	CCS 4
Proteína total do leite	3.720,47 ^a $\pm 382,41$	4.031,50 ^a $\pm 804,24$	3.803,75 ^a $\pm 368,80$	4.548,42 ^b $\pm 1.109,65$
Caseína do leite	2.672,97 ^a $\pm 349,47$	2.809,50 ^a $\pm 421,69$	2.670,00 ^a $\pm 362,01$	2.665,79 ^a $\pm 699,43$
Proteína total do soro lácteo	1.047,50 ^a $\pm 129,79$	1.222,00 ^a $\pm 526,98$	1.133,75 ^a $\pm 115,52$	1.882,63 ^b $\pm 954,51$
Lactoferrina	57,80 ^a $\pm 24,98$	75,43 ^a $\pm 48,07$	78,52 ^a $\pm 34,12$	129,96 ^b $\pm 99,46$
Albumina de origem plasmática	63,69 ^a $\pm 18,33$	87,01 ^a $\pm 41,90$	80,38 ^a $\pm 27,52$	179,65 ^b $\pm 135,88$
Imunoglobulina	125,32 ^a $\pm 38,77$	216,53 ^a $\pm 296,27$	158,37 ^a $\pm 38,98$	473,74 ^b $\pm 427,58$
α_1 -antitripsina	14,35 ^a $\pm 9,45$	21,57 ^a $\pm 14,39$	18,32 ^a $\pm 8,35$	44,63 ^b $\pm 28,46$
β -lactoglobulina	579,57 ^a $\pm 102,19$	585,44 ^a $\pm 113,61$	584,09 ^a $\pm 74,34$	715,06 ^b $\pm 275,65$
α -lactoalbumina	148,44 ^a $\pm 27,88$	147,41 ^a $\pm 29,40$	135,45 ^a $\pm 42,72$	151,66 ^a $\pm 70,11$
Outras proteínas do soro lácteo	56,84 ^a $\pm 39,68$	84,47 ^a $\pm 72,46$	76,09 ^a $\pm 31,46$	183,88 ^b $\pm 112,63$

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre as médias ($P \leq 0,05$)

A **B** **C**

Figura 4 – Influência do número de células somáticas no proteinograma do leite - São Paulo – 2004

* continua

* continuação

D

E

F

Figura 4 – Influência do número de células somáticas no proteinograma do leite - São Paulo – 2004

* continua

* continuação

G

H

I

Figura 4 – Influência do número de células somáticas no proteinograma do leite - São Paulo – 2004

* continua

* continuação

J

Figura 4 – Influência do número de células somáticas no proteinograma do leite - São Paulo – 2004

4.3.5 Avaliação da influência do isolamento bacteriano no proteinograma do leite de vacas

Os resultados do proteinograma do leite e das frações protéicas do soro lácteo isoladas por eletroforese em gel de poliacrilamida em amostras de leite, nas quais houve (resultado positivo) ou não houve isolamento bacteriano (resultado negativo) foram apresentados na tabela 6 e gráficos da figura 5.

A análise dos resultados obtidos permitiu afirmar-se não haver diferença estatisticamente significativa entre os valores determinados nos dois grupos experimentais. Apenas para a fração α -**lactoalbumina** do soro lácteo, detectou-se diferença significativa entre os valores dos dois grupos experimentais, sendo eles significativamente menores obtidos nas amostras que foram positivas no exame microbiológico ($139,96 \pm 37,15$ mg/dl), do que nas amostras positivas ($152,82 \pm 38,28$ mg/dl).

Tabela 6 – Avaliação da influência do isolamento microbiológico no proteinograma do leite de vacas. Resultados estratificados segundo o resultado do exame microbiológico: resultado negativo e positivo e, expressos em valores da média $\pm$ desvio padrão e, em mg/dl - São Paulo - 2004

PROTEÍNAS	EXAME MICROBIOLÓGICO	
	negativo	positivo
Proteína total do leite	3.917,40 ^a $\pm$ 887,50	3.951,77 ^a $\pm$ 394,28
Caseína do leite	2.673,90 ^a $\pm$ 449,69	2.756,94 ^a $\pm$ 411,74
Proteína total do soro lácteo	1.243,51 ^a $\pm$ 666,11	1.194,84 ^a $\pm$ 287,88
Lactoferrina	71,66 ^a $\pm$ 51,90	79,42 ^a $\pm$ 56,50
Albumina de origem plasmática	80,07 ^a $\pm$ 54,63	98,25 ^a $\pm$ 80,32
Imunoglobulina	225,83 ^a $\pm$ 327,15	174,63 ^a $\pm$ 83,54
α_1 -antitripsina	19,81 ^a $\pm$ 20,97	22,54 ^a $\pm$ 12,31
β -lactoglobulina	608,87 ^a $\pm$ 179,34	589,66 ^a $\pm$ 85,47
α -lactoalbumina	152,82 ^a $\pm$ 38,28	139,96 ^b $\pm$ 37,15
Outras proteínas do soro lácteo	81,53 ^a $\pm$ 90,33	87,89 ^a $\pm$ 51,74

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre as médias ($p \leq 0,05$)

A **B** **C**

Figura 5 – Influência da presença de microrganismos no leite no proteinograma lácteo - São Paulo – 2004

* continua

* continuação

D

E

F

Figura 5 – Influência da presença de microrganismos no leite no proteinograma lácteo - São Paulo – 2004

* continua

* continuação

G

H

I

Figura 5 – Influência da presença de microrganismos no leite no proteinograma lácteo - São Paulo – 2004

* continua

* continuação

J

Figura 5 – Influência da presença de microrganismos no leite no proteinograma lácteo - São Paulo - 2004

4.3.6 Avaliação da influência das mamites nas proteínas do leite de vacas

Consultando-se a tabela 7 e os gráficos da figura 6 e, analisando os resultados apresentados, observou-se a significativa influência das mamites no proteinograma do leite. Pois, exceção feita para as frações do soro lácteo produzidas na glândula mamária - **β -lactoglobulina** (animais sadios - $601,14 \pm 147,33$ e vacas acometidas por mamite - $596,64 \pm 137,28$ mg/dl) e; **α -lactoalbumina** (respectivamente: $144,72 \pm 30,96$ e $157,39 \pm 60,17$ mg/dl), nas quais não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, os demais parâmetros protéicos do leite considerados foram significativamente maiores nas vacas acometidas por uma das formas clínicas de mamite.

Tabela 7 – Avaliação da influência das mamites no proteinograma do leite colhidas de vacas sadias e com mamite. Resultados expressos em valores da média $\pm$ desvio padrão e, em mg/dl - São Paulo – 2004

PROTEÍNAS	CONDIÇÃO DE SAÚDE DO ÚBERE	
	Sadio	Mamite
Proteína total do leite	3.812,04 ^a $\pm$ 450,19	4.457,31 ^b $\pm$ 1.231,01
Caseína do leite	2.669,38 ^a $\pm$ 383,93	2.891,54 ^b $\pm$ 579,47
Proteína total do soro lácteo	1.142,65 ^a $\pm$ 362,90	1.565,77 ^b $\pm$ 901,63
Lactoferrina	64,47 ^a $\pm$ 29,33	121,43 ^b $\pm$ 97,28
Albumina de origem plasmática	72,96 ^a $\pm$ 30,85	154,28 ^b $\pm$ 124,15
Imunoglobulina	165,58 ^a $\pm$ 135,26	365,61 ^b $\pm$ 479,79
α_1 -antitripsina	18,28 ^a $\pm$ 14,51	32,96 ^b $\pm$ 24,31
β -lactoglobulina	601,14 ^a $\pm$ 147,33	596,64 ^a $\pm$ 137,28
α -lactoalbumina	144,72 ^a $\pm$ 30,96	157,39 ^a $\pm$ 60,17
Outras proteínas do soro lácteo	72,66 ^a $\pm$ 66,32	135,26 ^b $\pm$ 91,53

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre as médias ($P \leq 0,05$)

A **B** **C**

Figura 6 – Influência da mamite no proteinograma do leite de vacas - São Paulo – 2004

***continua**

* continuação

D

E

F

Figura 6 – Influência da mamite no proteinograma do leite de vacas - São Paulo – 2004

*continua

* continuação

G

H

I

Figura 6 – Influência da mamite no proteinograma do leite de vacas - São Paulo – 2004

*continua

* continuação

J

Figura 6 – Influência da mamite no proteinograma do leite de vacas - São Paulo - 2004

5 DISCUSSÃO

5.1 Considerações gerais

A presente pesquisa teve como objetivo principal determinar o proteinograma do leite de vacas utilizando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, bem como, avaliar a influência de fatores como raça, número de lactações, fase da lactação, da celularidade do leite pela contagem das células somáticas, isolamento bacteriano e dos processos inflamatórios da mama (mamites) na constituição protéica do leite. Para tanto, foram utilizadas 139 amostras de leite, colhidas de forma asséptica, após desprezarem-se os primeiros jatos de leite e os demais cuidados como recomendados Birgel (1982; 1999) para colheita de amostras de leite de ruminantes, para exames complementares ao diagnóstico das mamites.

Os resultados obtidos pela utilização da técnica de fracionamento protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida demonstraram ser ela satisfatória para que fossem alcançados os objetivos propostos no delineamento experimental desta pesquisa, concordando assim com manifestação prévias de vários especialistas entre os quais poderiam ser citados: Kiddy (1964) que recomendou a utilização desta técnica para a identificação de frações protéicas, tanto no soro sanguíneo, como no soro lácteo; Fagliari e Silva (2002) que aplicaram a referida metodologia em soro sanguíneo e; Hiller (1976); Kato et al. (1989); Urech e Puhan (1999) que a utilizaram no fracionamento protéico no leite e no soro lácteo.

5.2 Avaliação do proteinograma no leite de vacas sadias, em plena lactação

Proteína total do leite - Para a avaliação da proteína total do leite e do soro lácteo foram utilizadas 97 amostras de leite de vacas sadias e em plena lactação. O valor médio e desvio padrão determinados na referida amostragem para teor de proteína total do leite, sem distinção racial foi $3.768 \pm 412,7$ mg/dl. Assim houve concordância com alguns resultados encontrados na literatura. Schalm et al. (1971) observaram valores variando entre 3.250 e 3.650 mg/dl, em duas raças de bovinos, como foram semelhantes aos referidos por Haenlein et al. (1973) que em leite de vacas, sem distinção racial, obtiveram o valor médio de 3.610 mg/dl para o mencionado parâmetro. No Brasil, valores similares para concentração de proteína total do leite foram determinados por: Ferreiro et al. (1980) - 3.195 mg/dl, em leite de vacas mestiças; Estrella (2001) - 3.433 ± 622 mg/dl, em amostras de leite de vacas da raça Holandesa e; Marques (2003) - 3.276 ± 375 mg/dl, em amostras de leite de vacas Girolando.

Caseína – A concentração de caseína no leite de vacas sadias, nesta pesquisa, foi calculada por subtração dos valores de proteína total do soro lácteo e dos valores de proteína total do leite, sendo igual a $2.697 \pm 378,8$ mg/dl, estando de acordo com os resultados referidos na literatura, por Schalm et al. (1971) - 2.700 mg/dl e por Auldist et al. (1995) - valores variando entre 2.500 e 3.500 mg/dl.

Proteína total do soro lácteo - Para determinação do proteinograma do soro do leite, inicialmente, padronizou-se a tecnologia da coagulação, do leite e separação da caseína e sinérese do coágulo e, nesta pesquisa o soro lácteo foi obtido, utilizando a técnica descrita por Sant'Ana e Birgel (2003), pela adição de 10% de renina, seguindo, parcialmente, sugestão de Schalm et al. (1971) e, assim obteve-se adequada separação da caseína, da gordura e o soro lácteo, em condições ideais para ser fracionado por eletroforese em gel de poliacrilamida. Os valores de proteína total do soro lácteo foram determinados pela técnica do biureto modificada em aparelho eletrônico, o valor médio, expresso em termos do desvio padrão foi $1.071 \pm 133,3$ mg/dl. A análise comparativa desse resultado com os referidos na literatura, permitiu afirmar-se a concordância com os referidos por Larson e Kendall (1953), que variavam de 700 a 1.100 mg/dl. Entretanto, os presentes resultados discordaram, por serem maiores dos apresentados por Schalm et al. (1971), equivalentes a 540 mg/dl, todavia eles utilizaram técnica semiquantitativa, de menor sensibilidade. A análise minuciosa dos resultados apresentados por Schalm et al. (1971) demonstrou inconsistência dos valores referidos para o teor de proteína total do leite de vacas da raça Jersey - 3.650 mg/dl e o valor de caseína foi 2.850 mg/dl, a subtração desses valores, representando o valor para proteína total do soro lácteo seria 800 mg/dl, maior do que os pesquisadores determinaram, demonstrando a menor sensibilidade e exatidão da técnica utilizada. De forma semelhante, discordou-se dos resultados apresentados por Auldist et al. (1995) que variavam entre 700 e 900 mg/dl.

