

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE ENGENHARIAS, CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

THAIS FATIMA FERREIRA NEVES

ESTABILIDADE DO LEITE: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E
PARÂMETROS DE DESEMPENHO DE REBANHOS ESPECIALIZADOS DAS RAÇAS
HOLANDESA E JERSEY

PONTA GROSSA

2021

THAIS FATIMA FERREIRA NEVES

ESTABILIDADE DO LEITE: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E
PARÂMETROS DE DESEMPENHO DE REBANHOS ESPECIALIZADOS DAS RAÇAS
HOLANDESA E JERSEY

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Zootecnia, Área de Produção Animal, pela Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Adriana de Souza Martins.
Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vivian Fischer.

PONTA GROSSA

2021

N518 Neves, Thais Fatima Ferreira
Estabilidade do leite: características físico-químicas e parâmetros de desempenho de rebanhos especializados das raças Holandesa e Jersey / Thais Fatima Ferreira Neves. Ponta Grossa, 2021.

81 f.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia - Área de Concentração: Produção Animal), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana de Souza Martins.

Coorientadora: Profa. Dra. Vivian Fischer.

1. Cálcio iônico. 2. Contagem de células somáticas. 3. Estabilidade do leite. 4. Qualidade do leite. 5. Leite instável. I. Martins, Adriana de Souza. II. Fischer, Vivian. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Produção Animal. IV.T.

CDD: 636



TERMO DE APROVAÇÃO

Thais Fatima Ferreira Neve

“ESTABILIDADE DO LEITE: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E PARÂMETROS DE DESEMPENHO DE REBANHOS ESPECIALIZADOS DAS RAÇAS HOLANDESA E JERSEY.”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Zootecnia – Mestrado em Zootecnia, Setor de Ciências Agrárias e Tecnologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Ponta Grossa, 26 de agosto de 2021.

Prof. Dra. Adriana de Souza Martins – (UEPG) – Presidente

Prof. Dr. Rodrigo de Almeida – (UFPR)

Prof. Dr. José Ricardo Alves Pereira – (UEPG)

Dedico aos meus pais, Dirlei e Valter, meu namorado Leonardo, minha irmã Bianca, minha
vovó Tereza, e pessoas especiais.

AGRADECIMENTOS

À Deus primeiramente, pela minha existência e força.

Aos meus queridos pais, Dirlei e Valter, por todo apoio, incentivo e esforço, para me proporcionar os melhores estudos.

Ao meu namorado Leonardo, por todo amor, apoio, e palavras de encorajamento em momentos tão decisivos e difíceis.

À minha orientadora professora Dr. Adriana de Souza Martins, pela orientação, amizade, palavras de estímulo, conhecimentos compartilhados, que não mediu esforços para que a pesquisa fosse realizada.

À minha irmã Bianca, pelo constante apoio, incentivo e risadas.

À minha tia Terezinha Rosilei e tio Edgar Delfino (*in memoriam*), pela sua ajuda, apoio para conquistar o sonho de estudar em uma universidade.

Aos meus avós, pelo apoio e ensinamentos durante toda a minha vida.

À minha co-orientadora professora Dr. Vivian Fisher, por toda ajuda e conhecimentos compartilhados durante toda a realização da pesquisa.

À equipe de laboratório, Paula, Dayane, Mozart, Bárbara, Fernanda, prof. Jéssica, e demais colegas, por toda ajuda nos dias de coleta e análises realizadas no laboratório.

À técnica de laboratório Denise, por toda ajuda na elaboração das soluções utilizadas na pesquisa.

Aos proprietários das duas propriedades, pelo apoio na realização da pesquisa.

Ao técnico da cooperativa Frísia, Solano, por todo suporte e conhecimentos compartilhados.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização dessa pesquisa.

MUITO OBRIGADA!!

“O sucesso é a soma de pequenos
esforços repetidos dia após dia.”
(Robert Collier)

RESUMO

A estabilidade do leite durante o processamento térmico é uma questão importante para as indústrias de laticínios, principalmente na fabricação de produtos que são submetidos a aquecimento sob elevadas temperaturas. O objetivo da pesquisa foi avaliar a estabilidade do leite ao etanol e sua relação com as características físico-químicas do leite e com os parâmetros de desempenho de rebanhos especializados das raças Holandesa e Jersey, em propriedades com elevado grau de tecnificação. Foram utilizados 63 animais da raça Holandesa e 71 animais da raça Jersey. A colheita das amostras foi feita quinzenalmente, sem adição de conservantes. No laboratório, as amostras foram armazenadas sob refrigeração à 4°C durante 11 horas. As amostras foram submetidas a análises de acidez titulável, prova do etanol, concentração de cálcio iônico, crioscopia e análises químicas do leite (proteína, gordura, lactose, sólidos totais e contagem de células somáticas). Também foram realizadas avaliação de escore de condição corporal e do escore de células somáticas. Os dados foram classificados por raça e as análises estatísticas foram realizadas separadamente. As análises descritivas, correlações e associação linear foram realizadas pelo programa estatístico SAS[®]. Para determinar a associação das variáveis foi realizada a análise multivariada, mais especificamente a análise de fatores principais. As regressões logísticas foram calculadas para determinar quais as características originais e quais fatores principais aumentaram o risco de ocorrência de LINA, usando o programa estatístico SAS[®]. A estabilidade do leite de animais especializados das raças Holandesa e Jersey foi considerada alta, com grande proporção de amostras de leite estáveis em etanol acima de 80% v/v. Apenas 20% das amostras de ambas as raças foram consideradas LINA. A composição do leite dos rebanhos não foi afetada pelo nível de estabilidade, porém, o maior número de partos e dias em leite avançado tiveram maior impacto na ocorrência de instabilidade do leite na raça Holandesa e o maior teor de sólidos totais tiveram maior impacto na raça Jersey. Na raça Holandesa, o DEL avançado e a CCS, interferiram negativamente nos teores de lactose e na estabilidade do leite. O ECC não foi correlacionado significativamente com a estabilidade nas duas raças. A acidez apresentou associação com a instabilidade na raça Holandesa. No entanto, na raça Jersey essa associação não foi observada devido à presença de maior acidez natural do leite. A raça Holandesa apresentou maior percentual de amostras de leite de alta estabilidade em relação a raça Jersey, indicando que a acidez não foi um fator causador do menor percentual de amostras estáveis. As raças Holandesa e Jersey apresentaram forte associação de Ca²⁺ com a estabilidade. O Ca²⁺ foi considerado o principal fator associado à instabilidade do leite em ambas as raças, demonstrando que este é um importante parâmetro na avaliação da estabilidade.

Palavras-chave: Cálcio iônico; contagem de células somáticas; estabilidade do leite; qualidade de leite; leite instável.

ABSTRACT

The stability of milk during thermal processing is an important issue for dairy industries, especially in the manufacture of products that undergo heating at high temperatures. The objective of research was to evaluate the stability of milk to ethanol and its relationship with the physicochemical characteristics of the milk and with the performance parameters of specialized herds of Holstein and Jersey breeds, in farms with a high degree of technification. Were used 63 animals of the Holstein breed and 71 animals of the Jersey breed. Samples were collected every two weeks, without the addition of preservatives. In the laboratory, the samples were stored under refrigeration at 4°C for 11 hours. The samples were subjected to analysis of titratable acidity, ethanol testing, ionic calcium concentration, cryoscopy and chemical analysis of milk (protein, fat, lactose, total solids and somatic cell count). Were also performed analysis of body condition score and somatic cell score. Data were classified by breed and statistical analyzes were performed separately. Descriptive analysis, correlations and linear association were performed using the SAS® statistical program. To determine the association of variables, a multivariate analysis was performed, more specifically the analysis of main factors. Logistic regressions were calculated to determine which original characteristics and which main factors increased the risk of occurrence of LINA, using the SAS® statistical program. The stability of milk from specialized Holstein and Jersey breed animals was considered high, with a large proportion of milk samples stable in ethanol above 80% v/v. Only 20% of samples from both breed were considered LINA. The composition of the milk of the herds was not affected by the stability level, however, the greater number of deliveries and days in advanced milk had a greater impact on the occurrence of milk instability in the Holstein breed and the higher total solids content had a greater impact on the Jersey breed. In the Holstein breed, advanced SLI and CCS negatively interfered with lactose content and milk stability. ECC was not significantly correlated with stability in the two breeds. Acidity was associated with instability in the Holstein breed. However, in the Jersey breed this association was not observed due to the presence of higher natural acidity in the milk. The Holstein breed had a higher percentage of high stability milk samples compared to the Jersey breed, indicating that acidity was not a factor causing the lowest percentage of stable samples. Holstein and Jersey breeds showed a strong association of Ca²⁺ with stability. Ca²⁺ was considered the main factor associated with milk instability in both breeds, demonstrating that this is an important parameter in the assessment of stability.

Keywords: Ionic calcium; somatic cell count; milk stability; milk quality; instable milk.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Gráfico de escore associando as variáveis retidas no fator principal 3 na análise fatorial da raça Holandesa.....	63
Gráfico 2 – Gráfico de escore associando as variáveis retidas no fator principal 3 na análise fatorial da raça Jersey.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química da dieta das vacas em lactação.....	51
Tabela 2 – Composição química das dietas dos lotes de alta produção de leite (acima de 28 L/vaca/dia) e de média produção de leite (abaixo de 18 L/vaca/dia) das vacas da raça Jersey.....	52
Tabela 3 – Escore linear e a contagem de células somáticas.....	56
Tabela 4 – Análise descritiva dos índices reprodutivos, do escore de condição corporal e das características físico-químicas do leite de vacas da raça Holandesa.....	58
Tabela 5 – Frequência amostral dos teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST), contagem de células somáticas (CCS), estabilidade ao etanol (EST), acidez, crioscopia (CRIO) de amostras de leite de vacas da raça Holandesa e níveis recomendados pela IN 76/77.....	59
Tabela 6 – Valores médios das variáveis número de partos (NPARTOS), produção de leite (PL), dias em leite (DEL), escore de condição corporal (ECC), gordura; proteína; lactose, sólidos totais (ST), escore de células somáticas (ECS), estabilidade ao etanol (EST), cálcio iônico (CA _i), acidez titulável e crioscopia (CRIO) de amostras de leite de vacas da raça Holandesa em função do nível de estabilidade (alta, intermediária e baixa)	61
Tabela 7 – Níveis de correlação entre as variáveis número de partos (NPARTOS), dias em leite (DEL), sólidos totais (ST), contagem de células somáticas (CCS), escore de condição corporal (ECC), estabilidade ao etanol (EST), cálcio iônico (CA _i), acidez e crioscopia (CRIO) de amostras de leite de vacas da raça Holandesa.....	62
Tabela 8 – Cargas fatoriais, comunalidade e percentual de variância das variáveis utilizadas para a análise fatorial que relaciona a ocorrência de instabilidade no leite de vacas da raça Holandesa.....	63
Tabela 9 – Análise de regressão logística relacionando as variáveis retidas na análise fatorial e as variáveis originais na ocorrência de instabilidade do leite em vacas da raça Holandesa.....	64

Tabela 10 – Análise descritiva dos índices reprodutivos, da produção de leite, escore de condição corporal e características físico-químicas do leite de vacas da raça Jersey.....	65
Tabela 11 – Frequência amostral dos teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST), contagem de células somáticas (CCS), estabilidade ao etanol (EST), acidez, crioscopia (CRIO) de amostras de leite de vacas da raça Jersey e níveis recomendados pela IN 76/77.....	66
Tabela 12 – Valores médios das variáveis número de partos (NPARTOS), produção de leite (PL), dias em leite (DEL), escore de condição corporal (ECC), gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST), escore de células somáticas (ECS), estabilidade ao etanol (EST), cálcio iônico (CA _i), acidez titulável e crioscopia (CRIO) de amostras de leite de vacas da raça Jersey em função do nível de estabilidade (alta, intermediária e baixa).....	67
Tabela 13 – Níveis de correlação entre as variáveis número de partos (NPARTOS), dias em leite (DEL), sólidos totais (ST), contagem de células somáticas (CCS), escore de condição corporal (ECC), estabilidade ao etanol (EST), cálcio iônico (CA _i), acidez e crioscopia (CRIO) de amostras de leite de vacas da raça Jersey.....	68
Tabela 14 – Cargas fatoriais, comunalidade e percentual de variância das variáveis originais utilizadas para a análise fatorial que relaciona a ocorrência de instabilidade no leite de vacas da raça Jersey.....	69
Tabela 15 – Análise de regressão logística relacionando as variáveis retidas na análise fatorial e as variáveis originais na ocorrência de instabilidade do leite em vacas da raça Jersey.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACIDEZ	Acidez titulável
ALA	α -lactoalbumina
APCBRH	Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa
BLG	β -lactoglobulina
BSA	Albumina do soro bovino
CA _I	Concentração de cálcio iônico
CBT	Contagem bacteriana total
CCS	Contagem de células somáticas
CMETL	Centro Mesorregional de Excelência em Tecnologia do Leite
CRIO	Índice crioscópico
CPP	Contagem padrão em placas
CV	Coefficiente de variação
DEL	Dias em leite
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECC	Escore de condição corporal
ECS	Escore de células somáticas
EE	Extrato etéreo
EST	Estabilidade ao etanol
FB	Fibra bruta
FDA	Fibra insolúvel em detergente ácido
FDN	Fibra insolúvel em detergente neutro
FP	Fatores principais
GM	Glândula mamária
GMP	Glicomacropéptídeos
Ig	Imunoglobulinas
IN	Instrução Normativa
LAC	Lactose
LINA	Leite instável não ácido
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
MS	Matéria seca
NPARTOS	Número de partos
PB	Proteína bruta

pH	Potencial hidrogeniônico
PL	Produção de leite
PNMQL	Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite
ST	Sólidos totais
UHT	<i>Ultra High Temperature</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
Ca	Cálcio
Ca^{2+}	Cálcio iônico
Cu	Cobre
Cl	Cloro
CO_2	Dióxido de carbono
S	Enxofre
γ	Gama
H^+	Íon hidrogênio
I	Iodo
κ	Kappa
Mg	Magnésio
K	Potássio
Na	Sódio
Zn	Zinco

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - FATORES RELACIONADOS COM A PRODUÇÃO E QUALIDADE DO LEITE.....	16
1.1 PANORAMA MUNDIAL DA PRODUÇÃO DE LEITE	16
1.2 LEITE	17
1.2.1 <i>Composição</i>	18
1.2.2 <i>Gordura</i>	18
1.2.3 <i>Proteína</i>	19
1.2.3.1 Caseínas.....	20
1.2.3.2 Proteínas do soro	21
1.2.4 <i>Lactose</i>	21
1.2.5 <i>Minerais</i>	22
1.2.5.1 Citratos	22
1.2.5.2 Cálcio.....	22
1.2.5.3 Fosfatos.....	23
1.2.6 <i>Vitaminas</i>	23
1.3 QUALIDADE DE LEITE	24
1.4 FATORES QUE INTERFEREM NA ESTABILIDADE DO LEITE	25
1.4.1 <i>Concentração de etanol e pH do leite</i>	26
1.4.2 <i>Temperatura da amostra de leite</i>	26
1.4.3 <i>Desestabilização da micela de caseína</i>	27
1.4.4 <i>Restrição nutricional ou alimentar</i>	26
1.4.5 <i>Composição nutricional da dieta</i>	26
1.4.6 <i>Raça</i>	29
1.4.7 <i>Estádio de lactação</i>	30
1.4.8 <i>Concentração de cálcio iônico</i>	31
1.4.9 <i>Sanidade</i>	31
1.4.9.1 Mastite	32
1.4.9.2 Acidose metabólica	32
1.4.10 <i>Instalações e estresse térmico</i>	33
1.4.11 <i>Tempo de coleta após a ordenha</i>	33

1.4.12 Tempo entre a coleta e a análise de leite	33
1.5 LIMITAÇÕES DO USO DE LEITE INSTÁVEL	34
1.6 BENEFÍCIOS DO USO DE LEITE INSTÁVEL	35
REFERÊNCIAS	36

CAPÍTULO 2 - ESTABILIDADE DO LEITE: ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE DE REBANHOS ESPECIALIZADOS DAS RAÇAS HOLANDESA E JERSEY	47
2.1 INTRODUÇÃO.....	47
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
2.2.1 Descrição do rebanho da raça Holandesa – Sistema de confinamento Tie-stall	50
2.2.2 Descrição do rebanho da raça Jersey – Sistema de confinamento Compost barn.....	51
2.2.3 Colheita das amostras de leite.....	52
2.2.4 Análises laboratoriais	53
2.2.4.1 Acidez titulável.....	32
2.2.4.2 Prova do etanol.....	532
2.2.4.3 Concentração de cálcio iônico.....	54
2.2.4.4 Crioscopia.....	54
2.2.4.5 Análises físico-químicas do leite.....	55
2.2.5 Avaliação de escore de condição corporal	55
2.2.6 Avaliação de escore de células somáticas.....	55
2.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	56
2.4 RESULTADOS	57
2.4.1 Raça Holandesa.....	57
2.4.2 Raça Jersey.....	64
2.5 DISCUSSÃO	70
2.6 CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS	76

CAPÍTULO 1 - FATORES RELACIONADOS COM A PRODUÇÃO E QUALIDADE DO LEITE

1.1 PANORAMA MUNDIAL DA PRODUÇÃO DE LEITE

Atualmente, cerca de 532,3 milhões de toneladas de leite são produzidas por ano no mundo, sendo a União Europeia, Estados Unidos, Índia, China, Rússia e o Brasil, os países com maior expressividade na produção de leite mundial. Já no panorama nacional, a produção de leite tem lugar de destaque no agronegócio nacional, com produção de 34,84 bilhões de litros de leite, com Minas Gerais detendo participação de 27,11%, seguido do Paraná e Rio Grande do Sul, com 12,45% e 12,26%, respectivamente, concentrando quase 70% do total da produção nacional (EMBRAPA, 2021).

A região Sul tem destaque na produção de leite nacional, obtendo um volume de 11,65 bilhões de litros, distribuídos entre os três estados: 37,24% no Paraná, 36,65% no Rio Grande do Sul e 26,09% em Santa Catarina. O estado do Paraná ocupa a segunda posição no *ranking* de produção de leite do país, contribuindo com cerca de 4,3 bilhões de litros na produção nacional (EMBRAPA, 2021). Neste cenário, destaca-se a região dos Campos Gerais, sendo os municípios de Carambeí, Castro e Arapoti, os que apresentam a maior contribuição para produção leiteira (IBGE, 2018), com animais selecionados geneticamente e instalações altamente tecnificadas, que intensificam a produção leiteira dos rebanhos.

Contudo, considerando a produtividade como um indicador de desenvolvimento da atividade leiteira, o Brasil, embora seja um dos maiores produtores mundiais, apresenta índices de produtividade menores que outros países, sendo inferiores a 3 mil kg de leite/vaca/ano, com um rebanho de 16,4 milhões de vacas ordenhadas (FAO, 2019). Esse cenário mostra um déficit no desenvolvimento do país, com relação a produtividade dos animais quando comparado ao maior produtor mundial, os Estados Unidos, com 9.900 kg de leite/vaca/ano e com cerca de 1,80 milhões de cabeças (EMBRAPA, 2018).

Apesar de ser um dos alimentos mais consumidos no mundo, o consumo de leite varia consideravelmente entre países. O Brasil apresentou no ano de 2018 um consumo *per capita* de 175 kg/hab/ano, valor considerado baixo comparado ao de países desenvolvidos como Nova Zelândia, Austrália e países da União Europeia que apresentam um consumo *per capita* de aproximadamente 300kg/hab/ano (SIQUEIRA, 2019). No entanto, o consumo de

leite no Brasil está de acordo com o valor recomendado por vários países no mundo, algo em torno de 480 - 500mL de leite por dia (FAO, 2013).

1.2 LEITE

O leite é obtido sem outras especificações, de uma ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas, descrito no Regulamento na Inspeção Industrial e Sanitária de Origem Animal (RIISPOA) (BRASIL, 2017). Desta forma, é considerado o mais nobre dos alimentos, devido a sua composição rica em proteína, gordura, carboidratos, sais minerais e vitaminas, que proporcionam nutrientes essenciais para o crescimento dos mamíferos (MULLER, 2002).

O leite e seus derivados estão entre os alimentos mais consumidos mundialmente, em função de ser altamente nutritivo e essencial na nutrição humana (MOURA *et al.* 2017) e apresenta inúmeros benefícios para a saúde humana (ORLANDINI; TORTELLY NETO, 2020). O consumo de derivados lácteos em estudos com o aumento da concentração proteica pode causar diminuição na taxa de glicose no sangue pós-prandial e a supressão do apetite pós almoço, que são associados a anormalidades da glicemia de pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 (KUNG *et al.* 2018).

O leite e seus derivados são considerados as principais fontes de cálcio para o consumo humano. O cálcio possui várias funções no organismo humano, entre elas estão a formação e manutenção de ossos e dentes, regula os batimentos cardíacos, participa da atividade de algumas enzimas, atua no ajuste do balanço de íons cálcio, sódio, cloro e magnésio, entre outras (PHILIPPI, 2014).

Pessoas que possuem intolerância a lactose tem um consumo menor de derivados e leite e conseqüentemente de cálcio (Ca). O baixo consumo de Ca possivelmente ocasionou uma redução da densidade mineral óssea no colo de fêmur e fêmur total nos indivíduos com intolerância a lactose, predispondo à osteopenia e à osteoporose (SALOMÃO *et al.* 2012). Pesquisas recentes têm constatado inúmeros benefícios do leite para a saúde e nutrição humana. Hynes (2018), em um estudo sobre distúrbios do sono associados ao consumo de leite, observou propriedades anti-inflamatórias no leite associadas a forma menos grave de apneia do sono.

De acordo com uma pesquisa conduzida por Kung *et al.* (2018), verificou-se redução nas concentrações de glicose sanguínea com o consumo de leite, evidenciando seu

efeito no controle de doenças como obesidade e diabetes. De acordo com uma meta-análise feita por Nieman; Anderson; Cifelli (2020), onde avaliaram os efeitos do consumo de produtos lácteos ou ingestão da proteína láctea em marcadores para inflamações, observaram que o consumo de produtos lácteos (leite, queijo e iogurte) tem efeitos benéficos em adultos com sobrepeso/obesidade, causando diminuição do colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL), diminuição da pressão sanguínea e do risco de doenças cardiovasculares.

1.2.1 Composição

O leite é uma combinação de inúmeros elementos, apresentando em geral 88% de água, 3,2 g/100g de proteína, 3,4 g/100g de gordura, 4,7 g/100g de lactose e 0,72 g/100g de minerais (WATTIAUX, 2008). É um produto complexo e apresenta mais de 100 substâncias que estão em suspensão, solução ou emulsão em água (WATTIAUX, 2008). Os principais elementos sólidos presentes no leite são proteínas, lipídios, carboidratos, sais minerais e vitaminas, que permanecem em equilíbrio de modo que a relação entre eles é muito estável (ANTUNES, 2003).

A composição apresenta variações principalmente com relação a raça, alimentação, sanidade do rebanho, instalações, estágio de lactação e intervalo de ordenhas (WATTIAUX, 2008).

1.2.2 Gordura

A gordura do leite é o componente com maior variação percentual, de 3 a 6%, dependendo da raça, época do ano, alimentação, região e período de lactação dos animais. É composta por um grupo diversificado de moléculas orgânicas apolares (insolúveis em água), formadas a partir de ácidos graxos (-COOH) e álcool (-OH) (NELSON; COX, 2014).

A gordura é sintetizada pelas células epiteliais mamárias que formam os alvéolos, a partir de substâncias extraídas do sangue (35 - 75%) e uma fração que é obtida pela síntese de novo dentro do citoplasma das células epiteliais mamárias (GONZÁLEZ; SILVA, 2017). Em seguida, a gordura é secretada na forma de glóbulos graxos, compostos principalmente de triglicerídeos cercados de uma dupla camada lipídica, semelhante à membrana apical das células epiteliais (DURR; FONTANELI; MORO, 2001). Os precursores usados para a síntese de gordura são a glicose, acetato, β -hidroxibutirato e triglicerídeos, sendo parte dos ácidos

graxos usados para sintetizar os triglicerídeos provenientes de lipídios do sangue e da síntese de novo. Os precursores de gordura são absorvidos no intestino ou mobilizados das reservas corporais dos animais (GONZÁLEZ; SILVA, 2017). Porém, os lipídeos que são disponibilizados na dieta para a síntese de precursores para a produção da gordura no leite, são modificados no ambiente ruminal através de um processo de saturação, mais conhecido como lipólise e biohidrogenação (OLIVEIRA; SIMAS; SANTOS, 2004).

A biohidrogenação consiste na adição de um íon hidrogênio (H⁺) em uma dupla ligação dos ácidos graxos insaturados, resultando em ácidos graxos saturados. Em geral, a maior parte dos ácidos graxos insaturados que têm 18 carbonos (18:1, 18:2 e 18:3, respectivamente, oleico, linoleico e linolênico) ou 16 carbonos (16:1, o palmitoleico) serão convertidos a ácido esteárico (18:0) e palmítico (16:0). O processo de biohidrogenação não é eficaz para todos os ácidos graxos insaturados, e alguns deles conseguem alcançar o duodeno e são absorvidos, como por exemplo, o ácido linoleico, linolênico e produtos intermediários tais como ácidos linoleico conjugados e ácido *trans*-vacênico (*trans*-11 C18:1) (HOLANDA; HOLANDA; MENDONÇA JUNIOR, 2011).

Em consequência do processo de biohidrogenação que ocorre no ambiente ruminal, a gordura presente no leite apresenta altas concentrações de ácidos graxos saturados (EIFERT *et al.* 2006). A gordura do leite apresenta vários compostos benéficos à saúde (EIFERT *et al.* 2006) que são decorrentes principalmente do perfil de ácidos graxos insaturados, sendo o oleico (C18:1 *cis*-9) e os isômeros do ácido linoleico conjugado (CLA), associados com à redução do colesterol e efeitos anticarcinogênicos, respectivamente (HAUG; HØSTMARK; HARSTAD, 2007).

O ácido linoleico conjugado é considerado um dos ácidos graxos insaturados mais importantes estudados atualmente. Ele é proveniente da biohidrogenação dos ácidos linoleico e linolênico no rúmen, tendo propriedades anticarcinogênicas, hipocolesterolêmica, controle da obesidade e auxilia na modulação do sistema imune (HOLANDA; HOLANDA; MENDONÇA JUNIOR, 2011).

1.2.3 Proteína

O leite de vaca apresenta cerca de 3,2 a 3,5% de proteína total, constituídas por compostos nitrogenados, dentre os quais 95% ocorrem como proteínas e 5% como compostos nitrogenados não proteicos (TRONCO, 2010). A proteína possui função natural de fornecer

aos mamíferos, aminoácidos essenciais necessários para o seu desenvolvimento e demonstra importância fundamental nas características de muitos derivados lácteos, pois é o fator determinante no rendimento na fabricação de queijos, iogurtes e outros derivados lácteos (YE, 2011).

As proteínas do leite são subdivididas em 2 grupos principais: caseínas (80%) e proteínas do soro (20%), e a porcentagem destes componentes variam de acordo com a raça dos animais, alimentação, dentre outros fatores (WATTIAUX, 2008). Entre os componentes do leite, as proteínas são os nutrientes de maior valor industrial pois a lucratividade das indústrias depende do rendimento proteico representado pelo extrato seco total e sua eficiência na transformação do leite em derivados e leite fluido, que por sua vez dependem principalmente da qualidade da matéria-prima (BRASIL *et al.* 2015).

Desta maneira, algumas das principais propriedades tecnológicas do leite, consideradas de grande importância industrial (coloração branca, estabilidade ao etanol, ao calor e à coagulação por coalho), são proporcionadas pelas características físico-químicas das micelas de caseína (FOX; BRODKORB, 2008).

1.2.3.1 Caseínas

Considerada a principal proteína do leite, a caseína é uma fosfoproteína sintetizada nas células epiteliais da glândula mamária e secretada na forma de micelas. Esta proteína é classificada em quatro subgrupos: alfa (α), beta (β), kappa (κ) e gama (γ) (DURR; FONTANELI; MORO, 2001). Dentro de cada subgrupo aparecem ainda variantes genéticas, ou seja, mutações que ocorreram na estrutura primária das caseínas em que um ou mais aminoácidos foram substituídos por outros na sequência primária da cadeia polipeptídica (SCARBIERI, 1996).

Os subgrupos das micelas de caseína são formados principalmente pela α_{s1} , considerada a fração mais susceptível ao efeito de proteases, e a fração α_{s2} , altamente hidrofílica e com grande sensibilidade ao cálcio ionizável. A fração de β -caseína é mais sensível em baixas temperaturas, tornando-se também susceptível às proteases presentes no leite. Já a fração considerada menos hidrofóbica, responsável por manter a estabilidade proteica da micela, é a κ -caseína, que sofre menos efeito do Ca solúvel no leite, em comparação com as demais frações, mantendo assim a estrutura e a repulsão eletrostática entre as micelas em solução no leite (CHEFTEL; CUQ; LORIENT, 1989).

1.2.3.2 Proteínas do soro

As proteínas do soro do leite também conhecidas como *whey protein*, geralmente são extraídas da porção aquosa do leite, durante o processo de fabricação de queijos. As proteínas do soro do leite apresentam uma estrutura globular contendo algumas pontes de dissulfeto, que conferem uma certa estabilidade estrutural. Os peptídeos do soro são formados por frações de β -lactoglobulina (BLG), α -lactoalbumina (ALA), albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulinas (Ig) e glicomacropéptídeos (GMP). Essas frações variam em tamanho, peso molecular e função, fornecendo às proteínas do soro características especiais (KINSELLA; WHITEHEAD, 1989; AIMUTIS, 2004)

Estudos realizados com as proteínas do leite, incluindo as proteínas do soro, mostraram que além de seu alto valor biológico, elas possuem peptídeos bioativos, que atuam como agentes antimicrobianos, anti-hipertensivos, reguladores da função imune, assim como fatores de crescimento (SALZANO, 2002). No entanto em comparação com as caseínas, as proteínas do soro apresentam pouca influência sobre as propriedades físico-químicas do leite, porém, durante o processamento térmico, tornam-se importantes. Sob temperaturas superiores a 80°C, elas desnaturam-se e podem atuar como agentes emulsificantes de lipídios, devido à facilidade em interagir com moléculas hidrofóbicas e, ao mesmo tempo, com moléculas do próprio solvente (TRONCO, 2010).

1.2.4 Lactose

A lactose é considerada o principal carboidrato do leite, proveniente da junção da glicose e a galactose (dissacarídeo) no tecido mamário. A concentração média de lactose no leite varia em torno de 4,7 a 5,2g/mL, podendo ocorrer pequenas variações de animal para animal (TRONCO, 2010). A síntese de lactose tem papel de grande importância na regulação osmótica da passagem de componentes do sangue para o leite. Através do princípio osmótico, ela atrai água para dentro das vesículas do complexo de Golgi, e assim controla a quantidade de água que entra na glândula mamária (GUINARD-FLAMENT *et al.* 2006), conseqüentemente, a lactose determina o volume de leite produzido na glândula mamária (BOUTINAUD *et al.* 2008).