Lactoferrina - A lactoferrina, proteína de 78 Kda, foi referida na literatura específica como presente normalmente no leite, mas em pequena quantidade (BROWN et al., 1996), com valores máximos na secreção láctea de vacas na fase de involução da glândula mamária, no período de secagem que antecede ao parto (SCHANBACHER; LARRY SMITH, 1974; WELTY et al., 1975) tendo como função fundamental a ação antimicrobiana de proteção da glândula mamária e de outros sistemas orgânicos (RAINARD, 1986; FURMANSKI et al., 1989; NAIDU et al., 1991; STOKES et al., 2002). Apesar da citação genérica, detectada na literatura, destacando os pequenos teores de lactoferrina no leite de bovinos, os resultados ora determinados ($63,95 \pm 28,30$ mg/dl) discordaram, por serem maiores, dos apresentados por Schanbacher e Larry Smith (1974) - 35 mg/dl e por Welty et al. (1975) - 20 mg/dl. A disparidade dos resultados retromencionados apresenta apenas uma explicação razoável, a variação do número de células somáticas das amostras do leite, pois os grânulos dos polimorfos nucleares neutrófilos – o maior contingente de células nas contagens de células somáticas, constituem a principal fonte geradora dessa proteína no leite.

Albumina de origem plasmática - A albumina plasmática bovina, uma das frações protéicas encontrada no leite, com 69 kDa (KANEKO, 1989) seria a proteína de origem sangüínea encontrada em maior quantidade no soro lácteo. O resultado médio e respectivo desvio padrão da fração albumina determinada no soro lácteo, utilizando nestapesquisa - fracionamento eletroforético em gel de poliacrilamida, foi $70,70 \pm 21,06$ mg/dl e, por terem sido maiores discordaram dos referidos na literatura por Schalm et

al. (1971) que utilizou técnica semi-quantitativa pouco específica, obteve o valor de 40 mg/dl, bem como pelos apresentados por Babajimopoulos e Mikolajcik (1977), determinados por imunodifusão em amostras lácteas homogeneizadas e colhidas em tanque de resfriamento do leite, com valores variando entre de 16 e 31 mg/dl. As diferenças encontradas entre os resultados desta pesquisa e dos citados na literatura, provavelmente devem ser atribuídas à utilização de técnicas diferentes para determinação quantitativa de albumina no leite, algumas, atualmente consideradas pouco sensíveis e inexatas. Ressalte-se, ainda, que segundo as afirmações de Honkanen-Buzalski e Sandholm (1981), destacando que a avaliação da albumina pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida sofreria a influência de uma fração de α_1 -antitripsina com o mesmo peso molecular (cerca de 67 kDa) e, assim sendo compondo a mesma zona eletroforética, com possibilidade de aumentar o real resultado de determinação dessas frações protéicas no soro lácteo.

Imunoglobulina- O valor médio da fração imunoglobulínica obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida nas 97 amostras de leite de vacas sadias, em plena lactação foi $132,40 \pm 37,41$ mg/dl. Porém, houve dificuldade para compara-los aos relacionados na literatura, pois a maioria dos pesquisadores utilizou técnicas imunológicas e não o fracionamento eletroforético (SYMONS; WRIGHT, 1974; HONKANEN-BUZALSKI, 1982; CAFFIN; POUTREL, 1988; LEVIEUX; OLLIER, 1999). Também, não houve possibilidade de confrontar os presentes resultados com aqueles determinados por Kato et al. (1989) que, apesar de terem sido obtidos pela técnica de fracionamento eletroforético em gel de poliacrilamida para avaliar modificações nas proteínas do

leite no desenvolvimento das mamas, não apresentaram resultados quantitativos, realçando apenas valores relativos não comparáveis aos valores absolutos determinados nesta tese.

α_1 -antitripsina - A α_1 -antitripsina foi considerada como uma das frações protéicas do leite de origem sangüínea, sendo, porém, em condições fisiológicas encontrada em pequenas quantidades no leite e, segundo alguns pesquisadores aumentaria sua concentração durante processos inflamatórios da glândula mamária, variação detectável, tanto no soro sangüíneo (CONNER et al., 1986), como no leite (ECKERSALL; CONNER, 1988). O valor médio de α_1 -antitripsina determinados nas 97 amostras de soro lácteo de vacas sadias e em plena lactação foi $14,92 \pm 9,03$ mg/dl. Porém, o resultado ora obtido não pode ser confrontado com os artigos de pesquisa referidos na literatura compulsada, pois esses resultados quantitativos de α_1 -antitripsina no soro lácteo de vacas, foram apresentados em unidades e determinados utilizando técnicas colorimétricas (MATTILA; SANDHOLM, 1985; SCHAAR; FUNKE, 1986; MATTILA et al., 1986; HOLDAWAY et al., 1996; ÖSTENSSON, 1993).

β -lactoglobulina - A concentração de β -lactoglobulina no soro lácteo de 97 vacas sadias, em plena lactação observada foi $580,52 \pm 95,10$ mg/dl, sendo fração protéica de maior concentração no soro lácteo, concordando, assim com as manifestações de Schalm et al. (1971). Porém, na análise da revisão da literatura compulsada observou-se forte discrepância entre os resultados atribuídos à fração β -lactoglobulina face à diferença de sensibilidade e exatidão das metodologias empregadas. Assim valores das

duas bandas – A e B da β -lactoglobulina, determinadas por Brunner et al. (1960) foram maiores do que os referidos por pesquisadores que utilizaram técnica semiquantitativa (Schalm et al., 1971), que se assemelhavam aos obtidos em experimentos empregando métodos de imunodifusão (Babajimopoulos e Mikolajcik, 1977). De modo geral, quantitativamente os valores referidos na literatura variaram entre 300 e 400 mg/dl, resultados significativamente diferente dos apresentados nesta tese - $580,52 \pm 95,10$ mg/dl e por tal razão caracterizou-se a discordância e maior sensibilidade da técnica de fracionamento eletroforético das proteínas lácteas em gel de poliacrilamida.

α -lactoalbumina - Na presente pesquisa, a concentração da proteína α -lactoalbumina, determinada em 97 amostras de soro lácteo de vacas sadias, em plena lactação, quantitativamente, foi a segunda maior concentração de fração protéica determinada e, cujo valor médio correspondeu a $142,33 \pm 28,90$ mg/dl. A observação qualitativa a respeito da distribuição proporcional das frações protéicas no soro lácteo concordou com anteriores afirmações de Larson e Kendall (1953) e Schalm et al. (1971). Porém, o resultado ora obtido diferiu, por ter sido maior do que o apresentado por Roller et al. (1965) e por Schalm et al. (1971) ao analisarem o fracionamento protéico do soro lácteo de vacas, utilizando a técnica de separação eletroforética em papel (110 mg/dl) e; por terem sido menores do que os referidos por Randolph et al. (1974) que, utilizando técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida para o fracionamento protéico do leite de oito vacas, obtiveram 178 ± 22 mg/dl. As discrepâncias nos resultados poderiam ser atribuídas a diferenças na metodologia utilizada ou no delineamento experimental.

Outras proteínas do soro lácteo - O valor médio e desvio padrão da variável aqui denominada de outras proteínas do soro lácteo – por não terem sido identificadas, apesar de perfeitamente isoladas pelo fracionamento eletroforético em gel de poliacrilamida foram conglomeradas em um bloco somando-se os resultados das bandas eletroforéticas, nas quais não foi possível determinar exatamente as proteínas ou frações protéicas isoladas: o valor médio e desvio padrão foi $63,36 \pm 40,71$ mg/dl. Algumas destas proteínas, como a haptoglobina e ceruloplasmina, já foram evidenciadas e quantificadas em outras pesquisas, como nas apresentadas por Conner et al. (1986), Eckersall e Conner (1988), e Hirvonen et al. (1996), porém, inúmeras outras permaneciam ainda sem definição, como ressaltaram Kato et al. (1989) e, não foram consideradas com destaque, no momento, por não terem sido incluídas como objetivo primário no delineamento experimental desta tese.

5.3 Avaliação de fatores que influenciam o proteinograma do leite de vacas

5.3.1 Avaliação da influência de fatores raciais no proteinograma do leite de vacas

A avaliação de possível influência racial sobre o proteinograma do leite de vacas sadias, em plena lactação, foi feita nesta pesquisa utilizando-se, para tanto, 97 amostras de leite, sendo 65 provenientes de animais pertencentes à raça Jersey e 32 amostras de leite de animais da raça Gir. A análise dos resultados mostrou não

haver diferenças estatisticamente significantes entre os valores determinados nas amostras de leite de animais da raça Jersey e Gir, respectivamente: para **proteína total do leite** ($3.758,31 \pm 436,93$ mg/dl e $3.788,75 \pm 364,33$ mg/dl); **caseína** ($2.748,00 \pm 395,01$ mg/dl e $2.594,38 \pm 325,55$ mg/dl); **lactoferrina** ($67,41 \pm 31,18$ e $56,93 \pm 19,96$ mg/dl); **albumina** de origem plasmática ($69,96 \pm 18,88$ e $72,22 \pm 25,20$ mg/dl) e; α -lactoalbumina ($142,85 \pm 28,57$ e $141,27 \pm 29,98$ mg/dl). No entanto, detectaram-se diferenças estatisticamente significantes entre os valores encontrados para: **proteína total do soro lácteo** (Jersey - $1.010,31 \pm 111,34$ mg/dl e Gir - $1.194,38 \pm 77,25$ mg/dl); **imunoglobulina** (Jersey - $126,89 \pm 30,20$ e Gir - $143,60 \pm 47,50$ mg/dl); α_1 -**antitripsina** (Jersey - $16,65 \pm 8,97$ e Gir - $11,42 \pm 8,24$ mg/dl); β -**lactoglobulina** (Jersey - $538,89 \pm 72,88$ e Gir - $665,11 \pm 77,57$ mg/dl) e; no conjunto de **outras proteínas do soro lácteo** (Jersey - $45,11 \pm 25,95$ e Gir - $100,46 \pm 40,27$ mg/dl).

A compulsação da literatura especializada permitiu afirmar-se que alguns pesquisadores se dedicaram ao estudo da avaliação do proteinograma do leite, entre os quais poderiam ser citados Larson e Kendall (1953), que compararam os resultados obtidos no proteinograma do leite realizado por eletroforese em papel, de amostras de leite colhidas de vacas das raças Holandesa e Jersey, encontrando resultados concordantes aos referidos nesta tese e cujos valores foram estatisticamente diferentes para a concentração de β -lactoglobulina, respectivamente, 500 e 550 mg/dl. E, recentemente, com as conclusões de Folch et al. (1999) ao afirmarem que a síntese de β -lactoglobulina poderia se manifestar de forma proporcional e quantitativamente diferente nas várias raças de bovinos.

O confronto comparativo entre os resultados ora afirmados, destacando diferença na constituição protéica do leite de bovinos e aqueles obtidos por outros pesquisadores foi impossível de ser estabelecido, pois não foram encontradas pesquisas que tivessem avaliado o proteinograma do leite de vacas zebuínas da raça Gir, nem mesmo para a comparação direta do proteinograma obtido em grupos homogêneos de animais de outras raças, para que se pudesse observar diferenças com os resultados deste experimento.

Os presentes resultados permitiram afirmar-se a discordância com os valores obtidos por Rolleri et al. (1953), que por não apresentarem diferenças estatisticamente significativas entre grupos raciais, enfatizaram a similaridade da constituição protéica do leite de bovinos

5.3.2 Avaliação da influência do número de lactações no proteinograma do leite de vacas

Para avaliação de possível influência do número de lactações sobre o proteinograma do leite de vacas sadias, em plena lactação, utilizaram-se 35 amostras de leite provenientes de animais que estavam na primeira lactação, 30 amostras de animais que estavam na segunda ou terceira lactação e 32 amostras provenientes de animais que estavam na quarta lactação ou já haviam parido mais de quatro vezes. A análise dos resultados demonstrou não haver diferenças estatisticamente significantes entre os valores de **proteína total do leite** determinada por influência do número de

lactações ($3.804,29 \pm 306,91$; $3.790,33 \pm 431,61$ e $3.708,44 \pm 494,27$ mg/dl, respectivamente nos grupos experimentais: primeira lactação; duas ou três lactações e quatro ou mais lactações); para **caseína** (respectivamente: $2.702,86 \pm 261,92$; $2.734,33 \pm 409,11$ e $2.656,56 \pm 457,75$ mg/dl) e para **proteína total do soro lácteo** (respectivamente: $1.101,43 \pm 134,49$; $1.056,00 \pm 132,00$ e $1.051,88 \pm 131,21$ mg/dl). Assim como já foi descrito para as proteínas do leite total, não houve, também, diferenças estatisticamente significativas para as frações protéicas do soro lácteo, detalhadas a seguir. **Lactoferrina** (primeira lactação - $59,21 \pm 15,89$; duas ou três lactações - $65,46 \pm 34,51$ e; quatro ou mais lactações - $67,72 \pm 32,37$ mg/dl); **α_1 -antitripsina** (respectivamente: $14,95 \pm 8,17$; $14,66 \pm 9,37$ e; $15,12 \pm 9,85$ mg/dl) e para **outras proteínas do soro lácteo** (respectivamente: $67,76 \pm 37,85$; $59,25 \pm 50,00$ e; $62,41 \pm 34,39$ mg/dl).

Para confrontar os resultados ora referidos para a avaliação de possível influência do número de lactações em algumas frações do proteinograma do leite de vacas sadias, apenas foram encontradas pesquisas que se referiam à α_1 -antitripsina. Porém, a pequena variação dos resultados dessa fração protéica do soro lácteo tornou necessário discordar das conclusões apresentadas por Mattila e Sandholm (1985), que utilizando técnica colorimétrica, observaram que valores da concentração de α_1 -antitripsina aumentavam, de forma direta e proporcionalmente ao aumento do número de lactações. Discordou-se, também, das observações de Holdaway et al. (1996), destacando aumento da concentração de α_1 -antitripsina nas vacas leiteiras com mais de uma lactação; porém, foi conveniente destacar-se que tal diferença significativa foi observada em apenas um de três rebanhos estudados.

Com relação à **fração imunoglobulínica**, fracionada do soro lácteo, a análise dos resultados demonstrou diferenças significativas entre os três grupos experimentais: o menor valor médio foi detectado no grupo de amostras de animais que estavam na 2^a. ou 3^a. lactações ($117,96 \pm 34,75$ mg/dl); valor intermediário foi observado nas amostras de animais de 1^a. lactação ($134,53 \pm 35,92$ mg/dl) e; o maior valor médio da fração imunoglobulínica do soro lácteo foi verificado em animais com quatro ou mais lactações ($143,60 \pm 38,11$ mg/dl). Esses resultados discordaram daqueles apresentados por Levieux e Ollier (1999), que permitiram, que eles afirmassem, que cabras de primeira lactação apresentavam colostro com menor concentração de imunoglobulinas dos que cabras que estavam na segunda ou mais lactações. Porém, a discordância de resultados poderia ser explicada pela diferença na espécie utilizada na referida pesquisa.

A avaliação dos resultados de **albumina** de origem plasmática no soro lácteo demonstrou existirem diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos experimentais, sendo os menores teores de albumina de origem plasmática obtidos nas vacas com duas ou três lactações ($61,75 \pm 16,80$ mg/dl); o resultado médio dessa fração protéica do soro lácteo nos outros dois grupos se equivaleram: na primeira lactação ($75,72 \pm 19,61$ mg/dl) e nas amostras de leite de vacas com quatro ou mais lactações ($73,60 \pm 23,95$ mg/dl). Diferenças estatisticamente significativas também foram observadas para os teores das frações de β -lactoglobulina e α -lactoalbumina. No caso da fração **β -lactoglobulina** as amostras provenientes do grupo experimental, formado por vacas com quatro ou mais lactações o valor médio dessa fração protéica foi significativamente menor ($545,94 \pm 70,35$ mg/dl) do que o obtido nas amostras do

grupo que representava animais de primeira lactação ou de duas ou três lactações, respectivamente: $595,51 \pm 104,52$ e $599,93 \pm 99,28$ mg/dl. O menor valor médio da fração α -lactoalbumina foi observado no grupo experimental formado por vacas com três ou quatro lactações ($135,05 \pm 27,51$ mg/dl); valor intermediário foi determinado no grupo constituído de vacas com quatro ou mais lactações ($139,90 \pm 29,44$ mg/dl) e o valor máximo de α -lactoalbumina ($150,78 \pm 28,22$ mg/dl) foi detectado nas amostras provenientes de animais de primeira lactação. Na literatura especializada compulsada não foram encontradas pesquisas que tivessem avaliado a influência do número de lactação na variação do proteinograma do soro lácteo.

5.3.3 Avaliação da influência da fase da lactação no proteinograma do leite de vacas

O delineamento experimental proposto nesta tese permitiu que se avaliasse a possível influência da fase da lactação sobre o proteinograma do leite de vacas sadias. Mas para que os objetivos propostos fossem alcançados foram utilizadas 113 amostras de leite, sendo: 16 amostras de vacas com até 10 dias de paridas, objetivando-se avaliar o proteinograma do colostro; os demais grupos experimentais foram constituídos, respectivamente, por 44 amostras de leite de vacas, em fase inicial da lactação (11 a 100 dias de paridas); 38 amostras de leite colhidas de vacas que estavam entre 101^o. e 210^o. dias de lactação e; 15 amostras de vacas no final

da lactação, isto é, com mais de 210 dias de paridas. A análise dos resultados demonstrou haver diferenças estatisticamente significantes entre os resultados obtidos para várias frações do proteinograma lácteo, caracterizando a influência da fase da lactação nos referidos parâmetros. As diferenças mais evidentes foram observadas ao se compararem os resultados obtidos na fase plena de lactação com os obtidos nas amostras colhidas na fase colostrar da lactação; assim sendo, houve concordância com o que já havia sido, anteriormente, mencionado na literatura especializada por Larson e Kendall (1953), Schalm et al. (1971) e Levieux e Ollier (1999).

De forma mais específica, a avaliação dos resultados determinados na presente pesquisa demonstrou que a **proteína total do leite** apresentou concentração média máxima na fase colostrar da lactação ($4.076,88 \pm 579,58$ mg/dl), sendo intermediária nos dois terços finais de lactação ($3.938,95 \pm 321,06$ mg/dl e $4.134,00 \pm 378,39$ mg/dl) e, o valor médio mínimo ocorria no terço inicial da lactação ($3.496,36 \pm 311,34$ mg/dl), diferindo significativamente dos demais resultados. Esses resultados concordaram com os apresentados por Auldist et al. (1995) e Estrella (2001), que observaram maiores concentrações de proteína total do leite no início da lactação, diminuindo a seguir nas fases intermediárias, aumentando, gradativamente ao aproximar-se o final da lactação. Todavia os resultados de proteína total do leite, obtidos nesta tese não concordaram com os apresentados por Marques (2003), que destacou valores significativamente maiores no terço final da lactação.

A avaliação dos resultados de **caseína** demonstrou ocorrência de valores médios significativamente menores na fase colostrar ($2.500,00 \pm 382,73$ mg/dl) e no terço inicial da lactação ($2.465,68 \pm 310,56$ mg/dl), sendo os maiores valores

determinados para essa fração protéica do leite na fase intermediária da lactação ($2.854,74 \pm 279,65$ mg/dl) e final da lactação ($2.978,00 \pm 401,09$ mg/dl). No gráfico B da figura 3, avaliou-se, bem esta variação, permitindo afirmar que esses resultados discordaram daqueles apresentados por Auldist et al. (1995) ao observarem maior concentração de caseína nos estágios iniciais da lactação, com tendências a diminuição nas fases finais da lactação.

A literatura compulsada destacou algumas pesquisas, demonstrando a existência de influência da fase da lactação no teor de **proteína total do soro lácteo**, sendo observados maiores valores na fase inicial da lactação. Essas afirmações foram confirmadas na presente tese, pois a análise dos resultados deixou evidente, que o valor médio da concentração de proteína total do soro lácteo na fase colostrar ($1.576,88 \pm 797,10$ mg/dl) foi significativamente maior do que os obtidos nas outras três fases da lactação caracterizadas no delineamento experimental (respectivamente: $1.030,68 \pm 123,78$ mg/dl; $1.084,21 \pm 139,33$ mg/dl e $1.156,00 \pm 100,41$ mg/dl). Com resultados bem caracterizados discordou-se das manifestações apresentadas por Auldist et al. (1995) e, baseadas, em pesquisa realizada em dois rebanhos bovinos australianos, chegando a conclusões controversas, pois em um dos rebanhos não detectaram, influência da fase da lactação na concentração de proteína total do soro lácteo e, no outro rebanho, os maiores valores desta fração protéica foram observados no início e no final da lactação.

No delineamento experimental proposto nesta pesquisa não foram observadas diferenças estatisticamente significantes, atribuíveis a uma possível influência das fases de lactação nas concentrações da fração **lactoferrina** no soro

lático, respectivamente: $67,62 \pm 35,80$ mg/dl; $56,91 \pm 26,10$ mg/dl; $71,09 \pm 28,34$ mg/dl e $66,53 \pm 31,29$ mg/dl), bem como na fração **albumina** de origem plasmática (respectivamente: $86,66 \pm 63,52$ mg/dl; $67,61 \pm 19,15$ mg/dl; $75,14 \pm 19,59$ mg/dl e $68,53 \pm 28,54$ mg/dl). Na literatura consultada, não foram encontradas referências a pesquisas que tivessem avaliado a influência da lactação sobre a concentração de lactoferrina no leite de vacas, para que os resultados ora apresentados pudessem ser confrontados. No entanto, com relação a concentração de albumina de origem plasmática no soro lácteo de vacas, em diferentes fases da lactação, os resultados destacados na literatura, mostraram-se conflitantes. Assim, Larson e Kendall (1953), Östensson (1993) e Levieux e Ollier (1999) detectaram concentração maior de albumina, apenas nos primeiros dias após a parturição. Por outro lado, Honkanen-Buzalski (1982) observou efeito significativo do estágio da lactação sobre a concentração de albumina de origem plasmática no leite, ressaltando que os menores valores dessa fração protéica foram detectados nos meses iniciais da lactação. No momento, julgou-se oportuno afirmar-se, que os resultados obtidos nesta tese refletiram as expectativas da fisiologia e fisiopatologia da glândula mamária e das mamites, pois os processos inflamatórios caracterizam-se por transudação de proteínas plasmáticas para os tecidos inflamados e, tanto nas mamites, como na congestão fisiológica ante e pós-parto, com acentuado edema demonstrando alteração da permeabilidade vascular, causa definida para o aumento dos teores de albumina e outras proteínas sanguíneas no leite.

Ainda considerando as frações protéicas do soro lácteo de origem sanguínea, os resultados desta pesquisa apresentaram valores significativamente maiores da fração **imunoglobulina** na fase colostrar ($366,71 \pm 278,18$ mg/dl) do que nas demais

fases da lactação (respectivamente: $129,77 \pm 31,65$ mg/dl; $139,47 \pm 32,05$ mg/dl e $122,23 \pm 59,43$ mg/dl). Os trabalhos de pesquisas compulsados foram unânimes em afirmação similar a constatada pelos resultados ora apresentados, pois inúmeros pesquisadores observaram maior concentração da fração imunoglobulina na fase colostrar da lactação (LARSON; KENDALL, 1953; SCHALM et al., 1971; MAUNSELL et al., 1998; LEVIEUX; OLLIER, 1999). Larson (1979), em reconhecida revisão da literatura sobre o assunto, afirmou que a significativamente importante ocorrência da maior concentração de imunoglobulina no colostro dos ruminantes, especificamente de IgG eram responsáveis pela adequada transmissão passiva de imunidade aos recém-nascidos, imediatamente, após o parto.

No capítulo de revisão da literatura destacou-se que Mattila e Sandholm (1985), Schaar e Funke (1986) e Östensson (1993) determinaram maiores valores da fração α_1 -**antitripsina**, na fase inicial da lactação. Essas conclusões foram confirmadas pelos resultados obtidos, segundo delineamento experimental proposto para avaliar a influência da lactação na concentração de α_1 -antitripsina no soro lácteo. O valor médio da fração α_1 -antitripsina foi significativamente maior na fase colostrar da lactação ($38,63 \pm 23,13$ mg/dl) do que nas demais fases da lactação estudadas (respectivamente: $15,50 \pm 7,83$ mg/dl; $15,43 \pm 8,96$ mg/dl e $11,94 \pm 12,14$ mg/dl). Fato semelhante foi observado ao se considerar o conjunto de frações protéicas do soro lácteo, denominadas nestatese de **outras proteínas do soro lácteo**, pois o maior valor médio foi determinado na fase colostrar da lactação e, após uma diminuição de concentração no terço inicial da lactação, para a seguir aumentar, progressivamente, porém seus valores foram de

pequena magnitude (respectivamente: $129,01 \pm 135,24$ mg/dl; $59,11 \pm 46,73$ mg/dl; $64,95 \pm 35,88$ mg/dl e $71,85 \pm 33,37$ mg/dl).

Nesta tese, a influência da fase da lactação nas proteínas do soro lácteo, sintetizadas no parênquima da mama - β -lactoglobulina e α -lactoalbumina, também foi avaliada, em amostras de leite de vacas sadias. O atencioso estudo da análise estatística dos resultados obtidos permitiu afirmar, que a concentração de **β -lactoglobulina** foi maior na fase colostrar e final da lactação (respectivamente: $726,10 \pm 291,20$ mg/dl e; $668,24 \pm 92,60$ mg/dl), sendo os menores valores médios do teor dessa fração protéica do soro lácteo, no primeiro e segundo terço da lactação (respectivamente: $547,55 \pm 70,63$ mg/dl; $584,09 \pm 99,98$ mg/dl). Esses resultados, de modo geral concordaram com as observações apresentadas por Larson e Kendall (1953) e Levieux e Ollier (1999), que avaliaram a concentração de β -lactoglobulina no período pós-parto, obtendo os maiores valores nas amostras de leite colhidas nos primeiros dias após o parto, em comparação com os obtidos em amostras colhidas entre 30 e 100 dias da lactação. Anteriormente, afirmou-se a concordância de maneira geral, mas ocorreram algumas discordâncias pontuais: com Larson e Kendall (1953) por não terem observado aumento da concentração da fração β -lactoglobulina nas fases finais da lactação e; com Levieux e Ollier (1999) por não terem avaliado amostras de leite em fases mais adiantadas da lactação.

A fração protéica **α -lactoalbumina** do soro lácteo apresentou pequenas variações no decorrer das quatro fases da lactação avaliadas (respectivamente: $159,21 \pm 39,38$ mg/dl; $150,64 \pm 25,42$ mg/dl; $131,89 \pm 27,79$ mg/dl e; $144,39 \pm 34,38$ mg/dl), porém, houve, entre alguns valores médios, diferenças estatisticamente significativas.

Os maiores valores foram observados na fase inicial da lactação (fase colostrar e primeiro terço da lactação), a seguir observou-se, tendência a diminuição (segundo terço da lactação) e apresentando novo incremento dos resultados na fase final da lactação, concordando com as conclusões apresentadas por Larson e Kendall (1953) e Levieux e Ollier (1999).