1.2.5 Minerais

O leite é composto por uma grande variedade de minerais que estão integrados às micelas da proteína ou isolados em solução, permanecendo em constante equilíbrio na fase solúvel ou livres e na fase coloidal (ORDÓÑEZ *et al.* 2005). Os minerais representam cerca de 0,6 - 0,8% do peso do leite, sendo o cálcio considerado o mais importante para a saúde humana. O leite contém também diversos minerais em menores quantidades: sódio (Na), potássio (K), magnésio (Mg), enxofre (S), iodo (I), zinco (Zn), cobre (Cu), etc. (TRONCO, 2010). Os minerais mantêm o equilíbrio constante do leite, passando do sangue para o leite, dependendo do potencial hidrogeniônico (pH), temperatura e a concentração salina do leite. Essas mudanças na concentração de sais tem forte influência na estabilidade do leite (WALSTRA; JENNESS, 1984).

1.2.5.1 Citratos

Os citratos encontram-se nas fases solúvel e coloidal do leite, e as suas interações com as proteínas exercem grande influência sobre a estabilidade térmica do leite e seus derivados. A adição de citrato no leite, melhora a estabilidade térmica do leite, devido à sua eficácia em sequestrar o cálcio iônico (Ca^{2+}) e reduzir a concentração de fosfato de cálcio coloidal (SANTOS; FONSECA, 2007).

De acordo com Teixeira (2019) a adição de citrato no leite pode aumentar a sua estabilidade térmica, pois propicia maior equilíbrio entre as fases (solúvel e coloidal), reduzindo a concentração de fosfato de cálcio coloidal por meio da conversão em citrato solúvel não ionizado.

1.2.5.2 Cálcio

No leite, o mineral Ca encontra-se em duas formas: solúvel e coloidal, sendo a forma solúvel encontrada na forma de Ca^{2+} e ligado ao citrato e fosfato e na forma coloidal ligado a estrutura das proteínas (SANTOS; FONSECA, 2007).

As micelas de caseína, apresentam-se com cargas negativas no leite, sendo estas cargas resultantes das ligações de fosfato de cálcio em sua estrutura. No entanto, quando ocorre o aumento de Ca solúvel no meio, ocorre o aumento de cálcio ligado, causando

redução das cargas negativas das micelas, resultando na diminuição da barreira eletrostática. O aumento da concentração de cálcio total no leite, em pH normal (6,6), levará ao aumento das ligações desse mineral com as micelas, causando diminuição das cargas elétricas das micelas (HORNE; PARKER, 1982).

De acordo com Horne; Parker (1981), à medida que ocorre o aumento do nível de cálcio total no leite, a concentração alcoólica de etanol (prova do álcool) necessária para que ocorra a precipitação (coagulação) das micelas de caseína, é reduzida, ou seja, o leite torna-se mais instável. Chavez *et al.* (2004), em um estudo avaliando os parâmetros que afetam a estabilidade do leite, observaram que a elevação da concentração de Ca^{2+} provocou aumento da instabilidade do leite ao etanol e a diminuição da resistência térmica do leite, quando submetido ao teste de coagulação por aquecimento.

A capacidade hidrofóbica das micelas de caseínas aumenta após a adição de Ca no leite, o que indica modificações estruturais das micelas. Quando uma proteína está desorganizada estruturalmente, pode ocorrer a exposição dos seus segmentos hidrofóbicos (PHILIPPE *et al.* 2003).

1.2.5.3 Fosfatos

O fosfato de cálcio é considerado de fundamental importância para a manutenção da estrutura das micelas de caseína pois está associado principalmente às frações de α_1 - e α_2 - e β -caseínas. Estas ligações são responsáveis pela manutenção da estrutura e estabilidade das micelas (GAUCHERON, 2005).

De acordo com Horne; Muir (1990), a adição de fosfato de cálcio antes do pré-aquecimento do leite causa redução da concentração de cálcio solúvel. Essa redução se deve a todas as micelas de caseína apresentarem em suas estruturas, resíduos de fosfoserina. Os grupos fosfato destes resíduos constituem os principais sítios de ligações de cátions nas micelas (GAUCHERON, 2005).

1.2.6 Vitaminas

O leite apresenta uma grande quantidade de vitaminas necessárias para o organismo. As vitaminas conhecidas como lipossolúveis, vitamina A, vitamina D, vitamina E e a vitamina K, que estão associadas principalmente aos glóbulos de gordura no leite

(GONZÁLEZ; CAMPOS, 2003). Além disso, apresenta também níveis elevados de vitaminas no complexo B (vitamina B2, vitaminas B4, vitamina B6 e vitamina B12) e a vitamina C (ALBUQUERQUE, 1997). Uma importante função das vitaminas, especificamente da vitamina D, no organismo, é com relação à absorção intestinal de cálcio. A forma ativa do metabólito da vitamina D (diidroxivitamina D [1,25(OH)₂ D₃]), é considerada a principal reguladora da absorção de cálcio pelo intestino (SILVA; TEIXEIRA; GOLDBERG, 2004).

1.3 QUALIDADE DE LEITE

Com a crescente produção nacional de leite, devido a sua importância nutricional na alimentação, estudos vêm sendo realizados com o propósito de melhorar seus padrões de qualidade, visando atender a demanda das indústrias de beneficiamento e dos consumidores, que estão cada vez mais exigentes (TRONCO, 2010).

A qualidade do leite *in natura* é influenciada por muitos aspectos, entre os quais se destacam os fatores zootécnicos associados a alimentação dos animais, ao manejo, potencial genético dos rebanhos e fatores relacionados à obtenção e armazenagem do leite (MOURA *et al.* 2017). Com a preocupação de padronizar a produção de leite e de garantir sua qualidade, o Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do leite (PNMQL) por meio da instrução normativa (IN) de nº 76/77, estabeleceu normas de produção e padrões físico-químicos do leite, visando melhorias na qualidade do leite cru e industrializado brasileiro (BRASIL, 2018).

De acordo com a IN nº 76, o leite deve apresentar as seguintes propriedades: pH 6,6 – 6,8, acidez entre 0,14 – 0,18 g de ácido láctico/ml, estabilidade ao alizarol na concentração mínima de 72% v/v, densidade relativa entre 1,028 e 1,034 g/ml, teor mínimo de gordura de 3,0 g/100g; teor mínimo de proteína total de 2,9 g/100g, índice crioscópico entre -0,530 °H e a -0,555 °H, contagem de células somáticas (CCS) de no máximo 500.000 CS/mL e a contagem padrão em placas (CPP) de no máximo 300.000 UFC/mL (BRASIL, 2018).

Conforme mencionado, a estabilidade do leite representa um dos parâmetros de qualidade exigidos pela legislação e sua avaliação é realizada por meio do teste do etanol. O etanol utilizado no teste promove a desidratação do leite, reduzindo a constante dielétrica do meio, o que leva ao aumento da dissolução de sais e à redução da carga negativa das micelas, fazendo com que aumente a precipitação das caseínas (MARQUES *et al.* 2007). Portanto, quando o leite coagula no teste ou apresenta resultado positivo (precipitação), é classificado como leite instável.

O teste do álcool é realizado na propriedade, antes do carregamento do leite, e avalia a estabilidade das principais proteínas lácteas, as caseínas, que são submetidas à desidratação pelo álcool (MARQUES *et al.* 2007), permitindo analisar a capacidade do leite em suportar elevadas temperaturas sem sofrer precipitação (coagulação) (SINGH, 2004), simulando o processo ocorrido na indústria. Porém, segundo Ribeiro *et al.* (2008) além de avaliar a estabilidade térmica do leite, o teste também é considerado um indicador indireto da acidez do leite. Resultados positivos ao teste do etanol podem ocorrer devido principalmente à redução de pH, pela fermentação da lactose por micro-organismos mesófilos com a produção de ácido lático, sendo considerado um leite ácido. Segundo a legislação, este leite não deve ser transportado para a indústria (FONSECA; SANTOS, 2000).

No entanto, o que tem causado divergências entre produtores e a indústria é que a perda da estabilidade do leite, que resulta em precipitação positiva, em muitos casos não é acompanhada de acidez, sendo então considerado como Leite Instável Não Ácido (LINA) (ZANELA *et al.* 2009). O LINA apresenta instabilidade em suas proteínas e é rejeitado pela indústria de lácteos por não manter sua integridade quando submetido à elevadas temperaturas durante o processamento térmico (BACKES; STEFANI; PASETTI, 2012).

Embora reconhecido e regulamentado pela legislação, a eficácia do teste do álcool tem sido questionada. Viero (2008), em um estudo avaliando a relação entre o LINA e as características físico-químicas do leite em vacas da raça Jersey, observou que cerca de 18,6% de amostras positivas no teste do etanol mantiveram-se estáveis quando submetidas ao teste de fervura (100°C), que simula o tratamento térmico realizado industrialmente. Sendo assim, segundo o autor, o teste do etanol e o teste da fervura são dois parâmetros que não estão correlacionados.

1.4 FATORES QUE INTERFEREM NA ESTABILIDADE DO LEITE

A ocorrência de instabilidade no leite é um fenômeno complexo, de causas múltiplas, que altera as características físico-químicas do leite, tornando-o instável ao álcool, com acidez entre 0,14 -0,18 g/ácido lático, sendo, portanto, considerado um leite não ácido (FISCHER, 2005).

Por muitos anos os problemas relacionados à estabilidade do leite ao teste do etanol foram ignorados ou confundidos com a acidez elevada do leite (RIBEIRO *et al.* 2011), porém, a ocorrência do LINA pode causar prejuízos econômicos significativos a toda cadeia

produtiva, uma vez que o leite pode ser penalizado, gerando descontos no preço pago ao produtor, e também pode ser rejeitado pela indústria, mesmo apresentando níveis de acidez normais pelos padrões do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) (MARX *et al.* 2011).

Existem vários fatores que podem interferir na qualidade do leite e modificar sua estabilidade. Dentre eles pode-se citar o fator genético (espécie, raça, genética), fator intrínseco (idade ou número de lactações, estágio de lactação), fatores nutricionais (alimentação, forma de conservação, ajuste da dieta às exigências do animal), fatores ambientais (estresse, estação do ano, manejo), fatores extrínsecos (sanidade animal, contaminação bacteriana), dentre outros (FISCHER *et al.* 2011). Procedimentos metodológicos no teste do álcool também podem apresentar falhas, comprometendo a avaliação da estabilidade.

1.4.1 Concentração de etanol e pH do leite

A estabilidade do leite pode ser diretamente afetada pela concentração de etanol. Quanto maior a concentração de álcool, maior a susceptibilidade do leite coagular no teste. Isso pode ocasionar falsos positivos pela alta taxa de desnaturação das proteínas devido à redução da constante dielétrica do meio, a qual reduz a barreira de energia que previne a coagulação, modificando a carga das proteínas e, conseqüentemente, causando precipitação das micelas (HORNE; PARKER, 1981).

O pH da solução alcoólica também pode interferir nos testes, devendo ser corrigido próximo da neutralidade para não ocasionar resultados falsos positivos. De acordo com a Teoria da dissociação iônica de Arrhenius, uma substância é considerada ácida se, em meio aquoso, liberar como único cátion o H^+ . Quanto maior a quantidade desse íon no meio, maior será a acidez da solução (SOUZA; SILVA, 2018), causando interferência nos resultados de estabilidade.

1.4.2 Temperatura da amostra de leite

Outro fator que pode afetar os resultados é a temperatura da amostra de leite. Estudos indicam que quando as amostras não são refrigeradas podem ficar mais predisponentes à coagulação nos testes de estabilidade (ZANELA; RIBEIRO; FISCHER, 2015). Porém, um estudo feito por Costa *et al.* (2014), analisando a interação entre quatro temperaturas (4°C,

10°C, 15°C e 20°C) frente a concentrações de etanol variando de 66 a 96% v/v, demonstrou que a medida que a temperatura das amostras foi elevada (até 20°C), estas apresentaram maior estabilidade ao teste do etanol. Isso demonstra que há uma divergência entre a temperatura ideal para a realização do teste do etanol, o que pode ocasionar resultados equivocados. Machado (2010) em seu trabalho observou que a temperatura não interferiu no resultado do teste do álcool e recomendou o teste em amostras de leite em temperatura ambiente (em torno de 20°C).

1.4.3 Desestabilização da micela de caseína

A principal causa da instabilidade do leite frente à prova do álcool está relacionada à caseína (SANTOS; FONSECA, 2007). Ela é formada pela agregação das subunidades α , β , γ e κ -caseína, sendo a última a principal responsável pela manutenção da estabilidade da micela. A κ -caseína está presente na superfície da micela, que constitui a fração hidrofílica que reage com a água e impede a agregação das subunidades das micelas (CREAMER *et al.* 1998). Segundo Tuinier; Kruif (2002), a estabilidade esférica gerada pela camada externa de κ -caseína na micela, em forma de escova, é o fator mais importante para manter a estabilidade da micela. Normalmente, a caseína é bastante estável em altas temperaturas e não é afetada pelo processo de pasteurização ou esterilização no processamento industrial. Entretanto, quando há acidificação do leite, ocorre a hidrólise enzimática da κ -caseína em decorrência de altas temperaturas, pequenas reduções de pH (mesmo dentro da faixa de normalidade), excesso de cálcio iônico, com a modificação no padrão isoelétrico da micela. Estes fatores afetam sua estabilidade coloidal, causando a desestruturação das micelas e sua precipitação, formando coágulos no leite (O'CONNELL *et al.* 2006).

1.4.4 Restrição nutricional ou alimentar

A estabilidade do leite sofre influência do *status* nutricional dos animais. Sendo assim, fatores como estação do ano, disponibilidade de alimento e manejo nutricional exercem efeito sobre as características do leite produzido (BONDAN, 2015). Estudos realizados com vacas submetidas a algum tipo de restrição alimentar indicaram relação com o aumento da permeabilidade das *tight junctions* (junções firmes) das células epiteliais mamárias, causando um aumento do influxo de sódio e cloro para o lúmen alveolar, com

passagem compensatória de lactose e potássio para o sangue, sendo esses minerais responsáveis por modificar a barreira eletrostática entre as micelas de caseína, causando a sua precipitação (STUMPF *et al.* 2013).

Animais submetidos a situações de restrição alimentar ao longo da lactação apresentam redução na produção de leite e queda na síntese de lactose, gordura e proteína. A redução da síntese dos componentes é causada principalmente pelo menor suprimento sanguíneo de nutrientes para a glândula mamária devido à restrição alimentar (FRUSCALSO *et al.* 2013).

Gabbi (2013), avaliando a estabilidade do leite de animais da raça Holandesa e Jersey submetidas a quatro níveis de restrição alimentar, observou relação entre a redução da estabilidade do leite com a severidade e a duração da restrição alimentar. O fornecimento de diferentes níveis de energia na dieta avaliado pelo autor também afetou os atributos físico-químicos do leite, sendo observado aumento da produção de leite, dos teores de lactose e da estabilidade ao teste do etanol em função do incremento energético na dieta de vacas leiteiras. A restrição alimentar em vacas leiteiras impacta negativamente da produção de leite, concentração de componentes e produzindo leite com menor estabilidade, ainda que sejam modulados de acordo com a duração e severidade da restrição (GABBI *et al.* 2016).