No modelo experimental delineado para a realização desta tese, padronizou-se a utilização de amostras de leite colhidas, após desprezados os primeiros jatos de leite e feita a higienização dos tetos; portanto, não se objetivou, avaliar a influência das frações ou momentos da ordenha (leite de retenção, da ordenha plena e leite residual) no proteinograma lácteo de vacas sadias. Assim sendo os resultados obtidos não puderam ser comparados com os resultados apresentados por Östensson (1993), Holdaway et al. (1996) e Urech e Puhan (1999), que se dedicaram ao estudo do proteinograma de amostras de leite de diferentes momentos da ordenha.

5.3.4 Avaliação da influência do número de células somáticas no proteinograma do leite de vacas

A influência do número de células somáticas no proteinograma lácteo foi avaliada nesta pesquisa demonstrando significativa relação entre amostras de leite com grande número de células somáticas e as variações dos teores protéicos do leite. Na avaliação desses parâmetros, foram utilizadas 139 amostras de leite, distribuídas em quatro categorias ou grupos experimentais, de acordo com o número de células

somáticas dessas amostras, que ficaram assim constituídos: CCS1, com 64 amostras contendo até 100.000 células somáticas/ml; CCS2, com 40 amostras que tinham entre 100.000 e 500.000 células somáticas/ml; CCS3, composto por 16 amostras com contagem entre 500.000 e 1.500.000 células somáticas/ml e; CCS4, formado por 19 amostras de leite com mais de 1.500.000 células somáticas/ml. A avaliação dos resultados dos teores de **proteína total do leite**, apresentados na tabela 5 e figura 4, e foram, respectivamente: $3.720,47 \pm 382,41$; $4.031,50 \pm 804,24$; $3.803,75 \pm 368,80$ mg/dl e; $4.548,42 \pm 1.109,65$ mg/dl. A análise desses resultados demonstrou influência significativa nas variações do teor de proteína total do leite de bovinos, pois amostras com maior número de células somáticas foram as que apresentaram maior concentração de proteína. Esses resultados discordaram daqueles apresentados por Haenlein et al. (1973) que não observaram diferenças significativas na concentração de proteína total do leite de amostras de leite cujas celularidades eram maior ou menor do que 1.000.000 células somáticas por ml de leite. Porém, apesar de diferenças na formação dos grupos experimentais, os resultados ora apresentados concordaram com aqueles obtidos por Verdi et al. (1987), que não determinaram a existência de diferença no teor de proteína total do leite colhido de vacas de dois grupos experimentais: 170.000 células somáticas/ml e, outro com número médio de 670.000 células somáticas/ml. Os resultados obtidos nesta tese, considerando apenas o confronto de grupos com semelhantes números de células somáticas discordaram com as observações de Auldist et al. (1995) ao determinarem maior concentração de proteína total no leite de amostras com mais de 300.000 células somáticas/ml do que em outras com menor número de células e, apesar dos pesquisadores justificarem o aumento de proteína total no leite como conseqüência à maior quantidade de proteínas de origem sangüínea, transudada para a secreção láctea. A análise atenciosa dos resultados

obtidos nos diferentes grupos experimentais, principalmente os que avaliaram o teor protéico do leite de amostras contendo até 100.000 e entre 100.000 e 500.000 células somáticas/ml, permitiu discordar-se das conclusões apresentadas por Urech e Puhan (1999), afirmando ser maior o teor protéico das amostras de leite contendo entre 200.000 e 500.000 células somáticas/ml.

A análise dos resultados da presente pesquisa permitiu afirmar-se a não existência de diferença estatisticamente significativa da concentração de **caseína** láctea que pudesse ser atribuída às diferenças no número de células somáticas nos grupos experimentais formados e os resultados obtidos foram, respectivamente: $2672,97 \pm 349,47$; $2809,50 \pm 421,69$; $2670,00 \pm 362,01$ e; $2665,79 \pm 699,43$ mg/dl. E, assim sendo discordou-se dos resultados apresentados por Haenlein et al. (1973), que destacaram diminuição nos teores de caseína em amostras de leite com mais de 1.000.000 células somáticas/ml. Na avaliação comparativa dos resultados desta tese com o apresentados em algumas referências bibliográficas discordou-se das conclusões apresentadas por Auldist et al. que destacaram que os teores de caseína láctea era menor em amostras de leite com mais de 300.000 células somáticas/ml.

A avaliação dos teores de **proteína total do soro lácteo** demonstrou, que as variações observadas nos quatro grupos experimentais foram conseqüentes à significativa influência do número de células somáticas, particularmente quando as contagens de células somáticas foram maiores do que 1.500.000 células somáticas/ml. O valor médio e desvio padrão determinado para cada um dos quatro

grupos experimentais, foram, respectivamente: $1.047,50 \pm 129,79$; $1.222,00 \pm 526,98$; $1.133,75 \pm 115,52$ e; $1.882,63 \pm 954,51$ mg/dl. A interpretação dos resultados obtidos permitiu formal discordância com a conclusão formulada por Auldist et al. (1995): os maiores teores de proteína total do soro lácteo foram determinadas em amostras com mais de 300.00 células somáticas/ml. Porém, nesta tese, apesar do menor teor de proteína total do soro lácteo ter sido observado no grupo de animais, que apresentava até 100.000 células por ml de leite, diferenças estatisticamente significativas, somente foram observadas ao se compararem os resultados com aquele obtido no grupo de vacas cujas amostras de leite apresentavam mais de 1.500.000 células somáticas/ml.

A análise dos resultados do fracionamento protéico do soro lácteo por eletroforese em gel de poliacrilamida em amostras de leite agrupadas segundo o número de células somáticas, cujos grupos experimentais, anteriormente, bem caracterizados, demonstrou que os padrões de variação determinados para as frações lactoferrina, albumina de origem plasmática, imunoglobulinas, α_1 -antitripsina, e o conjunto formado por outras proteínas foram similares ao descrito para teor de proteína total do soro lácteo.

A comparação entre os resultados obtidos nos quatro grupos experimentais, considerando as frações protéicas do soro lácteo, sendo os valores médios máximos obtidos para as frações **lactoferrina** ($129,96 \pm 99,46$ mg/dl), **albumina** de origem plasmática ($179,65 \pm 135,88$ mg/dl), **imunoglobulinas** ($473,74 \pm 427,58$ mg/dl), **α_1 -antitripsina** ($44,63 \pm 28,46$ mg/dl) e **outras proteínas do soro lácteo** ($183,88 \pm 112,63$ mg/dl), significativamente maiores nas amostras cuja celularidade se expressasse por um valor com mais de 1.500.000 células somáticas por mililitro. Os

resultados ora apresentados concordaram com os relatados por Haenlein et al. (1973), salientando significativo aumento das concentrações lácteas de albumina de origem plasmática e da fração constituída pelas imunoglobulinas em amostras de leite cuja celularidade apresentava mais de 1.000.000 células somáticas/ml. Da mesma forma, houve concordância com os resultados apresentados por Randolph et al. (1974), ao fracionarem as proteínas do leite, utilizando a eletroforese em gel de poliacrilamida e verificaram aumento significativo das concentrações de albumina de origem plasmática, fração das imunoglobulinas e de algumas bandas de proteínas que não puderam ser identificadas em amostras de leite positivas em teste específico para determinar com maior precisão e numericamente o aumento da celularidade do leite, pois a prova *Wisconsin Mastitis Test*, faz apenas, uma avaliação qualitativa.

A avaliação da influência da celularidade do leite na constituição protéica dessa secreção concordou com as conclusões apresentadas por Verdi et al. (1987), não detectando diferenças significativas nos teores de albumina de origem plasmática no leite de vacas, com celularidade variando entre 170.000 e 670.000 células somáticas/ml.

Todavia, ao se fazer o confronto dos resultados obtidos, com os compulsados na literatura especializada, destacou-se a contestável concordância dos ora apresentados resultados com os referidos por Auldist et al. (1995) e Urech e Puhan (1999) ao afirmarem, que as frações do proteinograma do leite lactoferrina, albumina de origem plasmática e imunoglobulinas encontrar-se-iam aumentadas no leite de vacas de forma significativa nas amostras de leite que possuísem maior celularidade, porém, os mencionados pesquisadores consideraram casos de maior celularidade do leite, as

amostras que apresentassem contagem de células somáticas, variando entre 300.000 e 500.000 células/ml.

As frações do proteinograma do soro lácteo sintetizadas no ciclo da secreção láctea também tiveram seus resultados analisados e interpretados, observando-se que apenas a β -lactoglobulina foi influenciada pela celularidade das amostras de leite. Como já foi, anteriormente, salientado nesta pesquisa, houve comprovada influência da celularidade na concentração da fração **β -lactoglobulina**, os resultados obtidos nos quatro grupos experimentais foram, respectivamente: $579,57 \pm 102,19$; $585,44 \pm 113,61$; $584,09 \pm 74,34$ e; $715,06 \pm 275,65$ mg/dl. As diferenças significativas entre os resultados dos grupos experimentais foram atribuídas ao maior teor de β -lactoglobulina no grupo, cujas amostras possuíam mais de 1.500.000 células somáticas por ml. As presentes observações concordaram parcialmente com os resultados referidos por Verdi et al. (1987), quando afirmaram não terem detectado diferenças significativas entre a concentração de β -lactoglobulina nas amostras, oriundas de vacas com número de células somáticas variando ao redor de 170.000 e 670.000 células/ml.

A avaliação dos resultados dos teores de **α -lactoalbumina** do proteinograma do soro lácteo de amostras caracterizadas por diferentes magnitudes de sua celularidade, não demonstrou que o número de células somáticas exercia qualquer influência no teor da mencionada proteína (os valores médios obtidos nos quatro grupos experimentais foram, respectivamente: $148,44 \pm 27,88$; $147,41 \pm 29,40$; $135,45 \pm 42,72$ e; $151,66 \pm 70,11$ mg/dl). Esses resultados concordaram com os apresentados por Randolph et al. (1974) e por Verdi et al. (1987). Mas, discordaram daqueles referidos por Haenlein et al. (1973), que observaram diminuição significativa do teor

láceteo de α -lactoalbumina em amostras cuja contagem de células somáticas ultrapassava 1.000.000 células/ml.

5.3.5 Avaliação da influência do isolamento bacteriano no proteinograma do leite de vacas

A avaliação dos resultados apresentados na tabela 6 e configurados nos gráficos da figura 5 demonstraram não haver influência significativa do isolamento de bactérias no teor de proteína total no leite de vacas, pois as diferenças entre os resultados obtidos em amostras negativas (sem isolamento bacteriano) ou positivas (com isolamento bacteriano) não foram significativas. Os resultados determinados expressos em valor médio e desvio padrão foram, respectivamente: para **proteína total do leite** - $3.917,40 \pm 887,50$ mg/dl e $3.951,77 \pm 394,28$ mg/dl; **caseína** - $2.673,90 \pm 449,69$ mg/dl e $2.756,94 \pm 411,74$ mg/dl; **proteína total do soro láceteo** - $1.243,51 \pm 666,11$ mg/dl e $1.194,84 \pm 287,88$ mg/dl; **lactoferrina** - $71,66 \pm 51,90$ mg/dl e $79,42 \pm 56,50$ mg/dl; **albumina** de origem plasmática - $80,07 \pm 54,63$ mg/dl e $98,25 \pm 80,32$ mg/dl; fração de **imunoglobulinas** - $225,83 \pm 327,15$ mg/dl e $174,63 \pm 83,54$ mg/dl; α_1 -**antitripsina** - $19,81 \pm 20,97$ mg/dl e $22,54 \pm 12,31$ mg/dl; β -**lactoglobulina** - $608,87 \pm 179,34$ mg/dl e $589,66 \pm 85,47$ mg/dl e; **outras proteínas do soro láceteo** - $81,53 \pm 90,33$ mg/dl e $87,89 \pm 51,74$ mg/dl. Apenas foi detectada diferença estatisticamente significativa do teor de α -lactoalbumina do soro láceteo, com menores valores médios

determinados nas amostras positivas no exame microbiológico ($139,96 \pm 37,15$ mg/dl) do que nas amostras negativas nesse exame ($152,82 \pm 38,28$ mg/dl).

Ao confrontar os resultados ora apresentados com os relacionados na literatura compulsada destacou-se, por seu significado para o melhor conhecimento da patogenia das mastites, a revisão apresentada por Schalm (1977) contribuindo para elucidação da ação e efeitos patológicos dos agentes etiológicos dos processos inflamatórios dos tecidos da glândula mamária; ressaltando que no desenvolvimento do processo infeccioso as manifestações fisiopatológicas poderiam variar na dependência do tipo de patógeno e presença de fatores predisponentes (TOLLE, 1975). No delineamento experimental proposto nesta pesquisa não objetivou avaliar a influência de diferentes espécies de bactérias na constituição protéica do leite, não podendo, os resultados serem confrontados com os apresentados por outros pesquisadores, como descreveram Harmon et al. (1975). Todavia, pela avaliação dos resultados obtidos nesta tese ficou demonstrado, que a simples presença de germes patogênicos na glândula mamária, sem manifestações clínicas dos processos inflamatórios, não determinaria alterações das estruturas da glândula mamária, que possibilitasse evidenciar alterações significativas do proteinograma do leite. Como fora determinado por Mattila et al. (1986) e Holdaway et al. (1996) ao avaliarem a influência específica da infecção bacteriana sobre o teor das frações do proteinograma do leite.