1.4.5 Composição nutricional da dieta

A composição nutricional da dieta dos animais pode causar influência na estabilidade do leite ao etanol. Vacas alimentadas com pastagem de Tifton com teor mais elevado de potássio causou redução da estabilidade do leite. Essa redução da estabilidade foi causada devido ao maior teor de potássio observado no leite devido à sua alta permeabilidade na membrana apical das células epiteliais mamárias (FRUSCALSO *et al.* 2013).

Em um experimento realizado por Martins *et al.* (2019) avaliando os efeitos do processamento do milho e da proteína degradável na alimentação de vacas leiteiras, os autores observaram maiores teores de κ -caseína glicolisada, aumento da produção de leite e do conteúdo de caseína total e maior estabilidade do leite ao etanol dos animais alimentados com proteína de baixa degradabilidade em relação aos alimentados com proteína de alta degradação.

Marques *et al.* (2010) observaram que vacas submetidas a um alto nível de suplementação com aporte de 80% das exigências energéticas e proteicas apresentaram maior

eficiência na melhoria da estabilidade do leite frente a prova do etanol, quando comparadas com vacas submetidas a um baixo nível de suplementação proteica (20% da exigência). Voges *et al.* (2018) observaram que a utilização de suplementação volumosa na alimentação dos animais (silagem de milho), além da oferta de pastagens de melhores qualidade, com menor teor de FDN, influenciaram na menor ocorrência de leite instável.

A utilização de dietas cátion-aniônicas também pode causar mudanças na estabilidade do leite. Martins *et al.* (2015) observavam que a utilização de dietas cátion-aniônicas causaram efeito positivo na estabilidade do leite, ocorrendo o aumento linear da estabilidade do leite em função do aumento da diferença cátion-aniônica da dieta das vacas.

A suplementação de vacas em lactação com sal aniônico também pode ocasionar aumento nos teores de Ca^{2+} do leite. A utilização de sal aniônico (cloreto de amônio) causa diminuição do pH da urina e do leite aumentando os teores de cálcio iônico, causando maior instabilidade do leite a prova do etanol (MARQUES *et al.* 2011).

O fornecimento de dietas com diferentes fontes de nitrogênio processado também causa modificações nos perfis de proteína no leite. Avaliaram o fornecimento de milho e farelo de soja em diferentes processamentos e observaram que ocorreu modificações nas frações de caseína das amostras. Animais que receberam milho em flocos apresentaram maior percentual das frações α_1 -caseína e, animais que receberam dietas com farelo de soja com tratamento térmico apresentaram frações de α_2 -caseína em maior quantidade (LI *et al.* 2014). Essa mudança nas frações de caseína presentes no leite pode interferir na estabilidade da micela. Segundo Barbosa *et al.* (2012) amostras de leite instável apresentam maiores valores da fração de β -caseína e menores valores de κ -caseína. A κ -caseína é responsável pela manutenção da estrutura da micela, e é a única subunidade hidrofílica e estável ao íon cálcio.

1.4.6 Raça

A composição do leite apresenta variação de acordo com a raça dos animais, e a estabilidade ao etanol não está relacionada a uma raça específica (FAO, 2001). Em um trabalho realizado com animais da raça Jersey e Holandesa para avaliar a composição e as propriedades de coagulação do leite, Jensen *et al.* (2012) verificaram variação nos teores de proteína, minerais, produção de leite e nas propriedades de coagulação, indicando que o leite de vacas Jersey apresentou propriedades de coagulação superiores, relacionadas a produção de queijo. A maior capacidade de coagulação do leite de vacas da raça Jersey pode ser

explicada, segundo os autores, pelo alto teor de proteína total e da fração de κ -caseína que favorece a ocorrência de coagulação (JENSEN *et al.* 2012).

As diferenças genéticas entre as raças podem modificar a composição e, conseqüentemente, a qualidade do leite produzido. Estas diferenças podem alterar a estrutura primária das proteínas e resultar em alterações de suas propriedades físico-químicas (HILL *et al.* 1996). Ikonen *et al.* (2004) avaliaram os efeitos genéticos sobre as propriedades de coagulação do leite em mais de 4.600 amostras e concluíram que a seleção de animais com alto teor de proteína ou caseína (CN), acarretou em efeitos positivos sobre a estabilidade e a composição do leite.

1.4.7 Estádio de lactação

À medida que a lactação avança, ocorre aumento na estabilidade do leite, voltando a reduzir nos últimos dias do estágio lactacional, sendo causado principalmente pela aumento da permeabilidade das junções firmes da glândula mamária (BARROS, 1999). A perda da integridade das junções firmes ao longo do estágio de lactação está associada à redução da secreção do leite e do aumento do transporte celular de componentes do sangue para o leite (STELWAGEN; SINGH, 2013). Marques *et al.* (2010) avaliando o efeito de duas dietas com baixo e alto nível de suplementação para vacas em estágio avançado de lactação (DEL igual a 220), não verificaram estatisticamente alteração na estabilidade do leite ao teste do etanol. No entanto, os autores verificaram que os animais que receberam dietas com alto nível de suplementação apresentaram maiores níveis de estabilidade na prova do etanol.

Stumpf *et al.* (2020), ao avaliarem a permeabilidade das junções firmes da glândula mamária em vacas leiteiras, utilizando a prova do álcool com diferentes concentrações (entre 50 a 98% v/v), observaram que vacas com estágio de lactação avançado, produziram maior porcentagem de leite instável a 63,2% v/v. De acordo com os autores, a redução da estabilidade do leite está relacionada com a permeabilidade das junções firmes da glândula mamária pois com o aumento da entrada de eletrólitos do sangue para o leite, podem ocorrer mudanças no equilíbrio salino, causando maior influxo de Na no leite, havendo diminuição dos níveis de lactose (STUMPF *et al.* 2013).

1.4.8 Concentração de cálcio iônico

A concentração Ca^{2+} é considerada um dos principais fatores relacionados com a instabilidade da micela, quando o leite é submetido à prova do etanol. Segundo Horne; Parker (1981), as micelas de caseína, quando em pH normal (6,6 - 6,8), apresentam-se negativamente carregadas, sendo essas cargas de fundamental importância para sua estabilização em solução. Tais cargas são controladas pela quantidade de cálcio ligado e, conseqüentemente, pelo nível de cálcio livre. Quando ocorre aumento do nível de cálcio total no leite, aumenta a quantidade íons de Ca^{2+} e isso causa uma redução das cargas negativas das micelas, diminuindo assim a repulsão eletrostática entre elas, causando sua precipitação.

As frações α e β - caseínas são muito sensíveis ao Ca^{2+} , enquanto que a κ -caseína é uma glicoproteína que possui apenas um grupo fosfoserina em sua estrutura, sendo considerada estável na presença de Ca^{2+} , assumindo importante papel na estabilidade da micela (WALSTRA, 1999). Porém, quando ocorre o aumento da concentração de Ca^{2+} , verifica-se o colapso da camada de κ -caseína, e a conseqüente redução na carga micela, causando a precipitação do fosfato de cálcio (O'CONNELL *et al.* 2006). O aumento de Ca^{2+} no leite diminui minimiza a capacidade da micela em manter sua estrutura, causando sua desestruturação e conseqüente diminuição da repulsão eletrostática entre as micelas, ocasionado sua agregação (PHILIPPE *et al.* 2003).

Segundo Holt (2004) o excesso de cálcio diminui a solubilidade das proteínas em água. O excesso de sais minerais domina as cargas do solvente, representado pela água, diminuindo conseqüentemente o número de cargas disponíveis para se ligarem ao soluto, que é a proteína. Desta forma, aumenta a interação soluto/soluto, ocorrendo a precipitação das proteínas.

Algumas modificações físico-químicas, também podem alterar os teores de cálcio iônico do leite como acidificação, tratamento térmico, resfriamento, adição de quelantes, cloreto de sódio ou cátions divalentes (GAUCHERON, 2005).

1.4.9 Sanidade

1.4.9.1 Mastite

A ocorrência de doenças, principalmente a mastite, pode ter relação positiva com a instabilidade do leite. No entanto, não existe concordância entre os autores. Em um estudo realizado por Zanela *et al.* (2006), não houve relação positiva entre a mastite e a instabilidade. Em contrapartida, Oliveira *et al.* (2011) constataram maior contagem de células somáticas (CCS) em amostras de leite consideradas instáveis ao etanol. De acordo com Tozzetti; Bataier; Almeida (2008) a mastite altera a permeabilidade vascular das células da glândula mamária, afetando o equilíbrio salino do leite, causando instabilidade nas micelas de caseína.

Vargas *et al.* (2014), avaliando as correlações entre a CCS e os parâmetros físico-químicos e microbiológicos de qualidade de leite, observaram que os teores de minerais do leite aumentaram à medida que se elevou a CCS. De acordo com Shamay *et al.* (2003), apesar das concentrações de K e do Ca⁺ serem menores em leites com alta CCS, o teor de minerais eleva-se em consequência do aumento no teor de Na e cloro (Cl), ocasionado pela alta permeabilidade das junções firmes.

1.4.9.2 Acidose metabólica

A acidose ruminal é uma doença metabólica que pode acometer vacas leiteiras (OETZEL, 2003). Com o crescente aumento na demanda de produção de leite, tornou-se usual alimentar vacas leiteiras com dietas ricas em concentrado (ricas em grãos). Assim que esses animais são alimentados com esse tipo de dieta, ocorre aumento na taxa de produção de ácidos no rúmen. O aumento da taxa de produção de ácido pode causar excesso na taxa de absorção ruminal e de tamponamento causando problemas digestivos, mais conhecido como acidose ruminal (DIONISSOPOULOS *et al.* 2012).

A acidose pode ocasionar menor consumo alimentar, diminuição da produção de leite e conseqüentemente redução do teor de gordura do leite, proveniente de uma dieta com menores teores de fibra (KLEEN *et al.* 2003). Casos de acidose ruminal podem causar a ocorrência de acidose metabólica nos animais, provocando queda do pH da urina e do leite, podendo predispor o leite a maior instabilidade (MARQUES *et al.* 2011).

Segundo Fagnani *et al.* (2014) vacas com desequilíbrios acidobásicos ocasionados por casos de acidose metabólica e cetose apresentam maior instabilidade no leite, devido a mudanças nos teores de minerais.

1.4.10 Instalações e estresse térmico

As instalações usadas para vacas leiteiras têm grande impacto sobre os resultados de produtividade e sanidade do rebanho, como também sobre a qualidade do leite obtido. Vários fatores devem ser ponderados ao planejar as instalações, sobretudo com relação ao conforto térmico, espaço físico e de cocho e o tipo de piso mais adequado para os animais (BRIGATTI, 2014).

O estresse térmico acarreta impactos negativos na produção de leite, pois o animal diminui a ingestão de matéria seca, causando redução da ruminação e conseqüentemente na absorção de nutrientes. Além disso, há redução na disponibilidade de nutrientes usados para a síntese de leite, ocasionando mudanças em sua composição que podem comprometer a estabilidade (MARCHEZAN; FIALHO, 2013).

Abreu (2015) ao submeter vacas da raça Holandesa ao estresse térmico (moderado e severo), verificaram redução da estabilidade do leite pelo teste do etanol e de fervura. Sendo assim, o estresse térmico pode efetivamente induzir a problemas metabólicos (acidose ruminal e metabólica) (KADZERE *et al.* 2002), o que poderia aumentar a concentração de Ca^{2+} do leite (MARQUES *et al.* 2011).

Estudos complementares com estresse térmico agudo (SILANIKOVE; SHAPIRO; SHINDER, 2009) mostraram que vacas submetidas ao estresse térmico sofrem modificações da atividade dos canais de K^+ nas membranas apicais das células epiteliais mamárias. Essa mudança causa modificação na passagem de componentes para o lúmen da glândula mamária, causando redução na síntese de gordura e proteína alterações nas propriedades de coagulação do leite no processamento de queijo.

1.4.11 Tempo de coleta após a ordenha

O tempo para a coleta de leite após a ordenha dos animais pode influenciar na estabilidade do leite frente a prova do etanol. Angelo *et al.* (2018) avaliaram amostras de tanque de vacas da raça Jersey e observaram grande variação no nível de estabilidade das amostras em um período de 7 horas após a ordenha. Esses autores verificaram que quando as amostras eram submetidas ao teste do etanol logo após a ordenha, elas foram estáveis a concentrações alcoólicas superiores (76% v/v) quando comparadas a amostras submetidas ao teste uma hora após a ordenha sendo estáveis ao álcool 74% v/v. No entanto, do decorrer de

seis horas após a ordenha, as amostras se mantiveram estáveis em etanol ainda em solução alcoólica 74% v/v.

1.4.12 Tempo entre a coleta e a análise de leite

A acidez é um dos fatores que pode contribuir para a ocorrência de instabilidade no leite em relação ao tempo entre a coleta e a análise da amostra. O leite com pH menor que 6,5 (leite ácido) afeta a estabilidade do leite devido à sua interferência na força iônica das micelas de caseína. Após a ordenha dos animais, ocorre a incorporação de dióxido de carbono (CO₂) no leite, e a sua presença pode elevar o pH do leite em 1°D ou mais pois, o CO₂ é transformado em ácido carbônico. Devido a isso é recomendável que a acidez do leite seja determinada somente após um tempo depois da ordenha, para que ocorra a volatilização do CO₂ (VELLOSO, 1998).

1.5 LIMITAÇÕES DO USO DE LEITE INSTÁVEL

A utilização de leite instável por parte da indústria pode ocasionar prejuízos como menor rendimento no processamento industrial, uma vez que este tipo de leite pode apresentar menores teores de lactose, proteína e, em algumas situações, de gordura, comprometendo a produção de derivados (FISCHER *et al.* 2011). Oliveira *et al.* (2011) avaliaram a composição e características físico-químicas do leite instável não ácido recebido em um laticínio do estado de São Paulo e observaram que as amostras positivas ao teste do etanol nos períodos de baixa precipitação, apresentaram menores concentrações de proteína e lactose, quando comparados ao leite estável.

Marques *et al.* (2007) avaliaram a ocorrência de leite instável ao álcool 76% e do LINA e o efeito sobre os aspectos físico-químicos do leite. Os autores observaram que o leite normal (sem a presença de precipitação) apresentou teores de proteína e lactose superiores ao LINA. Em contrapartida, o LINA apresentou teores de gordura e CCS superiores ao leite normal. Para as indústrias lácteas, as proteínas (caseínas), são os componentes mais importantes do leite pois as propriedades nutricionais, textura e sensoriais do leite fluido, queijo e iogurtes, derivam principalmente das caseínas (KRUIF *et al.* 2012).

Outro problema causado pela instabilidade do leite é que ele pode sofrer precipitação durante a fabricação do leite *Ultra High Temperature* (UHT), aderindo-se aos equipamentos,

o que resulta em elevação dos custos de limpeza e aumento no descarte de leite pela indústria (ROSA *et al.* 2017). Além disso, a instabilidade do leite pode causar alterações no equilíbrio mineral, resultando em problemas como a precipitação durante a pasteurização, aumento do tempo de coagulação na fabricação de queijos, baixo rendimento em sua produção, maior fragilidade do coágulo e a possibilidade de precipitação nos processos de fabricação do leite em pó, devido as altas temperaturas dos processamentos térmicos (CEBALLO; HERNÁNDEZ, 2001).

Nas indústrias da região dos Campos Gerais a prova do etanol é realizada nas propriedades com concentração alcoólica mínima de 78% v/v antes do carregamento do leite. Quando o leite é considerado positivo na prova do etanol, feita no carregamento do leite, o produtor é penalizado com desconto de 2% na produção mensal de leite. No caso de persistência de instabilidade do leite frente à prova do etanol em 15 dias, o desconto será de 4,5% na produção mensal, e ainda, se após 30 dias ocorrer positividade novamente ao teste, o produtor sofrerá desconto de 7% da produção mensal (COMUNICAÇÃO PESSOAL).

1.6 BENEFÍCIOS DO USO DE LEITE INSTÁVEL

Apesar dos problemas relatados pela literatura com a utilização de leite instável (FISCHER *et al.* 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2011; ROSA *et al.* 2017), ainda se tem poucos estudos relacionados com sua utilização em produtos lácteos. No entanto, de acordo com Marques *et al.* (2007), a composição do LINA é similar ao leite normal, estando de acordo com os padrões da IN 76/77 (BRASIL, 2018).

Ribeiro *et al.* (2006) avaliaram a utilização de LINA e leite normal no processamento de iogurte batido, e não encontraram diferenças no tempo de fermentação, viscosidade e pH das amostras aos 30 dias, demonstrando que o leite considerado instável à prova do etanol, poderia ser utilizado na fabricação de iogurte.

Goulart; Piccinini; Pinto (2019) ao avaliarem a produção de queijo fresco com leite normal (estável) e LINA, observaram que os parâmetros físico-químicos (pH, acidez, sólidos, umidade, matéria seca e extrato seco) dos queijos não diferiram entre si. Além disso, os autores relataram que o LINA, apresentou rendimento dos queijos frescos semelhantes ao leite estável, indicando que o mesmo poderia ser utilizado industrialmente.

Segundo Backes; Stefani; Pasetti (2012), há escassez de pesquisas sobre a produção de derivados (queijo, iogurte, entre outros) com a utilização de LINA. Apesar do leite instável

apresentar problemas para suportar o tratamento térmico industrial, em alguns processos como a fabricação de queijo ou iogurte, nos quais a coagulação e a geleificação são necessárias. Neste processamento, o leite de menor estabilidade poderia ser utilizado sem causar tantos prejuízos para a indústria, pelo o fato de poder suportar os tratamentos de calor moderado, sem sofrer tantos danos (TSIOULPAS; LEWIS; GRANDISON, 2007).

REFERÊNCIAS

ABREU, A. S. DE. **Fatores nutricionais e não nutricionais que afetam a composição do leite bovino**. 2015. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2015. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/132810>. Acesso em: 10 abr. 2021.

AIMUTIS, W. R. The Emerging Role of Dairy Proteins and Bioactive Peptides in Nutrition and Health: Foreword. **Journal of Nutrition**, v. 134, n. 4, p. 989–995, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15051859/>. Acesso em: 19 ago. 2020.

ALBUQUERQUE, L. C. **O leite em suas mãos**. ed 1. Juiz de Fora: Concorde Gráfica, 1997. 128 p.

ANGELO, I. D. V et al. Efeito da agitação, local de coleta e tempo de resfriamento na qualidade do leite de vacas Jersey. **Revista Electronica de Veterinaria**, v. 19, n. 5, p. 1–15, 2018. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/175484/1/Zanela-051812-Efeito-da-agitacao-local-de-.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2021.

ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de Proteínas do Soro de Leite Bovino**. 1 ed. Barueri: Manole, 2003. 142 p.

BACKES, R. G.; STEFANI, L. M.; PASETTI, M. Leite termicamente instável – problemas e soluções tecnológicas. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 11, n. 3, p. 254–260, 2012.

BARBOSA, R. S. et al. Caracterização eletroforética de proteínas e estabilidade do leite em vacas submetidas à restrição alimentar. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 47, n. 4, p. 621–628, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pab/a/N77ZVvj9xmYCVNYCQfvdHd/?format=pdf&lang=pt> Acesso em: 9 set. 2021.

BARROS, L. ET AL . Prueba del alcohol em leche y relación con calcio iónico. **Veterinary Practice**, v. 9, p. 315, 1999. Disponível em: <https://www.scienceopen.com/document?vid=d47ff45a-df3f-4275-810d-aa08b1c2b32b>. Acesso em: 12 mar. 2021.

BOUTINAUD, M. et al. Milking and feed restriction regulate transcripts of mammary epithelial cells purified from milk. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 3, p. 988–998, 2008. Disponível em: [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(08\)71354-7/pdf](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(08)71354-7/pdf).

Acesso em: 10 set. 2021.

BONDAN, C. II Simpósio Nacional da Vaca Leiteira. Rio Grande do Sul. Anais [...] **Variações na qualidade composicional do leite no Rio Grande do Sul**. Rio Grande do Sul, 2015. Disponível em: <file:///C:/Users/Thais/Google%20Drive/Mat%C3%A9rias%20Mestrado%20UEPG/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20Mestrado%20-%20Instabilidade%20do%20leite/ARTIGOS%20QUE%20EST%C3%83O%20NAS%20REVIS%C3%95ES/Bondam%20-%202015.html>. Acesso em: 19 ago. 2020.

BRASIL. Instrução normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. **Diário Oficial da União**, p. 1–8, 2018. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750137/do1-2018-11-30-instrucao-normativa-n-76-de-26-de-novembro-de-2018-52749894IN%2076. Acesso em: 17 mar. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Decreto no 30.691 de 29 de março de 1952, alterado pelos Decretos no 1255 de 25 de junho de 1962, no 1236 de 2 de setembro de 1994, no 1812 de 8 de fevereiro de 1996, no 2.244 de 4 21 de junho de 1997 e no 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA. **Diário Oficial da União**: Seção 1, Brasília, DF, n. 104, p.2, 01 de jun. 2017. Disponível em: <https://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/1950-1959/decreto-30691-29-marco-1952-339586-normaatualizada-pe.pdf>. Acesso em: 31 ago. 2021.

BRASIL, R. B. et al. Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino. **Ciência Animal**, v. 25, n. 2, p. 71–80, 2015. Disponível em: http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/artigo06_2015_2.pdf. Acesso em: 06 jan. 2021.

BRIGATTI, A. M. Compost Barn e a Produtividade Leiteira. 2014. Disponível em: <https://iepec.com/compost-barn-e-a-produtividade-leiteira/?v=19d3326f3137>. Acesso em: 10 jun. 2021.

CEBALLO, P. P.; HERNÁNDEZ, R. **Propriedades físico-químicas do leite e sua associação com transtornos metabólicos e alterações na glândula mamária**. GONZÁLEZ, F.H.D.; DÜRR, J.W.; FONTANELI, R.S. *In*: Uso do leite para monitorar a nutrição e metabolismo de vacas leiteiras. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2001. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/26656/000308502.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2021.

CHAVEZ, M. S. et al. Bovine milk composition parameters affecting the ethanol stability. **Journal of Dairy Research**, v. 71, n. 2, p. 201–206, 2004. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-dairy-research/article/abs/bovine-milk-composition-parameters-affecting-the-ethanol-stability/D44215780AD2FC9ABD6FEFAD90804025>. Acesso em: 24 maio 2021.

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. Proteínas alimentarias: bioquímica, valores funcionales, valor nutritivo y modificaciones químicas. 18 ed. Zaragoza: Acribia, 1989. Disponível em:

http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=120419&pid=S0073-9855200800030000500001&lng=en. Acesso em: 19 ago. 2020.

CREAMER, L. K. et al. Micelle Stability : k -Casein Structure and Function. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 11, p. 3004–3012, 1998. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030298758643>. Acesso em: 19 ago. 2020.

DIONISSOPOULOS, L. et al. A characterization of inflammatory and structural markers within the rumen epithelium during grain-induced ruminal acidosis in lactating dairy cattle. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 7, n. 3, p. 141–148, 2012. Disponível em: <https://thescipub.com/abstract/10.3844/ajavsp.2012.141.148>. Acesso em: 10 jun. 2021.

DURR, J. W.; FONTANELI, R. S.; MORO, D. V. **Determinação laboratorial dos componentes do leite**. In: Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. In: GONZÁLEZ, F. H. D., DURR, J. W., FONTANELI, R. S. Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras, Porto Alegre, 2001. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/26656/000308502.pdf>. Acesso em: 20 maio 2021.

EIFERT, E. DA C. et al. Perfil de ácidos graxos e conteúdo de ácido linoléico conjugado no leite de vacas alimentadas com a combinação de óleo de soja e fontes de carboidratos na dieta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1829–1837, 2006. Disponível em: <https://www.rbz.org.br/pt-br/article/perfil-de-acidos-graxos-e-conteudo-de-acido-linoleico-conjugado-no-leite-de-vacas-alimentadas-com-a-combinacao-de-oleo-de-soja-e-fontes-de-carboidratos-na-dieta/>. Acesso em: 16 maio 2021.

EMBRAPA. Anuário do leite 2018: Indicadores, tendências e oportunidades para quem vive no setor leiteiro. 2018. Brasília. Anuário 2018. Brasília: EMBRAPA, 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1094149/anuario-leite-2018-indicadores-tendencias-e-oportunidades-para-quem-vive-no-setor-leiteiro>. Acesso em: 20 maio 2021.

EMBRAPA. Anuário do leite 2021: Saúde única e total. 2021. Brasília. Anuário 2021. Brasília: EMBRAPA, 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1132875/anuario-leite-2021-saude-unica-e-total>. Acesso em: 21 set. 2021.

FAO. Conference on Small-scale Milk Collection and Processing in Developing Countries. 2001. Roma. **Report on the FAO E-mail Conference on Small-scale Milk Collection and Processing in Developing Countries**. Roma: FAO, 2001. Disponível em: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/ags/publications/econf-proc-english.pdf. Acesso em: 01 fev. 2021.

FAO. Milk and dairy products in Human Nutrition. 2013. Roma. **Milk and dairy products in Human Nutrition**. Roma: FAO, 2013. Disponível em: <http://www.fao.org/3/i3396e/i3396e.pdf>. Acesso em 01 fev. 2021.

FAO. **FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO STAT -**

Livestock Primary. Roma, Italy, 2019. Disponível em:
<<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>>. Acesso em: 07 dez. 2020.

FAGNANI, R. et al. Acid-base balance of dairy cows and its relationship with alcoholic stability and mineral composition of milk. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 5, p. 398–402, 2014. Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/pvb/a/yVMSdrNV97JPKzJGFSQNsvJ/?lang=en>. Acesso em: 9 jun. 2019.

FISCHER, V. Relatório técnico final das atividades desenvolvidas relativas ao projeto 474974/2003-0. Rio Grande do Sul. Anais [...] **Incidência, caracterização, quadro experimental e tratamento do leite instável não ácido (lina) no Rio Grande do Sul.** Rio Grande do Sul, 2005.

FISCHER, V. et al. Leite instável não ácido (LINA): prevenção na propriedade leiteira e impactos nos laticínios. **III Simpósio Nacional de Bovinocultura Leiteira e I Simpósio Internacional de Bovinocultura Leiteira - SIMLEITE**, v. 1, n. 3, p. 45–66, 2011.

FONSECA, L. F. L. da; SANTOS, M. V. dos. Qualidade do leite e controle da mastite. 1 ed. São Paulo: Lemos Editora, 2000. Disponível em:
<https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=497743&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22F%22&qFacets=autoria:%22F%22&sort=&paginaAtual=2366>. Acesso em: 15 jun 2019.

FOX, P. F.; BRODKORB, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 677–684, 2008. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958694608000320>. Acesso em: 07 abr. 2021.

FRUSCALSO, V. et al. Feeding restriction impairs milk yield and physicochemical properties rendering it less suitable for sale. **Scientia Agricola**, v. 70, n. 4, p. 237–241, 2013.

GABBI, A. M. **Características do leite bovino produzido em sistemas de alimentação e de produção com diferentes aportes tecnológicos.** 2013. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2013. Disponível em:
<https://lume.ufrgs.br/handle/10183/72797>. Acesso em: 09 abr. 2021.

GABBI, A. M. et al. Milk traits of lactating cows submitted to feed restriction. **Tropical Animal Health and Production**, v. 48, n. 1, p. 37–43, 2016. Disponível em:
<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1028470>. Acesso em: 13 set. 2021.

GAUCHERON, F. The minerals of milk. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, n. 4, p. 473–483, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16045895/>. Acesso em: 09 abr. 2021.

GONZÁLEZ, F.H.D., CAMPOS, R. I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil. Anais [...] **Indicadores metabólico-nutricionais do leite.** Rio Grande do Sul, v. 1, n. 1, p. 31–47, 2003.

GONZÁLEZ., F. H. D.; SILVA., C. DA S. Introdução à bioquímica clínica veterinária. 3 ed. Rio Grande do Sul: Editora da UFRGS, 2017. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/bioquimica/arquivos/ibcv.pdf>. Acesso em: 06 jan. 2021.

GOULART, J. Q.; PICCININI, A.; PINTO, A. T. Caracterização do queijo fresco produzidos a com leite de diferentes graus de estabilidade ao etanol. **Pubvet**, v. 13, n. 12, p. 1–7, 2019. Disponível em: <https://www.pubvet.com.br/artigo/6360/caracterizaccedilatildeo-do-queijo-fresco-produzidos-a-com-leite-de-diferentes-graus-de-estabilidade-ao-etanol#:~:text=to%20WhatsApp%20WhatsApp-,Caracteriza%C3%A7%C3%A3o%20do%20queijo%20fresco%20produzidos%20a%20com%20leite,graus%20de%20estabilidade%20ao%20etanol&text=Leites%20%C3%A1cidos%20tiveram%20menores%20teores,LN%20e%20igual%20ao%20LA>. Acesso em: 20 maio 2021.

GUINARD-FLAMENT, J. et al. Changes in mammary uptake and metabolic fate of glucose with once-daily milking and feed restriction in dairy cows. **Reproduction, nutrition, development**, v. 5, n. 46, p. 589–598, 2006.

HAUG, A.; HØSTMARK, A. T.; HARSTAD, O. M. Bovine milk in human nutrition - A review. **Lipids in Health and Disease**, v. 6, n. 25, p. 1–16, 2007. Disponível em: <https://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-511X-6-25>. Acesso em: 16 maio 2021.

HILL, J. P. et al. **Effect of the Bovine β -Lactoglobulin Phenotype on the Properties of β -Lactoglobulin, Milk Composition, and Dairy Products**. In: ACS Symposium Series. Washington, 1996. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-1996-0650.ch022>. Acesso em: 04 fev. 2021.

HOLANDA, M. A. C. DE; HOLANDA, M. C. R. DE; MENDONÇA JUNIOR, A. F. DE. Suplementação Dietética De Lipídios Na Concentração De Ácido Linoléico Conjugado Na Gordura Do Leite. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 3, p. 221–229, 2011. Disponível em: <https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/acta/article/view/2305>. Acesso em: 16 maio 2021.

HOLT, C. An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein micelles and its application to the calculation of the partition of salts in milk. **European Biophysics Journal**, v. 33, n. 5, p. 421–434, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14735251/>. Acesso em: 19 ago. 2021.

HORNE, D. S.; PARKER, T. G. Factors affecting the ethanol stability of bovine milk: II. The origin of the pH transition. **Journal of Dairy Research**, v. 48, n. 2, p. 285–291, 1981. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-dairy-research/article/abs/factors-affecting-the-ethanol-stability-of-bovine-milk-ii-the-origin-of-the-ph-transition/376CF7FE1CC716094BAC4A563E51CDDC>. Acesso em: 09 abr. 2021.

HORNE, D. S.; PARKER, T. G. Factors affecting the ethanol stability of bovine milk: I. effect of serum phase components. **Journal of Dairy Research**, v. 48, n. 2, p. 273–284, 1981. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-dairy-research>

research/article/abs/factors-affecting-the-ethanol-stability-of-bovine-milk-i-effect-of-serum-phase-components/45281CA900A9496BE23B87D1C05B4A81. Acesso em: 09 abr. 2021.