Os resultados encontrados nesta pesquisa, relacionando a concentração de proteína total do leite com o isolamento de germes patogênicos nas amostras de leite (amostras negativas e positivas no exame microbiológico) concordaram com as conclusões apresentadas por Estrella (2001) e Marques (2003), que também

verificaram não haver influência da presença de bactérias e seu isolamento no teor protéico total do leite.

5.3.6 Avaliação da influência da mamite no proteinograma do leite de vacas

A mamite tem sido considerada como o processo patológico causador de inúmeras e significativas alterações da constituição da secreção láctea das espécies animais utilizadas na produção leiteira. Por tal razão, no delineamento experimental desta tese houve grande interesse na avaliação dos efeitos desses processos inflamatórios no proteinograma do leite. E, as 139 amostras foram separadas em dois grupos: um formado por 113 amostras colhidas de animais sadios e; outro formado por 26 amostras de leite de glândulas acometidas por mamite, previamente diagnosticadas por exame clínico, baseados em pelo menos três das seguintes manifestações clínicas características das mamites: sinais de inflamação aguda na glândula mamária; presença de grumos no leite; pH maior do que de 6.8; eletrocondutividade maior do que 6.6 mS; determinação de cloretos com valores maiores do que 154,31 mg/dl e número de células somáticas maior do que 700.000 células/ml, bem como, isolamento de patógeno no exame microbiológico, como já mencionara Estrella (2001) em sua dissertação de mestrado.

A análise dos resultados obtidos na presente pesquisa demonstrou a ocorrência de significativo aumento tanto do teor de proteína total do leite, como do soro lácteo. Os valores determinados, respectivamente, para as amostras de animais

sadios e acometidos por mamite foram os seguintes: **proteína total do leite** - $3.812,04 \pm 450,19$ mg/dl e $4.457,31 \pm 1.231,01$ mg/dl; **proteína total do soro lácteo** - $1.142,65 \pm 362,90$ e $1.565,77 \pm 901,63$ mg/dl; para **caseína** do leite - $2.669,38 \pm 383,93$ e $2.891,54 \pm 579,47$ mg/dl. Os relacionados resultados obtidos para teor de proteína total do leite não concordaram com os encontrados na literatura, que destacaram a não alteração significativa da concentração de proteína total do leite, durante desenvolvimento dos processos inflamatórios da glândula mamária, ressaltando, ainda, que haveria diminuição no teor de caseína no leite (SCHALM et al. 1971; HAENLEIN et al., 1973; FERREIRO et al., 1980; KITCHEN, 1981; ROGERS et al. 1989). Resultados opostos aos ora apresentados, pois teores de proteína total do leite, do soro lácteo, bem como da caseína, nas amostras colhidas de 26 quartos acometidos por mamite catarral, foram significativamente maiores do que os resultados obtidos em amostras oriundas de quartos sadios. A diferença verificada entre os resultados desta pesquisa e os referidos na literatura consultada poderiam ser atribuídos ao rigor e pleno conhecimento de semiologia para o exato diagnóstico da mamite ou por inúmeros pesquisadores não terem avaliado a severidade do processo inflamatório e a evolução da enfermidade (SCHALM et al. 1971; KITCHEN, 1981). Destaque-se ainda, que as referidas discordâncias de interpretação dos resultados poderiam ser dependentes das diferenças de técnicas utilizadas (ANDERSON; ANDREWS, 1977; SHELDRAKE et al., 1983).

Entretanto, os resultados ora apresentados concordaram com os determinados por Estrella (2001) que observou concentração significativamente maior de proteína total do leite em amostras oriundas de glândulas acometidas por mamite do

que aqueles obtidos em amostras de leite provenientes de glândulas mamárias consideradas sadias.

A análise conjunta, tanto das referências destacadas na compulsação da literatura especializada, quanto a avaliação dos resultados ora apresentados e submetidos à avaliação crítica foram, praticamente, unânimes nas afirmações concernentes ao comportamento e dinâmica dos teores protéicos do leite ou do soro lácteo: nos processos inflamatórios da glândula mamária, instalados e/ou em desenvolvimento a concentração de proteína total do soro lácteo aumentaria em decorrência do maior teor das proteínas de origem sangüínea no leite, conseqüentes ao incremento da transudação plasmática por aumento da permeabilidade do sistema vascular regional. Confirmaram-se, assim, as predições apresentadas por Schalm et al. (1971); Randolph et al. (1974); Kitchen (1981); Rogers et al. (1989); Auldist et al. (1995) e; Urech e Puhan (1999).

Ao se complementar as afirmações retromencionadas, a avaliação dos resultados obtidos para as frações protéicas de origem sangüínea do proteinograma do soro lácteo de vacas sadias e das acometidas por mamite, ficou evidente a influência do processo inflamatório nos referidos constituintes lácteos, observando-se, respectivamente, os seguintes valores médios nas amostras do soro lácteo de vacas sadias e nas de vacas acometidas por mamite: **lactoferrina** ($64,47 \pm 29,33$ e $121,43 \pm 97,28$ mg/dl); **albumina** de origem plasmática ($72,96 \pm 30,85$ e $154,28 \pm 124,15$ mg/dl); **imunoglobulinas** ($165,58 \pm 135,26$ e $365,61 \pm 479,79$ mg/dl); α_1 -**antitripsina** ($18,28 \pm 14,51$ e $32,96 \pm 24,31$ mg/dl) e; de **outras proteínas do soro lácteo** ($72,66 \pm 66,32$ e $135,26 \pm 91,53$ mg/dl). Fato destacável foi o aumento

significativo dos teores das frações protéicas não sintetizadas na glândula mamária durante o ciclo secretório, concordando com os resultados apresentados na literatura compulsada e referidos por Lecce e Legates (1959); Schalm et al. (1971); Schalm (1977); Randolph et al. (1974); Harmon et al. (1975); Anderson e Andrews (1977); Kitchen (1981); Honkanen-Buzalski (1982); Makimura e Suzuki, 1982; Guildry et al. (1983); Schaar e Funke (1986) e; Rogers et al. (1989).

Em contraposição, a análise dos resultados determinados para os componentes protéicos sintetizados na glândula mamária, durante o ciclo secretório do leite, ou seja, das frações protéicas β -lactoglobulina e α -lactoalbumina do proteinograma do soro lácteo, não sofreram influência significativa da presença de processo inflamatório na glândula mamária, secretora do leite constituinte das amostras examinadas. Os resultados observados, considerados respectivamente, obtidos em amostras de glândula mamária sadia e acometida por mamite, foram: **β -lactoglobulina** - $601,14 \pm 147,33$ e $596,64 \pm 137,28$ mg/dl e; **α -lactoalbumina** - $144,72 \pm 30,96$ e $157,39 \pm 60,17$ mg/dl. Ao confrontar esses resultados com os referidos na literatura especializada, verificou-se que eles não concordaram com alguns apresentados por pesquisadores que afirmaram a diminuição dos valores das referidas frações protéicas em amostras de leite de vacas acometidas por mamite; assim concluíram em suas pesquisas Schalm et al. (1971); Randolph et al. (1974); Harmon et al. (1975). A discrepância dos resultados e conseqüentemente das conclusões poderiam ter várias motivações, entre as quais podem ser destacadas: forma clínica e severidade das manifestações sintomáticas das mamites e a metodologia da determinação bioquímica ou biofísica do fracionamento protéico dos soro lácteo e as técnicas de dosagens. O

delineamento experimental desta tese previu implicitamente a avaliação do leite de vacas acometidas por mamite catarral – caracterizadas por manifestações clínicas evidentes, mas que mantivessem, ainda secreção láctea com aspecto típico do leite, coagulação da caseína láctea por adição de renina, fracionamento protéico por eletroforese em gel de poliacrilamida e microdosagem da proteína total pela técnica do biureto. Entretanto, houve concordância dos resultados apresentados na pesquisa conduzida por Anderson e Andrews (1977), que de forma seqüencial avaliaram as alterações protéicas no soro lácteo de vacas após indução experimental de mamite, verificando que as concentrações das frações β -lactoglobulina e α -lactoalbumina diminuíram nas primeiras 24 horas após a indução experimental do processo inflamatório infeccioso, para, posteriormente, retornarem aos valores determinados antes do início do experimento.

6 CONCLUSÕES

A análise dos resultados das determinações de proteína total e caseína do leite, proteína total do soro lácteo, e a avaliação do proteinograma obtido por fracionamento eletroforético, em gel de poliacrilamida de 139 amostras de leite de vacas criadas em quatro diferentes propriedades do Estado de São Paulo, permitiu estabelecer os valores médios padrões dos teores de proteína total e caseína do leite, bem como proteína total do soro lácteo e das frações - lactoferrina, albumina de origem plasmática, imunoglobulinas, α_1 -antitripsina, β -lactoglobulina, α -lactoalbumina e um conjunto de outras proteínas do soro lácteo (isoladas mas não identificadas), bem como avaliar a influência de alguns fatores possíveis causadores de variabilidade dos resultados do proteinograma do leite, como: raciais; número de lactações; fase da lactação; número de células somáticas; isolamento bacteriano e; ocorrência de mamite. Os resultados da mencionada análise foram expressados nas conclusões a seguir detalhadas.

1ª. Conclusão – Determinou-se os valores padrões do proteinograma de vacas saudas, em plena lactação, criadas em São Paulo, sendo os resultados médios e desvios padrão apresentados a seguir:

Valores médios e desvios padrão dos teores de proteína total do leite e do soro lácteo, bem como das frações protéicas do soro lácteo, após fracionamento eletroforético em gel de poliacrilamida

Proteínas e frações protéicas do leite	Valores em mg/dl
Proteína total do leite	$3.768 \pm 412,7$
Caseína	$2.697 \pm 378,8$
Proteína total do soro lácteo	$1.071 \pm 133,3$
Lactoferrina	$63,95 \pm 28,30$
Albumina de origem plasmática	$70,70 \pm 21,06$
Imunoglobulinas	$132,40 \pm 37,41$
α_1 -antitripsina	$14,92 \pm 9,03$
β -lactoglobulina	$580,52 \pm 95,10$
α -lactoalbumina	$142,33 \pm 28,90$
Outras proteínas do soro lácteo	$63,36 \pm 40,71$

2ª. Conclusão – Demonstrou-se significativa influência de fatores raciais sobre a concentração de proteína total do soro lácteo, e das frações imunoglobulínica, α_1 -antitripsina, β -lactoglobulina e outras proteínas do soro lácteo de vacas saudas em plena lactação.

3ª. Conclusão – Demonstrou-se que, em vacas sadias em plena lactação o número de lactações não influenciou de forma significativa a proteína total e caseína do leite, proteína total do soro lácteo e de suas frações lactoferrina, α_1 -antitripsina e do conjunto formado por outras proteínas do soro lácteo. Todavia, o número de lactações exercia significativa influência nos teores das frações albumina de origem plasmática, das imunoglobulinas, β -lactoglobulina e α -lactoalbumina do soro lácteo.

4ª. Conclusão – A fase da lactação influenciou de forma significativa o proteinograma lácteo de vacas sadias, sendo evidentes as variações observadas na fase colostrar da lactação.

5ª. Conclusão – A celularidade do leite, expressa pelo número de células somáticas influenciou os valores do proteinograma do leite, apenas nas amostras com mais de 1.500.000 células somáticas por mililitro.

6ª. Conclusão – O simples isolamento bacteriano de possíveis germes patogênicos para a glândula mamária, em amostras de leite, sem associação de sintomas evidentes do processo inflamatório não influenciou o quadro protéico do leite.

7ª. Conclusão – Demonstrou-se significativa influência das mamites no proteinograma do leite de vacas, com alterações, representada por aumento dos valores, principalmente, das proteínas não sintetizadas no ciclo fisiológico de secreção da glândula mamária.

REFERÊNCIAS¹

ANDERSON, M.; ANDREWS, A.T. Progressive changes in individual protein concentrations associated with high somatic cell counts. **Journal of Dairy Research**, v.44, n.2, p. 223-235, 1977.

AULDIST, M.J.; COATS, S.; ROGERS, G.L.; McDOWELL, G.H. Changes in the composition of milk from healthy and mastitic dairy cows during the lactation cycle. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.35, n. 4, 427-36, 1995.

BABAJIMOPOULOS, M.; MIKOLAJCIK, E.M. Quantification of selected serum proteins of milk by immunological procedures. **Journal of Dairy Science**, v.60, n.5, p. 721-725, 1977.

BIRGEL, E.H. Avaliação das provas utilizadas no diagnóstico da mamite bovina. In: BIRGEL, E.H.; BENESI, F.J. **Patologia clínica veterinária**. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982, p.177-213.

BIRGEL, E.H. **Doenças da glândula mamária – mamite dos caprinos**. ABEAS – Curso de Especialização por Tutoria à Distância. 46p. Brasília/DF, 1999.

BOBE, G.; BEITZ, D.C.; FREEMAN, A.E.; LINDBERG, G.L. Associations among individual proteins and fatty acids in bovine milk as determined by correlations and factor analyses. **Journal of Dairy Research**, v.66, n.4, p.523-536, 1999.

BROWN, M.H.; BRIGHTMAN, A.H.; FENWICK, B.W.; RIDER, M.A. Identification of lactoferrin in bovine tears. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 9, p. 1369-1372, 1996.