HORNE, D. S.; PARKER, T. G. Factors affecting the ethanol stability of bovine milk: V. Effects of chemical modification of milk protein. **Journal of Dairy Research**, v. 49, n. 3, p. 449–457, 1982.

HORNE, D. S.; MUIR, D. D. Alcohol and Heat Stability of Milk Protein. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 12, p. 3613–3626, 1990. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030290790649>. Acesso em: 09 abri. 2021.

HYNES, M. Two Servings of Dairy Per Day are Associated with Less Severe Sleep Apnea. **Journal Advances in Dairy Research**, v. 06, n. 03, p. 1–2, 2018. Disponível em: <https://www.longdom.org/open-access/two-servings-of-dairy-per-day-are-associated-with-less-severe-sleep-apnea.pdf>. Acesso em: 03 fev. 2021.

IBGE. **IBGE | Agência de Notícias | PPM 2017: Rebanho bovino predomina no Centro-Oeste e Mato Grosso lidera entre os estados**. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/22648-ppm-2017-rebanho-bovino-predomina-no-centro-oeste-e-mato-grosso-lidera-entre-os-estados>. Acesso em: 27 maio. 2019.

JENSEN, H. B. et al. Distinct composition of bovine milk from Jersey and Holstein-Friesian cows with good, poor, or noncoagulation properties as reflected in protein genetic variants and isoforms. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 12, p. 6905–6917, 2012.

KADZERE, C. T. et al. Heat stress in lactating dairy cows: A review. **Livestock Production Science**, v. 77, n. 1, p. 59–91, 2002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S030162260100330X>. Acesso em: 10 maio 2021.

KINSELLA, J. E.; WHITEHEAD, D. M. Whey proteins: an overview. **Whey proteins. From milk to medicine**, v. 33, n. 33, p. 1–50, 1989. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043452608601308>. Acesso em: 19 ago. 2020.

KUNG, B. et al. Effect of milk protein intake and casein-to-whey ratio in breakfast meals on postprandial glucose, satiety ratings, and subsequent meal intake. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 10, p. 8688–8701, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30139624/>. Acesso em: 03 jan. 2021.

KLEEN, J. L. et al. Subacute ruminal acidosis (SARA): A review. **Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine**, v. 50, n. 8, p. 406–414, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14633219/>. Acesso em: 10 jun. 2021.

KRUIF, C. G. et al. Casein micelles and their internal structure. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 171–172, n. 1, p. 36–52, 2012.

LI, S. S. et al. Effects of the processing methods of corn grain and soybean meal on milk protein expression profiles in dairy cows. **Animal**, v. 9, n. 2, p. 267–274, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25230338/>. Acesso em: 9 set. 2021.

MACHADO, S. C. **Fatores que Afetam a Estabilidade do Leite Bovino**. 2010. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2010. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/26095/000756935.pdf>. 03 fev. 2021.

MAPA. Instrução Normativa nº76, de 26 de novembro de 2018. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado. **Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 nov. 2018**, v. Seção 1, n. 89, p. 1–9, 2018. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750137/do1-2018-11-30-instrucao-normativa-n-76-de-26-de-novembro-de-2018-52749894IN%2076. Acesso em: 17 abr. 2020.

MARCHEZAN, W. M.; FIALHO, S. DA S. **Estresse térmico em bovinos leiteiros**. 2013. Monografia (Residência em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria. 2013. Disponível em: https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/12457/TCCE_RAPSMVCGA_2013_MARCHEZAN_WILIAN.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 03 fev. 2021.

MARQUES, L. et al. Ocorrência do leite instável ao álcool 76% e não ácido (lina) e efeito sobre os aspectos físico-químicos do leite. **Revista brasileira de Agrociência**, v. 13, n. 1, p. 91–97, 2007.

MARQUES, L. T. et al. Suplementação de vacas holandesas em estádio avançado de lactação. **Ciência Rural**, v. 40, n. 6, p. 1392–1398, 2010. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/28293>. Acesso em: 19 ago. 2020.

MARQUES, L. T. et al. Produção leiteira, composição do leite e perfil bioquímico sanguíneo de vacas lactantes sob suplementação com sal aniônico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 5, p. 1088–1094, 2011.

MARTINS, C. M. M. R. et al. Effect of dietary cation-anion difference on performance of lactating dairy cows and stability of milk proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 4, p. 1–12, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25622868/>. Acesso em 8 de set. 2021.

MARTINS, C. M. M. R. et al. Effect of dietary crude protein degradability and corn processing on lactation performance, milk protein composition, and stability. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 5, p. 4165–4178, 2019. Disponível em: [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(19\)30253-X/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(19)30253-X/fulltext). Acesso em: 10 jun. 2019.

MARX, I. G. et al. Ocorrência de Leite Instável não Ácido na Região Oeste do Paraná. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 13, n. 1, p. 101–112, 2011. Disponível em: <http://revistas.unicentro.br/index.php/RECEN/article/download/1256/1499>. Acesso em: 27

maio 2021.

MOURA, R. et al. Análise físico-química e microbiológica do leite cru comercializado em Roraima. **Boletim do Museu Integrado de Roraima (Online)**, v. 11, n. 02, p. 29–38, 2017. Disponível em: <https://periodicos.uerr.edu.br/index.php/bolmirr/article/view/796>. Acesso em: 06 out. 2019.

MULLER, E. E. II Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil. Anais [...] **Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite**. Maringá, p. 206–217, 2002. Disponível em: <https://www.passeidireto.com/arquivo/92256860/qualidadeleitem>. Acesso em: 10 fev. 2020.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6 ed. São Paulo: Artmed, 2014.

NIEMAN, K. M.; ANDERSON, B. D.; CIFELLI, C. J. The Effects of Dairy Product and Dairy Protein Intake on Inflammation: A Systematic Review of the Literature. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 0, n. 0, p. 1–12, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32870744/>. Acesso em: 03 set. 2020.

OETZEL, G. R. Nutritional manipulation of subacute ruminal acidosis in dairy cattle. **Dynamics in Animal Nutrition**, v. 15, n. 1, p. 307–317, 2003. Disponível em: https://wcds.ualberta.ca/wcds/wp-content/uploads/sites/57/wcds_archive/Archive/2003/Manuscripts/Chapter%2024%20Oetzel%20.pdf. Acesso em: 10 set. 2021.

O'CONNELL, J. E. et al. Influence of ethanol on the rennet-induced coagulation of milk. **Journal of Dairy Research**, v. 73, n. 3, p. 312–317, 2006. Disponível em: [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16674841/#:~:text=Addition%20of%205%25%20\(v%2F,ethanol%20content%20of%20the%20milk](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16674841/#:~:text=Addition%20of%205%25%20(v%2F,ethanol%20content%20of%20the%20milk). Acesso em: 24 maio 2021.

OLIVEIRA, S. G.; SIMAS, J. M. C.; SANTOS, F. A. P. Principais Aspectos Relacionados Às Alterações No Perfil De Ácidos Graxos Na Gordura Do Leite De Ruminantes. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 1, p. 73–80, 2004. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/veterinary/article/view/4049> . Acesso em: 21 set. 2021.

OLIVEIRA, C. A. F. DE et al. Composição e características físico-químicas do leite instável não ácido recebido em laticínio do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12, n. 2, p. 508–515, 2011. Disponível em: <https://periodicos.ufba.br/index.php/rbspa/article/view/40474>. Acesso em: 27 maio 2021.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de Alimentos: Componentes dos Alimentos e Processos**. Rio Grande do Sul: Artmed, v. 1, 2005.

ORLANDINI, I.; TORTELLY NETO, R. Redução de impactos ambientais gerados pela bovinocultura de leite: revisão bibliográfica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 3, n. 1, p. 144–156, 2020. Disponível em: <http://www.themaetscientia.fag.edu.br/index.php/ABMVFAG/article/view/1161>. Acesso em:

03 fev. 2021.

PHILIPPE, M. et al. Physicochemical characterization of calcium-supplemented skim milk. **Le Lait**, v. 83, n. 1, p. 45–59, 2003a. Disponível em: <https://lait.dairy-journal.org/articles/lait/abs/2003/01/04/04.html>. Acesso em: 17 mar. 2021.

PHILIPPE, M. et al. The size of native milk fat globules affects physico-chemical and sensory properties. **Journal of food protection**, v. 72, n. 10, p. 2162–2169, 2003b. Disponível em: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00895488/document>. Acesso em: 17 mar. 2021.

PHILIPPI, S T. **Pirâmide dos alimentos: fundamentos básicos da nutrição** . 2 ed revisada. Barueri: Manole, 2014. 399 p.

RIBEIRO, M. R. E. et al. Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite. Anais [...] **Ensaio Preliminares Sobre o Efeito Do Leite Instável Não Ácido (Lina) Na Industrialização Do Iogurte Batido**. Goiânia, v. 9, p. 1–3, 2006.

RIBEIRO, M. et al. **Nova Metodologia para Verificação do Leite Instável Não Ácido (Lina)**. In: Comunicado Técnico EMBRAPA, 203, 2008. Pelotas. 2008. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/746791/1/comunicado203.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2021.

RIBEIRO, M. E. R. et al. Conferencia internacional sobre leche inestable. Anais [...] **Leite instável no Rio Grande do Sul, importância econômica e social**. Colonia, v. 2, p. 26- 29, 2011. Disponível em: <https://www.bibliotecaagptea.org.br/zootecnia/bovinocultura/artigos/LEITE%20INSTAVEL%20NO%20RS%20IMPORTANCIA%20ECONOMICA%20E%20SOCIAL.pdf>. Acesso em: 20 maio 2021.

ROSA, P. P. et al. Fatores etiológicos que afetam a qualidade do leite e o Leite Instável Não Ácido (LINA). **Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 18, n. 12, p. 1–17, 2017. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/169180/1/Zanaella-Fatores-etiológicos-que-afetam-a-qualidade-do-leite-e-o-Leite.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2021.

SALOMÃO, N. A. et al. Ingestão de cálcio e densidade mineral óssea em mulheres adultas intolerantes à lactose. **Revista de Nutrição**, v. 25, n. 5, p. 587–595, 2012.

SALZANO, I. J. Symposium series 007. Anais [...] **Nutritional supplements: practical applications in sports, human performance and life extension**. São Paulo, p. 75-202, 2002.

SANTOS, M. V. dos.; FONSECA, L. F. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. 6 ed. São Paulo: Manole Editora, 2007. Disponível em: <https://www.worldcat.org/title/estrategias-para-controle-de-mastite-e-melhoria-da-qualidade-do-leite/oclc/124028436>. Acesso em: 18 de ago. 2020.

SILANIKOVE, N.; SHAPIRO, F.; SHINDER, D. Acute heat stress brings down milk secretion in dairy cows by up-regulating the activity of the milk-borne negative feedback regulatory system. **BMC Physiology**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2009.

SCARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. 1 ed. São Paulo: Editora Livraria Valela, 1996.

SHAMAY, A. et al. Infusions of casein hydrolyzates into the mammary gland disrupt tight junction integrity and induce involution in cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 4, p. 1250–1258, 2003.

SILVA, C. C. DA; TEIXEIRA, A. S.; GOLDBERG, T. B. L. Impacto da ingestão de cálcio sobre a mineralização óssea em adolescentes. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 3, p. 351–359, 2004.

SINGH, H. Heat stability of milk. **Journal of Dairy Research**, v. 47, n. 2/3, p. 199–210, 2004.

SIQUEIRA, K. B. **O mercado consumidor de leite e derivados**. *In*: Comunicado Técnico EMBRAPA GADO DE LEITE, 120, 2019. Minas Gerais. v. 1, p. 17, 2019. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1110792/o-mercado-consumidor-de-leite-e-derivados>. Acesso em: 01 fev. 2021.

SOUZA, C. R. DE; SILVA, F. C. Discutindo o contexto das definições de ácido e base. **Química Nova na Escola**, v. 40, n. 1, p. 14–18, 2018. Disponível em: http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc40_1/04-CCD-52-17.pdf. Acesso em: 08 jan. 2021.

STELWAGEN, K.; SINGH, K. The role of tight junctions in mammary gland function. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 19, n. 1, p. 131–138, 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%252Fs10911-013-9309-1>. Acesso em: 10 abr. 2021.

STUMPF, M. T. et al. Metabolic attributes, yield and stability of milk in jersey cows fed diets containing sodium citrate and sodium bicarbonate. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 5, p. 564–567, 2013a.

STUMPF, M. T. et al. Severe feed restriction increases permeability of mammary gland cell tight junctions and reduces ethanol stability of milk. **Animal**, v. 7, n. 7, p. 1137–1142, 2013b.

STUMPF, M. T. et al. Mammary gland cell's tight junction permeability from dairy cows producing stable or unstable milk in the ethanol test. **International Journal of Biometeorology**, v. 64, n. 11, p. 1981–1983, 2020.

TEIXEIRA, R. D. **Efeitos da adição do citrato de sódio sobre o índice crioscópico e a estabilidade da proteína do leite**. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Medicina Veterinária) - Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos. Distrito Federal. Gama. 2019. Disponível em: https://dspace.uniceplac.edu.br/bitstream/123456789/204/1/Renata_Teixeira_0001196.pdf. Acesso em: 09 abr. 2021.

TOZZETTI, D. S.; BATAIER, M. B. N.; ALMEIDA, L. R. DE. Prevenção, Controle E

Tratamento Das Mastites Bovinas – Revisão De Literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 6, n. 10, p. 7, 2008.

TRONCO, V. M. **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite**. 5 ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2013. 208 p.

TSIOULPAS, A.; LEWIS, M. J.; GRANDISON, A. S. Effect of Minerals on Casein Micelle Stability of Cows' Milk. **Journal of Dairy Research**, v. 74, n. 2, p. 167–173, 2007.

TUINIER, R.; KRUIF, C. G. Stability of casein micelles in milk. **Journal of Chemical Physics**, v. 117, n. 3, p. 1290–1295, 2002.

VARGAS, D. P. DE et al. Correlações entre contagem de células somáticas e parâmetros físico-químicos e microbiológicos de qualidade do leite. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, n. 4, p. 473–483, 2014.

VELLOSO, C R V. **Noções básicas da acidez**. In: BRITO, J. R. F.; DIAS, J. C. (Ed). **Qualidade do leite**, Embrapa, São Paulo: Tortuga, 1998. 8p.

VIERO, V. **Efeito da suplementação com selênio no perfil bioquímico sanguíneo e características físico-químicas do leite normal e do leite instável não ácido**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2008. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/14336>. Acesso em: 10 abr. 2021.

VOGES, J. G. et al. Relationship between farm structure and animal feed in unstable non-acid milk occurrence in Planalto Norte of Santa Catarina. **Ciencia Animal Brasileira**, n. 19, p. 1–13, 2018.

WALSTRA, P. Casein sub-micelles: Do they exist? **International Dairy Journal**, v. 9, n. 3–6, p. 189–192, 1999.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Química y física lactológica**. 1 ed. Zaragoza: Editora Acribia, 1984. 423 p.

WATTIAUX, M. A. **Composição do leite e seu valor nutricional**. In: **Essenciais em Gado de Leite** - Instituto Babcock para a Pesquisa e Desenvolvimento da Pecuária Leiteira Internacional, 2008. Babcock. p. 73-76.

YE, A. Functional properties of milk protein concentrates: Emulsifying properties, adsorption and stability of emulsions. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 1. p. 14–20, 2011.

ZANELA, M. B. et al. Leite instável não-ácido e composição do leite de vacas Jersey sob restrição alimentar. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 41, n. 5, p. 835–840, 2006.

ZANELA, M. B. et al. Ocorrência do leite instável não ácido no noroeste do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 61, n. 4, p. 1009–1013, 2009.

CAPÍTULO 2 - ESTABILIDADE DO LEITE: CARACTERÍSTICAS FÍSICO - QUÍMICAS E PARÂMETROS DE DESEMPENHO DE REBANHOS ESPECIALIZADOS DAS RAÇAS HOLANDESA E JERSEY

2.1 INTRODUÇÃO

A estabilidade das proteínas do leite frente ao processamento térmico é uma questão importante para as indústrias de lácteos, especialmente para a fabricação de produtos que sofrem aquecimento sob elevadas temperaturas (MARTINS *et al.* 2015). A produção de derivados do leite é uma das principais atividades das indústrias de lácteos. Os principais derivados produzidos industrialmente em 2018, foram queijo (8,3 milhões de litros), leite *Ultra High Temperature* (UHT) (6,8 milhões de litros) e leite em pó (5,8 milhões de litros) (EMBRAPA, 2019).

A utilização do leite instável não ácido (LINA) por parte da indústria pode ocasionar menor rendimento no processamento uma vez que este tipo de leite pode apresentar menores teores de lactose e proteína (OLIVEIRA *et al.* 2011). Outro problema causado pela instabilidade do leite é a ocorrência de precipitação durante o processo UHT, aderindo-se aos equipamentos e resultando na elevação dos custos de limpeza e aumento no descarte de leite (ROSA *et al.* 2017), aumentando a sedimentação inclusive dentro da embalagem, além da redução da qualidade do produto final.

No Paraná, o município de Castro foi considerado como referência em produção de leite, genética e produtividade, conquistando o título de Capital Nacional do Leite (BRASIL, 2017). Este resultado justifica-se pela alta seleção genética do rebanho, nutrição de precisão, controle sanitário rigoroso e tecnificação no manejo dos animais (EMBRAPA, 2018). Apesar do destaque nacional, a ocorrência de LINA no município e região tem sido frequente em determinadas épocas do ano. Por este motivo, as indústrias da região têm adotado medidas como descontos significativos no preço pago por litro de leite e até mesmo a rejeição do leite instável, além do maior rigor do teste, utilizando concentrações elevadas do álcool (superiores a 78%) (COMUNICAÇÃO PESSOAL).

De acordo com a legislação em vigência (IN 76/77), a prova do etanol deve ser realizada na concentração alcoólica de 72% v/v, mas não há limite máximo para a concentração alcoólica (BRASIL, 2018). A prova do etanol vem sendo realizada ao longo dos anos pela indústria, como parâmetro para determinar a estabilidade do leite a ser submetido ao

processamento térmico (BARBOSA *et al.* 2009). Quando positivo no teste, o leite poderá ser recusado pelas indústrias, pois estas alegam que este não é termoestável, além de poder ser classificado erroneamente como leite ácido (BACKES; STEFANI; PASETTI, 2012).

No entanto, muitas indústrias estão adotando graduações alcoólicas superiores à preconizada na legislação, com o intuito de obter uma matéria prima com melhor qualidade, principalmente com relação à estabilidade térmica (SILVA *et al.* 2012). Entretanto, não há uma correlação positiva entre o aumento da graduação alcoólica da prova do etanol com o aumento na resistência térmica do leite industrialmente (MOLINA *et al.* 2001). Por outro lado, leite estável em concentrações alcoólicas maiores poderá apresentar maior resistência térmica, embora qual a melhor concentração etanólica não esteja bem estabelecida (KELLY, 2006). De acordo com Shew (1981), estabilidade ao etanol fornece uma maneira simples de indicar se o leite bovino é adequado para o processamento UHT, com a estabilidade do etanol de 74% v/v sendo o limite abaixo do qual o leite não é adequado. A estabilidade ao calor é importante no processo de fabricação de produtos lácteos duráveis, como leite em pó, comida para bebês, suplementos dietéticos e leite condensado sem açúcar, bem como leite esterilizado.

Desta forma, o teste não é considerado específico por pesquisadores (MARQUES *et al.* 2007; ZANELA *et al.* 2009; OLIVEIRA *et al.* 2011), pois grande parte das amostras que precipitam no teste apresentam resistência térmica aceitável para processamentos industriais menos desafiadores. Assim, o uso de concentrações alcoólicas mais elevadas levaria a um aumento de resultados falsos positivos, podendo contribuir para o descarte ou a subvalorização do leite, sendo que esse leite poderia ser utilizado em processamentos térmicos mais brandos (FISCHER *et al.* 2012).

O álcool da solução age como desidratante, ocasionando redução dielétrica do meio, e deste modo, promove o aumento da dissolução de sais e a redução da carga negativa das micelas de caseína (NELSON; COX, 2014). No entanto, são vários fatores que podem causar instabilidade do leite, entre eles a genética (DAVIS *et al.* 2001), número de lactações, estágio de lactação (OMOARUKHE *et al.* 2010), fatores nutricionais, ambientais (estresse, estação do ano, manejo) (ZANELA *et al.* 2006), desordens metabólicas (MARQUES *et al.* 2010), sanidade, sazonalidade e a concentração de sais no leite, principalmente de cálcio iônico (HORNE; PARKER, 1982).

No Paraná, existem poucos estudos avaliando os casos de LINA (MARX *et al.* 2011, SILVA *et al.* 2012, RIBEIRO JÚNIOR, J. C.; BELOTI, V.; SILVA, L. C. C.; TAMANINI. 2013, FAGNANI *et al.* 2014; FAGNANI *et al.* 2016) e as limitações de seu uso na indústria. Com relação a região dos Campos Gerais, não há estudos científicos publicados avaliando a estabilidade do leite frente à prova do etanol, e existe uma preocupação das indústrias da região com essa questão. Embora o percentual de produtores acometidos por casos de instabilidade na região não seja conhecido, as indústrias estão preocupadas com a qualidade de sua matéria prima pois, a região dos Campos Gerais é considerada uma das bacias leiteiras mais tecnificadas do país. As indústrias da região possuem especificações mais rígidas com relação a estabilidade e aos padrões de qualidade do leite produzido, com descontos que podem chegar até 7% no pagamento por litro quando o leite é considerado instável ao etanol 78% v/v (COMUNICAÇÃO PESSOAL).

Diante dos prejuízos causados ao produtor e à indústria, a análise dos casos de instabilidade e os fatores relacionados são importantes para a definição de estratégias que visem o aumento da qualidade do leite. Sendo assim a presente pesquisa teve como objetivo avaliar o nível de estabilidade do leite ao etanol e sua relação com as características físico-químicas do leite e com os parâmetros de desempenho de rebanhos especializados das raças Holandesa e Jersey, em propriedades com elevado grau de tecnificação.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido em duas propriedades leiteiras no município de Carambeí-PR (24°57'09.9"S 50°07'04.6"W), no período de 21 de janeiro a 25 de março de 2020, compreendendo a estação do verão, devido ao maior número de registros de casos de instabilidade do leite. O clima da região, segundo a classificação de Köppen, é do tipo Cfb, com verões brandos e precipitação pouco superior a 1.400 mm, com chuvas bem distribuídas durante o ano (ALVARES *et al.* 2013). Durante o período experimental a temperatura mínima foi de 17°C e máxima de 25°C, com precipitação média de 153 mm (CLIMATEMPO, 2020).

O critério de escolha das duas propriedades baseou-se na produtividade dos animais, com médias de 39,3 litros/vaca/dia do rebanho de raça Holandesa e 25 litros/vaca/dia do rebanho da raça Jersey, criados em sistema de confinamento (Tie-stall e Compost Barn),

caracterizando os rebanhos especializados com elevado grau de tecnificação que representam a região.

2.2.1 Descrição do rebanho da raça Holandesa – Sistema de confinamento Tie-stall

Neste experimento o rebanho foi composto por 189 animais da raça Holandesa de alta produção (média de 39,3 litros/vaca/dia), sendo avaliadas amostras de leite de 63 vacas mantidas em sistema de confinamento Tie-stall. As vacas foram alojadas em dois barracões totalmente fechados, com paredes de alvenaria e cortinas. A instalação contou com um sistema de ventilação forçada, por meio de placas evaporativas em uma das extremidades do barracão e ventiladores e exaustores em outra extremidade. A temperatura média no barracão foi de 21,6°C e a umidade relativa de 81%, monitoradas por meio de um painel eletrônico. O material usado nas camas foi o colchão de borracha, utilizando-se cal para higienização.

As amostras de leite foram colhidas quinzenalmente, em quatro períodos, totalizando 252 amostras, sendo 42,1% provenientes de vacas de primeiro parto e 57,9% de vacas de múltiplos partos, variando entre a primeira até à sétima lactação. O número de dias em leite (DEL) médio do rebanho foi de 175,1±155.

Os animais foram ordenhados três vezes ao dia, às 05:00h; 14:00h e 22:00h, em sistema de ordenha balde ao pé, com 4 conjuntos. Para a colheita das amostras de leite foram acoplados quatro medidores graduados e a amostragem realizada ao final da ordenha. A dieta das vacas foi formulada com base nas exigências nutricionais de vacas com produção média de 40 litros/vaca/dia (Tabela 1), ocorrendo variação apenas na quantidade fornecida à cada animal, sem a formação de lotes. A água foi fornecida à vontade, em bebedouros com boias.

Tabela 1 – Composição química da dieta das vacas em lactação

Ingrediente	% de MS	MS (%)	PB (%)	FDN (%)	FDA (%)	EE (%)
Silagem de Milho	0,37	34,6	7,4	37,2	19,5	3,3
Silagem de Cevada	0,06	30,4	13,1	44,9	26,7	3,3
Pré Secado Azéveo	0,09	57,4	21,7	47,6	28,4	3,3
Concentrado*	0,37	89,7	21,4	21,4	12,6	3,1
Resíduo de Cervejaria	0,02	16,8	24,8	53,2	-	10,8
Caroço de Algodão	0,05	92,0	23,5	50,3	40,1	18,6
Palha de Trigo	0,008	92,0	4,8	78,9	56,8	1,6

MS: Matéria seca; PB: proteína bruta; FB: fibra bruta; FDN: fibra insolúvel em detergente neutro; FDA: fibra insolúvel em detergente ácido; EE: extrato etéreo.

*Composição concentrado em % da MS: açúcar: 5,60%, amido: 31,44%, cálcio: 1,51%, fósforo: 0,46%, magnésio: 0,35%, potássio: 0,83%, enxofre: 0,34%, sódio: 0,85% e cloro: 0,38%.

Fonte: A autora.

2.2.2 Descrição do rebanho da raça Jersey – Sistema de confinamento Compost Barn

Nesta propriedade o rebanho foi composto por 525 animais da raça Jersey de alta produção (média de 25 litros/vaca/dia), sendo avaliadas no experimento 71 vacas em lactação. Os animais foram mantidos em confinamento em sistema Compost Barn, com aproximadamente 14 m² por animal. Utilizou-se serragem como cama para a compostagem dos dejetos, revolvida duas vezes ao dia. O barracão foi dividido em uma área destinada à alimentação dos animais, com canzins, e outra para o descanso coletivo, onde os animais permaneceram entre as ordenhas. A instalação possui um sistema de ventilação (ventiladores grandes de teto de baixa rotação) sem aspersores.

Foram realizadas três amostragens quinzenais de leite, totalizando 213 amostras, 47,4% de vacas primíparas e 52,6% de vacas múltíparas (de duas a cinco lactações), com DEL médio de 131,9±73,6. Os animais foram divididos em dois lotes (média e alta produção). No lote de alta produção as vacas produziam em média acima de 18 litros/vaca/dia e o lote de média produzia abaixo de 18 litros/vaca/dia. As vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia, às 04:00h e 14:30h e permaneciam em uma sala de espera com aspersores. A ordenha foi realizada em sala tipo espinha de peixe com fosso com 10 conjuntos, com medidores eletrônicos e extratores automáticos de teteiras. A dieta foi formulada de modo a atender os requerimentos nutricionais dos animais com produção média de 28 litros/vaca/dia (lote alta produção) e de 18 litros/vaca/dia (lote média produção), ocorrendo variação apenas no

consumo de matéria seca (MS) de cada animal (Tabela 2). A dieta foi fornecida à vontade em comedouros coletivos, de acordo com o respectivo lote, e a água foi fornecida à vontade em bebedouros.

Tabela 2 – Composição química das dietas dos lotes de alta produção de leite (acima de 28 L/vaca/dia) e de média produção de leite (abaixo de 18 L/vaca/dia) das vacas da raça Jersey

Lote	Ingredientes	% de MS	MS (%)	PB (%)	FDN (%)	FDA (%)	EE (%)
Alta produção	Silagem de Milho	0,48	36	8,4	38,8	17,6	4,1
	Pré Secado Azevém	0,08	52,5	14,5	55,5	29,7	3,8
	Concentrado*	0,34	-	9,71	15,3	17,0	2,8
	Caroço de Algodão	0,06	92,0	23,5	50,3	40,1	18,6
	Milho Úmido	0,03	60,8	8,4	9,4	3,2	4,6
Média Produção	Silagem de Milho	0,49	36	8,4	38,8	17,6	4,1
	Pré Secado Azevém	0,15	52,5	14,5	55,5	29,7	3,8
	Concentrado*	0,35	-	9,71	15,3	17,0	2,8

MS: Matéria seca; PB: proteína bruta; FB: fibra bruta; FDN: fibra insolúvel em detergente neutro; FDA: fibra insolúvel em detergente ácido; EE: extrato etéreo.

*Composição concentrado em % da MS: açúcar: 1,55%, amido: 39,14%, cálcio: 1,87%, fósforo: 0,40%, magnésio: 0,79%, potássio: 0,25%, enxofre: 0,29%, sódio: 1,28% e cloro: 0,57%.

Fonte: A autora.

2.2.3 Colheita das amostras de leite

A colheita das amostras foi realizada nas duas propriedades, quinzenalmente, na ordenha da tarde (14:00h – vacas do sistema Tie-stall e às 14:30h – vacas do sistema Compost Barn), em frascos plásticos de 200 mL, devidamente identificados, sem adição de conservantes. A amostragem foi realizada após a ordenha completa de cada animal, com o auxílio de coletores automáticos com agitação, acoplados no sistema de ordenha de cada propriedade. As amostras foram acondicionadas em caixas térmicas com gelo, e transportadas para Centro Mesorregional de Excelência em Tecnologia do Leite (CMETL), pertencente à Universidade Estadual de Ponta Grossa para a realização das análises laboratoriais. No laboratório as amostras foram armazenadas sob refrigeração a 4° C durante aproximadamente 11 horas. As amostras foram destampadas durante este período para a volatilização do gás carbônico.

2.2.4 Análises laboratoriais

2.2.4.1 Acidez titulável

A acidez titulável ou acidez Dornic (°D) foi determinada pela metodologia descrita por Tronco (2010), onde se pipetavam 10 mL de leite e adicionados 4 a 5 gotas do indicador ácido-básico fenolftaleína. Em seguida foi realizada a titulação com solução de hidróxido de sódio (NaOH), até que a amostra atingisse seu ponto de viragem, com coloração ligeiramente rósea. A análise de acidez do leite do rebanho da raça Holandesa (sistema Tie-stall) foi realizada em duplicata e a análise do leite da raça Jersey (sistema Compost barn) ocorreu sem repetição devido ao menor volume coletado pelo medidor mecânico acoplado a ordenha, que não foi suficiente para a realização das análises em duplicata. A acidez foi determinada em graus Dornic, e calculada por meio da fórmula, segundo Tronco (2010):

$$\text{Acidez Dornic} = \text{valor obtido da titulação} * \text{fator de correção da solução de NaOH} * 10.$$

As amostras foram classificadas de acordo com a acidez em: a) Leite com pH normal: = acidez entre 14 – 18 °D, considerado com pH entre 6,6-6,8; b) Leite ácido: com acidez superior a 18 °D, com pH abaixo de 6,6; c) Leite alcalino: com acidez inferior a 14 °D, com pH acima de 7,0.