BRUNNER, J.R.; ERNSTROM, C.A.; HOLLIS, R.A.; LARSON, B.L.; WHITNEY, R.M.; ZITTLE, C.A. Nomenclature of the proteins of bovine milk – first revision. **Journal of Dairy Science**, v.43, n.8, p.901-911, 1960.

CAFFIN, J.P.; POUTREL, B. Physiological and pathological factors influencing bovine immunoglobulins G₂ concentration in milk. **Journal of Dairy Science**, v.71, n.8, p. 2035-2043, 1988.

¹ Elaboração segundo ZANI e PESTANA (2003)

CONNER, J.G.; ECKERSALL, P.D.; DOHERTY, M.; DOUGLAS, T.A. Acute phase response and mastitis in the cow. **Research in Veterinary Science**, v.41, n.1, p.126-128, 1986.

ECKERSALL, P.D.; CONNER, J.G. Bovine and canine acute phase proteins. **Veterinary Research Communications**, v.12, n.2, p. 169-178, 1988.

ELSON, E.C. Quantitative determination of serum haptoglobina. **American journal of Clinical Pathology**, v.62, n.2, p.655-663, 1974.

ESTRELLA, S.L.G. **Características físico-químicas e celulares do leite de bovinos da raça holandesa, criados no Estado de São Paulo**. Influência da fase da lactação, dos quartos mamários, do número de lactações e do isolamento bacteriano. 2001. 162 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2001.

FAGLIARI, J.J.; McCLENAHAN, D.; EVANSON, A.; WEISS, D.J. Changes in plasma protein concentrations in ponies with experimentally induced alimentary laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v.59, n.10, p.1234-1237, 1998.

FAGLIARI, J.J.; SILVA, S.L. Hemograma e proteinograma plasmático de eqüinos hígidos e de eqüinos acometidos por abdômen agudo, antes e após laparotomia. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n. 6, p.559-567, 2002.

FERREIRO, L.; SOUZA, H.M.; HEINECK, L.A. A influência da mastite bovina subclínica na composição físico-química do leite do gado mestiço. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.36, n.208, p. 19-24, 1980.

FOLCH, J.M.; DOVC, P.; MEDRANO, J.F. Differential expression of bovine β -lactoglobulin A and B promoter variants in transiently transfected HC11 cells. **Journal of Dairy Research**, v.66, n.4, p.537-544, 1999.

FURMANSKI, P.; LI, Z.P.; FORTUNA, M.B.; SWAMY, C.V., DAS, M.R. Multiple molecular forms of human lactoferrin. Identification of a class of lactoferrins that posses ribonuclease activity and lack iron-binding capacity. **Journal of Experimental Medicine**, v.170, n. 2, p. 415-429, 1989.

GUILDRY, A.J.; OST, B.S.; MATHER, I.H.; SHAINLINE, W.E.; WEINLAND, B.T. Sequential response of milk leukocytes, albumin, immunoglobulins, monovalent ions, citrate, and lactose in cows given infusions of *Escherichia coli* endotoxina into the

mammary gland. **American Journal Veterinary Research**, v.44, n.12, p. 2262-2267, 1983.

HAENLEIN, G.F.W.; SCHULTZ, L.H.; ZIKAKIS, J.P. Composition of proteins in milk with varying leucocyte contents. **Journal of Dairy Science**, v.56, n.8, p.1017-1024, 1973.

HARMON, R.J.; SCHANBACHER, F.L.; FERGUSON, L.C.; LARRY SMITH, K. Concentration of lactoferrina in milk of normal lactating cows and changes occurring during mastitis. **American Journal of Veterinary Research**, v.36, n.7, p. 1001-1007, 1975.

HILLER, R. M. The quantitative measurement of whey proteins using polyacrylamide-gel electrophoresis. **Journal of Dairy Research**, v. 43, n. 2, p.259-265, 1976.

HIRVONEN, J.; PYÖRÄLÄ, S.; JOUSIMIES-SOMER, H. Acute phase response in heifers with experimentally induced mastitis. **Journal of Dairy Research**, v.63, n.1, p.351-360, 1996.

HODAWAY, 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, n.1, p.64-71, 1996.

HONKANEN-BUZALSKI, T. **Protein transfer between blood and milk as a marker of bovine mastitis – with special reference to serum albumin, antitrypsin and secretory immunoglobulins**. 1982. 77 f. Tese. College of Veterinary Medicine, Helsinki, 1982.

HONKANEN-BUZALSKI, T.; SANDHOLM, M. Trypsin-inhibitors in mastitic milk and colostrum: correlation between trypsin-inhibitor capacity, bovine serum albumin and somatic cell contents. **Journal of Dairy Research**, v.48, n.2, p. 213-223, 1981.

KANEKO, J. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 4a. ed. San Diego: Academic Press, 1989. 932 p.

KATO, K.; MORI, K.; KATOH, N. Different protein patterns in normal and mastitic milks as revealed by sodium dodecyl sulfate-poliacrylamida gel eletrophoresis. **Japanese Journal Veterinary Science**, v. 51, n.6, p. 1275-1278, 1989.

KIDDY, C.A. Inherited differences in specific blood and milk proteins in cattle. A review. **Journal of Dairy Science**, v.47, n.5, p.510-515, 1964.

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, n.1, p.167-188, 1981.

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

LARSON, B.L. Biosynthesis and secretion of milk proteins: a review. **Journal of Dairy Research**, v.46, n.2, p.161-174, 1979.

LARSON, B.L.; KENDALL, K.A. Protein production in the bovine daily production of the specific milk proteins during the lactation period. **Journal of Dairy Science**, v.40, n.3, p.377-386, 1957.

LECCE, J.G.; LEGATES, J.E. Changes in the paper electrophoretic whey-protein pattern of cows with acute mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.42, n.5, p. 698-704, 1959.

LENNETE, E.H.; BALOWS, A.; HAUSLER, W.J. **Manual of clinical microbiology**. 4.ed. Washington: American Society of Microbiological, 1985.

LEVIEUX, D.; OLLIER, A. Bovine immunoglobulins G, β -lactoglobulin, α -lactoalbumin and serum albumin in colostrums and milk during the early post partum period. **Journal of Dairy Research**, v.66, n.3, p.421-430, 1999.

MAKIMURA, S.; SUZUKI, N. Quantitative determination of bovine serum haptoglobin and its elevation in some inflammatory diseases. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v.44, n.1, p.15-21, 1982.

MAO, F.C.; BREMEL, R.D. Prediction of milk yields from serum β -lactoglobulin concentrations in pregnant heifers. **Journal of Dairy Science**, v.78, n.2, p. 291-195, 1995.

MARQUES, R.S. **Avaliação das características físico-químicas e celulares do leite de bovinos da raça Girolando criados no Estado de São Paulo**. 2003. 167f. Dissertação (Mestre em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2003.

MATTILA, T.; SANDHOLM, M. Antitrypsin and N-acetyl- β -D-glucosaminidase as markers of mastitis in a herd of Ayshire cows. **American journal of Veterinary Research**, v.46, n.12, p.2453-2456, 1985.

MATTILA, T.; PYÖRÄLÄ, S.; SANDHOLM, M. Comparison of milk antitrypsin, N-acetyl- β -D-glucosaminidase, somatic cells and bacteriological analysis as indicators of bovine subclinical mastitis. **Veterinary Research Communications**, v.10, n.2, p.113-124, 1986.

MAUNSELL, F.P.; MORIN, D.E.; CONSTABLE, P.D.; HURLEY, W.L.; McCOY, G.C.; KAKOMA, I.; ISAACSON, R.E. Effects of mastitis on the volume and composition of colostrum produced by Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.5, p.1291-1299, 1998.

NAIDU, A.S.; ANDERSSON, M.; MIEDZOBRODZKI, J.; FORSGREN, A. Bovine lactoferrin receptors in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.4, p. 1218-1226, 1991.

ÖSTENSSON, 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 veterinary Scandinavian**, v.34, n.1, p. 83-93, 1993.

RAINARD, P. Bacteriostasis of *Escherichia coli* by bovine lactoferrin, transferring and immunoglobulins (IgG1, IgG2, IgGM) acting alone or in combination. **Veterinary Microbiology**, v.11, n.1, p. 103-115, 1986.

RANDOLPH, H.E.; ERWIN, R.E.; RICHTER, R.L. Influence of mastitis on properties of milk. VII. Distribution of milk proteins. **Journal of Dairy Science**, v.57, n.1, p.15-18, 1974.

ROGERS, S.A.; SLATTERY, S.L.; MITCHELL, G.E.; HIRST, P.A.; GRIEVE, P.A. the relationship between somatic cell count, composition and manufacturing properties of bulk milk 3. Individual proteins. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.44, n.2, p. 49-52, 1989.

ROLLERI, G.D.; LARSON, B.L.; TOUCHBERRY, R.W. Protein production in the bovine. Breed and individual variations in the specific protein constituents of milk. **Journal of Dairy Science**, v.39, n.12, p.1683-1689, 1956.

SANT'ANA, V.A.C.; BIRGEL, E.H. Obtenção do soro lácteo para fracionamento das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida. In: XI CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BUIATRIA, V CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA E III CONGRESSO NORDESTINO DE BUIATRIA. **Anais...** Salvador: Associação Brasileira de Buiatria, 2003. p.31.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide: statistics**. Cary, SAS Institute, 1985. 956p.

SCHAAR, J.; FUNKE, H. Effect of subclinical mastitis on milk plasminogen and plasmin compared with that on sodium, antitrypsin and N-acetyl- β -D-glucosaminidase. **Journal of Dairy Research**, v.53, n.4, p.515-528, 1986.

SCHALM, O.W., CARROL, E.J., JAIN, N.C. In: **Bovine mastitis**, 360 p., Philadelphia: Lea and Febiger, 1971.

SCHALM, O.W. Pathologic changes in the milk and udder of cows with mastitis. **Journal of American Veterinary Medicine**, v.70, n.2, p.1137-1140, 1977.

SCHANBACHER, F.L.; LARRY SMITH, K. Formation and role of unusual whey proteins and enzymes: relation to mammary function. **Journal of Dairy Science**, v.58, n.7, p.1048-1062, 1974.

SHELDRAKE, R.F.; MCGREGOR, G.D.; HOARE, R.J.T. Somatic cell count, electrical conductivity, and serum albumin concentration for detecting bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.66, n.3, p.548-555, 1983.

STOKES, K.; TENG, C.; ALSTON-MILLS, B. Estrogen response of the human lactoferrin promoter in mammary gland cells. **Journal of Animal Science**, v.80, supl.1, p. 340, 2002.

SYMONS, D.B.A.; WRIGHT, L.J. Changes in bovine mammary gland permeability after intramammary exotoxin infusion. **Journal of Comparative pathology**, v.84, n.1, p.9-17, 1974.

TOLLE, A. **Mastitis – the disease in relation to control methods**. In: DODD, F.H., GRIFFIN, T.K., KINGWILL, R.G. Proceedings of the IDF seminar on mastitis control. Belgica: International Dairy Federation, 1975. p.1-12.

URECH, E.; PUHAN, Z. Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.11, p. 2402-2411, 1999.

VERDI, R.J.; BARBANO, D.M.; DELLAVALLE, M.E. Variability in true protein, casein, nonprotein nitrogen, and proteolysis in high and low somatic cell milks. **Journal of Dairy Science**, v.70, n.2, p. 230-242, 1987.

WELTY, F.K.; LARRY SMITH, K.; SCHANBACHER, F.L. Lactoferrin concentration during involution of the bovine mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v.59, n.2, p.224-231, 1975.

ZANI, R.M.F.; PESTANA, M.C. (Coord.). **Diretrizes para apresentação de dissertações e teses na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**. 4.ed. 2003. 83 p.

APÊNDICE

Apêndice A – Resultados da avaliação clínica (características físico-químicas) preliminar e proteinograma do soro lácteo das amostras de leite colhidas em todas as vacas incluídas nos grupos experimentais desta pesquisa.

Amostra	Raça	Nlac	Fase	Micro	CL	pH	Eletro	CCS	PT	cas	PTSL	LF	albumina	IG	at	Blac	Alac	outras
1	1	3	3	1	97.63	6.68	4.7	5000	4210	3060	1150	47,61	64,40	137,66	7,82	649,52	149,39	93,61
2	1	3	3	2	108.28	6.72	5.2	520000	4120	3080	1040	68,33	93,39	165,05	20,70	521,56	105,77	65,20
3	1	3	3	1	106.50	6.71	5.1	64000	4170	3060	1110	67,26	58,05	120,00	0,00	607,73	149,18	107,79
4	1	3	3	1	92.30	6.66	4.8	13000	4150	3220	930	30,88	44,08	78,59	0,00	569,07	139,31	68,08
5	1	2	3	2	85.20	6.63	4.7	34000	3630	2710	920	53,27	64,77	130,64	15,27	473,15	112,70	70,19
6	1	2	3	1	81.65	6.63	4.7	22000	3680	2740	940	52,83	58,94	163,56	21,62	456,56	142,97	43,52
7	1	2	3	1	126.03	6.81	5.6	109000	3370	2430	940	70,03	61,01	126,53	9,21	486,16	145,14	41,93
8	1	2	3	1	92.30	6.67	4.4	64000	3610	2660	950	50,45	56,81	129,11	7,22	521,84	140,70	43,89
9	1	1	3	2	69.23	6.68	4.2	47000	3850	2890	960	23,14	46,75	93,02	23,04	589,73	151,10	42,82
10	1	2	2	1	83.43	6.67	4.9	8000	3440	2580	860	45,5	52,80	84,46	21,41	513,16	134,33	0,00
11	1	2	2	1	83.43	6.67	4.9	5000	3430	2520	910	29,22	52,60	127,13	13,10	565,11	126,13	0,00
12	1	2	2	2	83.43	6.68	5.0	72000	3400	2510	890	24,74	45,30	107,69	14,95	565,59	124,42	7,92
13	1	2	2	1	83.43	6.65	4.9	7000	3430	2470	960	15,94	40,99	95,61	14,98	602,02	141,98	49,44
14	1	3	2	1	99.40	6.62	5.0	224000	3930	2810	1120	24,64	61,49	137,99	18,70	696,30	140,78	40,09
15	1	3	2	2	170.40	6.97	6.5	5993000	4240	2790	1450	124,85	129,78	279,42	26,97	636,27	147,03	105,72
16	1	3	2	2	94.08	6.61	4.8	34000	3930	2860	1070	48,36	46,97	97,91	0,00	686,09	170,56	20,12
17	1	2	3	1	83.43	6.64	4.8	11000	3390	2470	920	45,72	66,88	136,99	17,66	496,80	118,40	45,54
18	1	3	3	1	122.48	6.72	5.5	41000	3470	2620	850	47,77	45,99	110,34	5,95	452,80	136,43	48,97
19	1	3	3	1	108.28	6.64	5.2	6000	3540	2680	860	42,31	37,50	105,52	12,81	508,69	114,12	41,97
20	1	2	3	1	104.73	6.65	5.2	92000	4060	2880	1180	64,43	59,12	139,24	3,19	718,62	175,82	20,18
21	1	2	3	1	104.73	6.66	5.2	85000	4080	2940	1140	81,62	72,85	155,61	0,00	641,37	150,59	37,96
22	1	2	3	2	204.13	7.05	7.2	4968000	5020	3430	1590	102,56	222,12	236,11	28,30	669,08	195,25	137,05
23	1	3	4	2	140.23	6.77	5.7	217000	4240	3040	1200	108,84	98,88	147,72	15,84	594,12	161,28	73,44

Raça – 1- Jersey; 2 – Gir; Nlac – número de lactações – 1 – 1ª lactação; 2- 2 ou 3 lactações; 3- 4 ou mais lactações; Fase – Fase da lactação – 1- fase colostrar; 2- fase inicial; 3- fase intermediária e; 4- fase final da lactação; Micro – exame microbiológico: 1-negativo; 2-positivo; CL- cloretos – em mg/dl; Eletro – eletrocondutividade – em mS/cm; CCS – contagem de células somáticas, em número de células/ml; PT – proteína total do leite, em mg/dl; cas – caseína – em mg/dl; PTSL – proteína total do soro lácteo, em mg/dl; LF – lactoferrina, em mg/dl; albumina – albumina de origem plasmática, em mg/dl; IG – fração imunoglobulínica, em mg/dl; at - α 1-antitripsina, em mg/dl; Blac - β -lactoglobulina, em mg/dl; Alac - α -lactoalbumina, em mg/dl; outras – conjunto de demais proteínas do soro lácteo, em mg/dl.

24	1	3	4	2	140.23	6.84	5.7	225000	4210	3020	1190	100,2	104,84	162,80	13,69	619,52	141,37	48,32
25	1	3	4	1	143.78	6.86	5.7	193000	4140	2860	1280	70,27	100,22	159,10	27,90	697,86	155,52	69,12
26	1	3	4	2	118.93	6.76	5.3	224000	4140	2820	1320	113,65	117,61	186,25	28,78	592,42	203,68	77,62
27	1	1	2	1	72.78	6.63	4.7	7000	3580	2600	980	68,2	56,94	112,11	14,21	507,25	165,33	55,95
28	1	1	2	1	67.45	6.60	4.6	23000	3680	2620	1060	76,63	63,60	153,17	24,59	538,27	190,48	13,25
29	1	1	2	1	60.35	6.57	4.5	15000	3610	2670	940	67,86	72,85	161,49	18,80	438,69	155,76	24,53
30	1	1	2	1	67.45	6.59	4.6	27000	3710	2750	960	66,91	69,98	110,50	21,79	499,87	163,97	26,97
31	1	1	3	1	69.23	6.71	4.9	14000	3600	2580	1020	53,14	85,68	123,83	20,09	514,08	171,46	51,71
32	1	1	3	1	71.00	6.73	5.0	16000	3680	2700	980	59,39	93,88	139,16	22,05	432,37	157,58	75,46
33	1	1	3	1	67.45	6.74	4.8	13000	3590	2590	1000	66,5	83,40	162,60	19,20	439,60	169,10	54,60
34	1	1	3	1	69.23	6.74	5.0	20000	3680	2700	980	76,44	92,51	144,26	30,87	409,74	146,90	72,13
35	1	1	1	2	69.23	6.50	4.3	35000	3900	2810	1090	89,6	61,48	141,37	40,44	511,76	194,24	56,57
36	1	1	1	2	83.43	6.55	4.8	612000	3830	2700	1130	100,68	82,94	179,79	34,58	500,26	188,37	44,52
37	1	1	1	2	74.55	6.54	4.4	115000	3740	2660	1080	73	67,93	171,94	29,81	505,55	197,42	35,31
38	1	1	1	1	76.33	6.51	4.5	11000	3810	2590	1220	90,52	84,67	205,69	34,65	600,36	204,11	0,00
39	1	1	2	2	115.38	6.70	5.5	186000	4000	3070	930	60,45	69,29	102,86	21,39	500,53	145,27	25,95
40	1	1	2	2	126.03	6.80	5.8	234000	4120	3210	910	92,28	64,52	81,99	21,48	483,21	119,67	46,86
41	1	1	2	2	115.38	6.72	5.6	257000	4090	3160	930	66,5	70,40	94,77	27,71	493,09	111,51	61,38
42	1	1	2	2	111.83	6.69	5.5	64000	4110	3190	920	53,36	91,08	88,96	28,89	488,43	136,16	28,89
43	1	3	4	2	113.60	6.65	5.0	188000	4530	3260	1270	111,63	94,11	191,01	32,77	583,06	133,10	124,33
44	1	3	4	1	127.80	6.70	5.1	315000	4680	3650	1030	115,98	66,02	186,84	40,38	482,14	89,82	43,78
45	1	3	4	1	127.80	6.63	5.0	89000	4730	3680	1050	129,15	83,37	137,87	22,58	581,07	86,63	19,64
46	1	3	2	2	99.40	6.64	5.0	91000	3950	2890	1060	126,25	89,46	129,11	30,53	525,12	143,10	15,69
47	1	2	3	1	90.53	6.65	4.8	13000	4400	3380	1020	103,12	79,36	113,12	21,52	576,20	91,29	22,54
48	1	2	3	1	94.08	6.65	4.8	22000	4410	3450	960	114,33	88,32	119,52	11,81	497,00	84,67	44,06
49	1	2	3	1	97.63	6.72	4.9	41000	4390	3380	1010	107,97	96,96	120,70	21,21	527,43	75,55	60,20
50	1	3	2	2	122.48	6.71	5.7	507000	3270	2040	1230	81,06	104,67	173,92	23,74	556,58	228,78	59,78
51	1	3	2	1	113.60	6.67	5.6	86000	3190	2130	1060	53,53	82,04	126,99	23,96	573,88	118,19	80,34
52	1	3	2	1	111.83	6.74	5.6	16000	3180	2080	1100	90,2	73,15	149,16	14,85	525,03	168,74	78,87
53	1	3	2	1	118.93	6.77	5.7	68000	3170	2120	1050	89,78	79,49	153,41	16,59	517,97	147,00	45,78
54	1	3	4	2	179.28	6.81	6.4	2551000	4630	3210	1420	129,08	164,72	283,57	34,79	462,63	207,18	138,04
55	1	3	4	2	145.55	6.83	5.7	291000	4390	3160	1230	55,85	72,82	158,79	24,35	580,56	190,40	144,76
56	1	3	4	2	142.00	6.81	5.5	372000	4420	3200	1220	102,61	77,35	188,98	19,40	550,70	210,08	70,03

57	1	3	4	2	149.10	6.81	5.7	418000	4370	3120	1250	102,63	100,38	161,76	20,50	642,51	174,75	47,39
58	1	3	2	1	101.18	6.84	4.8	172000	3830	2710	1120	69,88	105,84	178,86	12,54	575,68	140,56	35,84
59	1	3	2	1	113.60	6.79	5.1	992000	4050	2790	1260	142,5	137,97	204,75	17,26	464,94	146,03	125,37
60	1	3	2	1	102.95	6.78	4.9	189000	3790	2730	1060	61,59	98,58	166,31	14,84	530,42	143,52	42,29
61	1	3	3	1	92.30	6.73	5.3	164000	3820	2800	1020	69,16	66,30	131,58	20,30	547,12	138,62	44,98
62	1	3	3	2	220.10	7.22	8.6	6014000	4100	2820	1280	124,93	219,90	199,68	14,72	532,35	64,13	121,09
63	1	3	3	1	95.85	6.75	5.3	358000	3920	2970	950	45,32	81,89	146,68	9,98	522,70	117,90	21,85
64	1	3	3	1	97.63	6.72	5.3	675000	3840	2600	1240	76,51	86,55	184,01	0,00	630,05	208,20	53,82
65	1	1	2	1	73.49	6.65	5.2	34000	3330	2350	980	42,44	57,13	115,55	0,00	582,31	156,11	25,48
66	1	1	2	1	77.04	6.68	5.1	10000	3410	2480	930	35,72	48,73	121,28	8,84	530,75	159,22	24,27
67	1	1	2	1	86.98	6.75	5.3	115000	3180	2200	980	55,37	50,76	115,54	15,88	531,16	171,50	39,79
68	1	1	2	1	94.08	6.70	5.5	15000	3430	2460	970	35,02	65,38	115,72	14,36	535,93	167,62	34,54
69	1	2	2	1	101.18	6.76	5.2	48000	3350	2360	990	41,78	65,14	105,44	7,03	558,95	171,96	32,27
70	1	2	2	2	308.85	7.55	10.8	3791000	4190	1080	3110	438,83	644,39	595,25	84,90	874,53	201,53	258,76
71	1	2	2	2	86.98	6.73	5.1	80000	3390	2440	950	41,14	64,70	90,73	7,70	530,30	164,83	48,36
72	1	2	2	1	88.75	6.70	5.1	194000	3240	2310	930	55,43	59,52	99,79	17,95	502,76	156,89	35,62
73	1	3	2	1	94.08	6.70	5.6	9000	3020	2130	890	51,17	49,22	100,75	16,55	481,31	153,88	29,19
74	1	3	2	1	94.08	6.67	5.7	5000	3060	2160	900	47,79	60,48	102,42	8,28	494,28	160,29	22,95
75	1	3	2	1	90.53	6.65	5.6	15000	3080	2200	880	44,36	55,88	105,69	10,74	480,75	152,77	15,40
76	1	3	2	1	127.80	6.80	6.3	161000	3020	2110	910	46,41	82,36	94,64	20,66	413,78	177,54	53,51
77	1	3	2	1	134.90	6.89	6.2	236000	3290	2460	830	69,22	65,16	105,99	19,17	375,00	125,00	62,58
78	1	3	2	1	108.28	6.82	5.6	181000	3390	2530	860	54,09	54,27	112,32	20,30	374,27	130,29	75,68
79	1	3	2	1	266.25	7.56	9.0	804000	3290	2310	980	53,51	78,60	127,40	15,39	521,07	131,12	51,05
80	1	3	2	2	95.85	6.79	5.4	46000	3290	2450	840	40,32	52,42	73,25	16,38	430,84	162,54	53,43
81	1	2	4	2	115.38	6.66	5.5	1266000	4220	3310	910	95,64	81,26	61,15	15,47	538,36	83,27	33,49
82	1	2	3	2	113.60	6.67	5.5	556000	4390	3160	1230	153,13	69,99	132,84	28,29	665,43	118,08	60,28
83	1	2	3	1	124.25	6.69	5.9	291000	4420	3230	1190	132,45	57,00	130,19	30,94	683,77	138,75	14,76
84	1	2	3	2	111.83	6.68	5.4	127000	4370	3160	1210	119,31	77,80	122,34	27,47	653,77	163,59	28,56
85	1	2	3	2	106.50	6.65	5.4	84000	4350	3210	1140	99,06	82,65	92,57	23,60	652,31	128,48	58,36
86	2	3	1	1	69.23	6.66	4.5	13000	3750	2630	1120	35,61	42,22	158,81	12,43	627,20	117,82	122,76
87	2	3	1	2	99.40	6.80	5.2	1234000	3620	2650	970	35,99	60,04	148,03	26,09	530,69	92,34	76,33
88	2	3	1	2	99.40	6.82	5.1	981000	3660	2600	1060	33,07	37,31	153,28	14,42	578,23	103,46	140,24
89	2	3	1	1	79.88	6.62	4.6	14000	3640	2680	960	44,83	35,33	152,54	12,67	536,73	118,37	55,87

90	2	3	1	2	126.03	6.52	5.4	5979000	3830	2570	1260	52,54	52,67	333,65	30,87	608,46	103,07	78,50
91	2	3	1	2	113.60	6.53	5.3	2757000	3740	2480	1260	51,03	53,42	335,41	36,16	624,46	96,14	63,13
92	2	3	1	2	111.83	6.49	5.2	2942000	3810	2580	1230	32,84	53,14	340,96	43,91	559,66	110,70	67,41
93	2	1	1	1	94.08	6.24	4.3	205000	5540	2790	2750	53,35	160,33	1005,41	73,70	953,71	176,83	326,16
94	2	1	1	1	99.40	6.26	4.3	3209000	5360	1590	3770	118,76	266,92	1009,99	90,86	1604,13	189,63	478,79
95	2	1	1	1	81.65	6.35	4.2	1986000	4140	1500	2640	147,05	169,49	557,57	76,30	1141,80	213,58	330,52
96	2	1	1	1	76.33	6.35	4.5	1594000	4580	2600	1980	93,65	122,36	509,06	40,19	821,30	177,61	203,74
97	2	1	1	1	285.78	6.68	8.4	4036000	7330	3750	3580	278,88	265,99	1554,79	106,68	842,02	180,79	347,62
98	2	1	1	1	214.78	6.37	6.8	274000	7870	3950	3920	313,2	286,94	1824,76	66,64	864,75	203,45	356,71
99	2	1	1	1	271.58	6.74	7.8	4243000	7560	3840	3720	266,72	315,08	1527,80	82,21	835,89	366,05	319,17
100	2	1	2	2	69.23	6.71	4.4	544000	3800	2680	1120	101,02	80,30	142,46	15,23	545,89	137,20	96,10
101	2	1	2	1	69.23	6.71	4.4	102000	3820	2610	1210	68,85	78,41	144,84	0,00	631,26	145,81	131,77
102	2	1	2	1	63.90	6.68	4.3	11000	3750	2530	1220	89,18	49,53	150,06	0,00	660,27	176,41	93,69
103	2	1	2	1	62.13	6.68	4.3	20000	3660	2480	1180	53,33	75,52	110,69	10,50	619,86	220,90	88,15
104	2	2	4	1	76.33	6.72	4.6	22000	3840	2730	1110	48,73	29,75	76,70	0,00	719,51	152,40	87,37
105	2	2	4	1	71.00	6.74	4.7	27000	3970	2760	1210	46,83	31,34	64,25	0,00	761,09	158,27	143,14
106	2	2	4	1	83.43	6.71	4.8	59000	4000	2830	1170	36,39	34,52	70,67	0,00	802,27	167,19	57,44
107	2	2	4	1	78.10	6.70	4.8	50000	4050	2900	1150	46,35	38,18	54,05	0,00	789,83	154,56	68,79
108	2	1	4	1	63.90	6.75	4.5	4000	3600	2460	1140	49,82	51,53	76,49	11,17	696,66	176,02	71,37
109	2	1	4	2	67.45	6.73	4.3	29000	3820	2630	1190	44,51	65,81	91,15	5,47	709,96	177,43	79,74
110	2	1	4	2	62.13	6.73	4.3	67000	3630	2470	1160	42,11	61,48	89,55	7,19	715,14	172,03	69,71
111	2	1	4	2	60.35	6.73	4.3	147000	3710	2510	1200	37,44	71,40	125,52	8,88	706,32	186,24	58,92
112	2	3	1	1	110.05	6.55	5.3	738000	3740	2530	1210	48,52	34,49	220,10	27,95	675,55	146,65	56,51
113	2	3	1	1	113.60	6.58	5.2	103000	3860	2620	1240	26,04	51,21	243,90	17,36	658,44	147,68	97,97
114	2	3	1	1	88.75	6.51	4.8	64000	3960	2670	1290	23,86	48,12	300,96	16,00	687,96	165,12	46,31
115	2	3	2	2	63.90	6.62	4.6	841000	3150	2030	1120	52,53	73,14	164,86	13,10	603,91	105,06	107,29
116	2	3	2	1	60.35	6.63	4.3	163000	3210	2200	1010	24,04	49,19	159,08	0,00	563,78	127,26	87,68
117	2	3	2	2	56.80	6.63	4.3	444000	3110	2080	1030	18,95	55,72	133,49	15,86	570,82	136,48	98,67
118	2	2	2	2	78.10	6.70	4.7	22000	3360	2130	1230	34,31	51,17	183,51	21,16	699,38	124,23	114,51
119	2	2	2	2	111.83	6.67	5.2	221000	3280	2100	1180	57	64,66	180,31	22,18	600,50	116,47	132,63
120	2	2	2	1	71.00	6.69	4.5	4000	3460	2170	1290	42,57	71,72	162,42	19,35	681,50	170,28	142,55
121	2	2	2	2	88.75	6.71	5.0	63000	3300	2110	1190	54,5	76,28	162,08	25,47	517,05	117,45	231,92
122	2	1	3	2	62.13	6.72	4.4	101000	3830	2490	1340	62,04	117,38	217,62	27,74	581,70	121,40	198,73

123	2	1	3	2	104.73	6.80	4.8	2588000	3950	2680	1270	134,11	157,61	217,55	41,28	437,39	104,90	174,24
124	2	1	3	2	71.00	6.74	4.4	374000	3880	2660	1220	38,8	167,99	224,72	32,57	487,39	112,85	156,40
125	2	1	3	2	95.85	6.77	5.5	2983000	3850	2590	1260	44,73	155,11	261,57	28,98	489,01	104,83	174,01
126	2	1	3	2	95.85	6.59	4.9	94000	4320	3030	1290	64,5	111,20	162,03	20,51	692,86	143,19	95,21
127	2	1	3	2	99.40	6.60	5.0	43000	4180	2920	1260	44,98	92,74	174,38	12,85	733,82	148,18	52,92
128	2	1	3	1	95.85	6.61	4.9	7000	4270	2920	1350	64,26	64,94	150,13	12,02	840,92	114,21	102,35
129	2	1	3	2	71.00	6.65	4.6	3899000	3760	2610	1150	59	76,36	130,87	14,49	651,94	94,19	120,07
130	2	1	3	2	78.10	6.70	4.7	1045000	3740	2560	1180	60,77	60,77	148,92	12,86	723,34	112,93	50,03
131	2	1	3	1	65.68	6.65	4.6	340000	3730	2590	1140	51,42	79,12	111,04	6,95	684,00	105,22	98,04
132	2	1	3	2	76.33	6.65	4.8	794000	3770	2620	1150	78,78	76,25	119,95	10,81	679,20	97,98	87,07
133	2	3	3	2	74.55	6.73	4.6	1792000	3970	2670	1300	73,06	89,96	226,59	20,93	654,03	102,05	142,74
134	2	3	3	2	74.55	6.70	4.5	232000	3920	2680	1240	100,19	80,85	226,05	11,04	568,92	125,24	119,53
135	2	3	3	2	69.23	6.71	4.5	2731000	3970	2710	1260	93,87	122,60	203,74	25,20	593,59	107,23	109,23
136	2	1	4	2	86.98	6.69	4.6	765000	4370	3060	1310	74,41	128,25	207,24	17,16	610,33	161,79	110,44
137	2	1	4	2	81.65	6.69	4.5	350000	4440	3220	1220	65,27	98,33	212,41	7,81	656,85	120,41	58,07
138	2	1	4	2	113.60	6.80	5.3	1912000	4390	3150	1240	102,67	131,69	197,16	20,09	547,58	115,57	124,00
139	2	1	4	2	88.75	6.58	4.5	464000	4420	3200	1220	53,68	92,60	188,36	10,00	670,87	146,77	51,61

ANEXOS

Anexo A – Fórmulas e preparo dos reagentes utilizados na execução da eletroforese em gel de poliacrilamida

Para a realização da eletroforese do soro lácteo em gel de poliacrilamida foram utilizados vários reativos que deveriam ser adrede preparados. A relação e preparo dos reativos foram descritos a seguir.

1) Solução triz base 2M/ glicina 1M e pH 9.0

Glicina para eletroforese (PM: 75,07).....	7,5 g
Trizma base (PM: 121,1).....	24,2 g
Água bidestilada...qsp.....	100 ml

2) Solução de acrilamida a 40%

Acrilamida para eletroforese (PM: 71,08).....	40,0 g
Água bidestilada...qsp.....	100ml

3) Solução bis-acrilamida a 2%

N,N-metileno-bis-acrilamida para eletroforese	2 g
Água bidestilada...qsp.....	100 ml

4) Solução de EDTA 0,5M - pH 8.3

Ácido tetracético tetrassódico (PM: 380,20).....	9,5 g
Água bidestilada.....qsp.....	50 ml

5) Solução de lauril sulfato de sódio (SDS) a 20%

Lauril sulfato de sódio (PM: 288,4).....	20 g
--	------

Água bidestilada..... 100 ml

6) Solução triz-fosfato 0,5 M - pH 6.7

Trizma-fosfato (PM: 219,1).....5,5 g

Água bidestilada.....qsp..... 50 ml

7) Solução triz-fosfato 0,5 M - pH 7.4

Trizma-fosfato (PM: 219,1).....5,5 g

Água bidestilada.....qsp..... 50 ml

8) Coomassie blue (Brilliant blue R)

Metanol.....250 ml

Ácido acético.....50 ml

Água bidestilada..... 200 ml

Coomassie bleu (Brilliant blue R).....1,250 g

9) Solução tampão para cuba superior – solução estoque – pH 8.5

Triz-base.....36,3 g

Glicina.....112,5 g

Lauril sulfato de sódio (SDS) 10 g

Água bidestilada.....qsp..... 1 l

10) Solução tampão para cuba inferior – solução estoque – pH 8.5

Triz-base.....18,5 g

Glicina.....56,25 g

Lauril sulfato de sódio (SDS) 10 g

Água bidestilada...qsp..... 1 l

11) Solução de persulfato de amônia a 10%

Persulfato de amônia.....0,10 g
Água bidestilada..... 1 ml

12) Gel mix

Lauril sulfato de sódio 20% 2 ml
EDTA 0,5 M..... 2 ml
Triz-fosfato 0,5 M, pH 7,4..... 4 ml
Mercaptoetanol..... 5 ml
Glicerol..... 5 ml
Água bidestilada..... 2 ml
Azul de bromofenol ..pa.....homogeinizando até obter a solução de
cor azul escuro para corar azul escuro.

Anexo B - Procedimentos preliminares para realização da eletroforese

Para o desenvolvimento da eletroforese em gel de poliacrilamida utilizaram-se dois tipos de gel, um denominado de **gel separador** e um outro, de **gel de aplicação**, cujas preparações é detalhada a seguir.

1) Preparação do gel de separação

Obtido pela solução dos seguintes ingredientes.

- 15 ml de água destilada;
- 3,0 ml da solução tris/1M glicina - pH 9.0;
- 7,5 ml da solução acrilamida a 40%;
- 1,5 ml da solução bis-acrilamida a 2%;
- 1,5 ml de glicerol p.a.;
- 0,6 ml da solução EDTA 0,5M, pH 8.3;
- 0,6 ml da solução lauril sulfato de sódio a 20%;
- 20 microlitros de TEMED;
- 0,5 ml de solução de persulfato de amônia a 10%.

2) Preparação do gel de aplicação

O gel de aplicação é obtido pela solução dos seguintes ingredientes.

- 5,3 ml de água destilada;
- 1,4 ml da solução tris-fosfato 0,5 M - pH 6.7;
- 1,0 ml da solução de acrilamida a 40%;
- 1,3 ml da solução de bis-acrilamida a 2%;
- 0,5 ml de glicerol p.a.;
- 0,2 ml da solução de EDTA 0,5 M - pH 8.3;
- 0,2 ml da solução de lauril sulfato de sódio a 20%;
- 25 microlitros de TEMED;
- 0,15 ml da solução de persulfato de amônia a 10%.

- Preenchimento das placas:

As placas de vidro, previamente limpas, desengorduradas e montadas em posição vertical, foram preenchidas primeiro com o gel de separação (13) até a altura correspondente ao tamanho do pente. Após um período de aproximadamente 45 minutos, em que deveria ocorrer a solidificação do gel, procede-se preenchendo a placa com o gel de aplicação (14), procedendo-se então a colocação do pente. Decorridos cerca de 45 minutos retiram-se os espaçadores, o pente e as presilhas das placas. Adapta-se a referida placa na cuba própria para a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida. A seguir, as cubas foram preenchidas com as soluções tampão, tanto a para cuba superior (9), como a inferior (10).

- Padrões de proteína purificada e de peso molecular

Para perfeita identificação das frações protéicas do soro lácteo, foram utilizados como padrões de comparação de proteínas de baixo peso molecular (6.500 – 66.000 kDa) e as a seguir mencionadas proteínas purificadas da marca Sigma : β -lactoglobulina, imunoglobulina bovina e α_1 -antitripsina.

- Preparação das amostras e corrida eletroforética:

As amostras eram preparadas de forma que para cada 10 microlitros de soro lácteo sejam acrescentados 40 microlitros de soro fetal bovino e 10 microlitros de gel mix (12). Após a aplicação de cinco microlitros da amostra nos poços de aplicação,

conecta-se a cuba à fonte de energia, submetendo o sistema, inicialmente a uma corrente de 30 miliamperes e, após a passagem das amostras para o gel separador, aumenta-se a corrente elétrica para 50 miliamperes.

Terminada a corrida, que pode durar cerca de seis horas, na dependência do material ou amostras que estão sendo utilizadas, cora-se o gel, mergulhando-o no corante em Coomassie Blue, durante 10 minutos; o excesso de corante é retirado com ácido acético a 7%. Finalmente, as leituras das frações foram feitas em densitômetro utilizando análise em programa para computador MultiAnalyst – Marca Bio-Rad.