2.2.4.2 Prova do Etanol

O teste de estabilidade do leite foi realizado por meio da metodologia descrita por Tronco (2010), utilizando-se as seguintes concentrações de etanol: 72, 76, 78, 80% v/v. Foram pipetados 2 mL de leite e 2 mL da solução de etanol nas respectivas concentrações, em *placas de petri* e em seguida homogeneizada e analisada visualmente, observando-se a presença ou não de precipitação. A avaliação da estabilidade do leite foi feita a partir da observação visual da presença de coágulos (grumos). O valor considerado como instável foi a menor concentração do etanol que induziu a coagulação. Amostras que não coagularam usando a solução etanólica com 80% v/v foram consideradas como estáveis a 82% v/v.

A partir desses valores, as amostras leite foram classificadas em três níveis de estabilidade: alta (A): amostras com estabilidade em etanol acima de 80% v/v; intermediária (I): amostras com estabilidade em etanol entre 78 – 80% v/v; baixa (B): amostras com estabilidade em etanol entre 72 – 76% v/v.

Em função da elevada proporção de amostras de leite em ambas as raças com estabilidade intermediária e alta, optou-se por considerar como LINA as amostras com precipitação em solução de etanol na concentração menor ou igual a 76% v/v e acidez dentro da faixa normal. Portanto, amostras com acidez entre 14 – 18°D e estabilidade baixa (entre 72 e 76%) foram classificadas como LINA.

2.2.4.3 Concentração de cálcio iônico

A análises da concentração de cálcio iônico (Ca^{2+}) no leite foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Barros *et al.* (1999), através de potenciometria. As amostras foram coletadas em frascos plásticos de 200 mL logo após a ordenha, e acondicionados em caixas térmicas com gelo. Após a colheita, as amostras foram mantidas em refrigeração por um período de 1h, em temperatura média de 4°C. Foi utilizado um potenciômetro digital da marca Orion®, com eletrodo combinado de referência e seletivo para íons cálcio. Antes da realização das análises o eletrodo foi submetido a um período de sensibilização, durante 12 horas em solução padrão de cálcio de 1.000 ppm. No dia seguinte, antes da realização das análises o equipamento foi calibrado com as soluções padronizadas nas seguintes concentrações: 50 mL de solução padrão de cálcio 500 ppm e 100 mL de solução padrão de cálcio 50 ppm. Em cada solução foi adicionado 1 mL da solução *Ionic Strength Adjustor* (ISA - solução de ajuste iônico de cloreto de potássio (KCl)).

As determinações de cálcio iônico nas amostras de leite da raça Holandesa foram realizadas utilizando-se 50 mL de leite e 1 mL da solução ISA. Para as amostras de leite da raça Jersey utilizou-se um volume menor (25 mL de leite e 0,5 mL da solução ISA) devido à menor quantidade de leite ordenhado, porém, manteve-se a mesma proporção de leite: solução ISA. Logo após a preparação das amostras de leite, o eletrodo foi inserido para a quantificação de Ca^{2+} , expressa em mg/L.

2.2.4.4 Crioscopia

A análise do índice crioscópico do leite foi realizada por meio de um crioscópio da marca Minilak®, seguindo as instruções do fabricante. Foram pipetados 2 a 2,5 mL de leite de cada amostra em tubos de vidro, e em seguida analisados no crioscópio. Os resultados foram expressos em graus Hortvet (°H).

2.2.4.5 Análises químicas do leite

A amostragem do leite foi realizada no mesmo dia do controle leiteiro oficial no rebanho da raça Holandesa, e no dia seguinte ao controle leiteiro no rebanho da raça Jersey devido ao menor volume de leite coletado pelos coletores mecânicos acoplados em cada ordenha, que impossibilitou a realização de duas amostragens. As análises químicas do leite foram realizadas mensalmente e foram analisadas na Associação Paranaense de Criadores da Raça Holandesa (APCBRH), em Curitiba-PR. As análises de proteína, gordura, lactose e sólidos totais (ST) foram determinadas por espectrofotômetro de infravermelho (B 2300 Combi, BentleyInstruments) (AOAC, 2016) e as análises de contagem de células somáticas (CCS) por Citometria de Fluxo (Somacount[®]-500, BentleyInstruments) segundo a metodologia de Prescott; Breed, (1910). Após as análises os dados foram disponibilizados através do controle leiteiro oficial de cada propriedade para serem utilizados na pesquisa.

2.2.5 Avaliação de escore de condição corporal

As avaliações de escore de condição corporal (ECC) foram realizadas em ambas as propriedades (Holandesa e Jersey), quinzenalmente, antes da ordenha da tarde.

Para a avaliação do ECC foi utilizada a metodologia proposta por Edmonson *et al.* (1989). Esta se baseia em avaliações visuais das reservas corporais em pontos específicos do corpo do animal, utilizando escala de 1 a 5, com subunidades de 0,25 pontos. O valor 1 se refere a vaca muito magra e 5, muito gorda. As avaliações de ECC foram feitas por dois avaliadores.

2.2.6 Avaliação de escore de células somáticas

A CCS das vacas Holandesas e Jersey foram transformadas em escore linear de células somáticas (ECS) de acordo com a metodologia de Dabdoub; Shook (1984), por não apresentarem distribuição normal. A CCS foi transformada em escore linear através de uma escala logarítmica de acordo com a função:

$$EL: [\text{Log}_2(\text{CCS}/100.000)]+3$$

Os ECS foram classificados em 10 categorias variando de 0 a 9 (Tabela 3).

Tabela 3 – Escore linear e a contagem de células somáticas

Escore linear	CCS (x 1000 céls/mL)	
	Ponto Médio	Variação
0	12,5	0 – 17
1	25	18 – 34
2	50	35 – 70
3	100	71 – 140
4	200	141 – 282
5	400	283 – 565
6	800	566 – 1.130
7	1.600	1.131 – 2.262
8	3.200	2.263 – 4.525
9	6.400	Acima de 4.525

Fonte: (SHOOK, 1982)

2.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os dados foram classificados por raça e as análises estatísticas foram realizadas dentro de cada raça, separadamente. Os resultados foram avaliados primeiramente de forma descritiva, usando os procedimentos UNIVARIATE e FREQ do programa estatístico SAS[®], para o cálculo dos valores de média, mediana, moda, amplitude, coeficiente de variação e avaliação da normalidade (teste Shapiro-Wilk). A análise de correlação entre as variáveis foi realizada utilizando PROC CORR (coeficiente de Spearman) do SAS[®].

A associação linear da estabilidade do leite (EST) com as variáveis independentes número de partos (NPARTOS), dias em lactação (DEL), concentração de ST, CCS, escore de condição corporal (ECC), estabilidade no teste do álcool (EST, variando de 72 a 82%), concentração de cálcio iônico (Ca_i), acidez titulável e crioscopia foi testada usando o procedimento REG do SAS[®], opção de seleção de variáveis stepwise.

Para determinar a associação das variáveis na explicação da dispersão dos dados, foi realizada a análise multivariada, mais especificamente a análise de fatores principais (FP). Previamente os dados foram padronizados usando o procedimento STANDARD, e os valores foram transformados considerando média = 0 e desvio padrão = 1, reduzindo o efeito das magnitudes desiguais entre as variáveis originais. A opção *Measurement System Analysis* (MSA) foi utilizada para selecionar as variáveis a serem mantidas no modelo para a análise de

FP. Foram retidas as variáveis NPARTOS, DEL, concentrações de ST, CCS, ECC, estabilidade no teste do etanol nas concentrações citadas, concentração de Ca_i , acidez titulável e crioscopia com *eigenvalues* iguais ou superiores a 1,0, que foram obtidos a partir das matrizes de covariância ou de correlação, que expliquem o máximo da variabilidade dos dados. Os valores individuais (de cada combinação vaca x dia) dos escores de fatores principais foram calculados com o procedimento SCORE do SAS®.

As regressões logísticas foram calculadas para determinar quais as características originais e quais fatores principais aumentaram o risco de ocorrência de LINA, usando o procedimento LOGISTIC do SAS® (opção backward). O modelo usado para a regressão logística foi:

$$\text{logit}(p) = \beta_0 + \beta_1 x_i$$

Onde:

p: é a probabilidade de ocorrência de LINA;

x: é a variável independente (variáveis originais ou FP);

β : é o coeficiente de regressão.

Os valores de composição do leite, condição corporal, e características reprodutivas de vacas produzindo leite com diferentes classes de estabilidade foram avaliados usando análise de variância, procedimento GLM do SAS® e opção LSmeans para separação das médias. Os resultados da análise de CCS foram transformados em log10 para a análise estatística. Os valores P foram considerados significativos a <0,05.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Raça Holandesa

Os valores relativos à análise descritiva encontram-se na Tabela 4. A produção de leite apresentou grande variação, sendo que 78,4% dos animais tiveram produções de leite acima de 30 litros/vaca/dia e apenas 21,1% com produções inferiores. O DEL variou entre 3 e 866 dias, sendo que 27% dos animais apresentaram DEL menor que 100 dias e apenas 15,1% tiveram DEL acima de 300 dias. A maior concentração de animais (47%) ocorreu com DEL médio entre 180 dias.

Tabela 4 – Análise descritiva dos índices reprodutivos, do escore de condição corporal e das características físico-químicas do leite de vacas da raça Holandesa

Variável	n	Média	Mediana	Moda	Amplitude	CV (%)
NPARTOS	252	2,5	4	1	1 – 7	0,5
PL (litros/vaca/dia)	171	39,6	40,4	42,4	13,4 – 66,9	0,2
DEL (dias)	252	173,3	190,5	300	3 – 866	0,7
ECC (pontos)	252	3,1	3,1	3	2,1 – 4,2	0,2
Gordura (g/100g)	244	3,50	3,53	3,40	1,58 – 6,30	0,2
Proteína (g/100g)	244	3,40	3,40	3,10	2,63 – 4,42	0,1
Lactose (g/100g)	244	4,70	4,70	4,80	3,77 – 5,20	0,06
ST (g/100g)	244	12,60	12,60	12,40	9,62 – 15,75	0,08
CCS (mil céls/mL)	244	82,3	72,5	17	3 – 1.397	1,5
EST (% v/v)	252	80	78	82	72 – 82	0,04
CA _i (mg/L)	252	85,5	74,5	100	39 – 180	0,3
Acidez (°D)	252	15	16	15	11 – 23	0,2
CRIO (°H)	251	-0,543	-0,543	-0,540	-0,520 a -0,574	-0,02

NPARTOS: número de partos; PL: produção de leite; DEL: dias em leite; ECC: escore de condição corporal; ST: sólidos totais; CCS: contagem de células somáticas; EST: estabilidade ao etanol; CA_i: concentração de cálcio iônico; CRIO: índice crioscópico; CV: coeficiente de variação.

Fonte: A autora.

O ECC apresentou variação entre a escala de 2,1 a 4,2, sendo que 42,5% dos animais tiveram escore entre 2,1 a 3 e 44,4% com escore entre 3,1 a 3,5. A composição do leite apresentou grande variação, principalmente com relação aos teores de gordura (1,58 a 6,3%). Cerca de 75,8% das amostras apresentaram teores de gordura acima de 3,0 g/100g e 24,2% das amostras com teores inferiores a 3,0 g/100g. Com relação aos teores de proteína, 88% das amostras tiveram teores acima de 3,0 g/100g, e 12% das amostras foram inferiores à 3,0 g/100g. Os teores de lactose em 77,9% das amostras, ficaram acima de 4,6 g/100g. O percentual de amostras com ST acima de 12,0 g/100g foi de 72,1%. Com relação à CCS do rebanho, apenas 10,6% das amostras avaliadas apresentavam níveis superiores a 200 mil céls/mL, sendo que apenas 2,5% das amostras tiveram CCS acima de 500 mil céls/mL.

A avaliação da estabilidade do leite em quatro concentrações alcoólicas mostrou maior proporção de amostras (73%) estáveis ao etanol a 80% v/v. A concentração média de cálcio iônico no rebanho variou de 39 a 180 mg/L, sendo que 44,4% das amostras apresentaram concentrações menores que 80 mg/L, e 19% com concentrações superiores a 100 mg/L. A acidez teve variação de 11 a 23 °D, no entanto, 89% das amostras apresentaram acidez entre 14 a 18 °D. Apenas 7,1% das amostras apresentaram acidez inferior a 13 °D e

3,6% com acidez superior a 18 °D. Com relação à crioscopia, verificou-se que 76% das amostras apresentaram índice crioscópico de -0,520 à -0,549 °H.

As frequências de gordura, proteína, lactose, ST, CCS, estabilidade (EST), acidez e crioscopia (CRIO) estão descritas na Tabela 5. Os resultados das frequências foram divididos de acordo com os parâmetros exigidos pela legislação (IN 76/77) em vigência (MAPA, 2018) que estabelece os padrões de qualidade do leite. Conforme a IN nº 76 o leite de tanque deve apresentar teores de gordura iguais ou superiores à 3,0 g/100g, proteína igual ou superior à 2,9 g/100g, lactose maior ou igual a 4,3 g/100g, ST maior ou igual a 11,4 g/100g e CCS menor ou igual a 500 mil céls/mL, deve apresentar-se estável em uma concentração alcoólica mínima de 72% v/v, com acidez entre 14 – 18 °D e índice crioscópico entre -0,530 à -0,555 °H.

Tabela 5 – Frequência amostral dos teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST), contagem de células somáticas (CCS), estabilidade ao etanol (EST), acidez, crioscopia (CRIO) de amostras de leite de vacas da raça Holandesa e níveis recomendados pela IN 76/77

Variável	Frequência amostral na mesma faixa		
Gordura (g/100g)	< 3,0** 24,2%	-	≥ 3,0* 75,8%
Proteína (g/100g)	< 2,9** 5,3%	-	≥ 2,9* 94,7%
Lactose (g/100g)	< 4,3** 7,0%	-	≥ 4,3* 93,0%
ST (g/100g)	< 11,4** 14,3%	-	≥ 11,4* 86,0%
CCS (mil céls/mL)	< 200 89,0%	200 – 500* 8,6%	> 500** 2,5%
EST (% v/v)	≤ 72* 9,5%	76 – 78 9,1%	≥ 80 81,4%
Acidez (°D)	< 14* 7,1%	14 – 18* 89,2%	> 18** 3,7%
CRIO (°H)	> -0,530** 2,8%	-0,530 a -0,555* 91,2%	< -0,555** 6%

*Valores de referência segundo a Instrução Normativa 76, IN 76/77 (BRASIL, 2018). **Valores fora dos padrões preconizados pela IN 76/77 77 (BRASIL, 2018).

Fonte: A autora.

Uma alta frequência de amostras individuais apresentou valores compatíveis com aqueles exigidos pela IN76 para leite de tanque, e apenas um pequeno percentual de amostras (menos de 15%) apresentou níveis de proteína, lactose e ST, inferiores aos preconizados pela legislação. No entanto, deve-se destacar que 24,2% das amostras apresentaram teor de gordura inferior à 3,0 g/100g, agravadas pela coleta na ordenha da tarde, ou seja, abaixo do

preconizado pela legislação vigente. Com relação aos teores de ST, cerca de 75,8% das amostras tiveram teor de gordura acima de 3,0 g/100g; 94,7% das amostras apresentaram teor de proteína acima de 3,0 g/100g, 93% com percentual de lactose igual ou superior a 4,3 g/100g e 86% com ST igual ou maior que 11,4 g/100g.

Aproximadamente 89% das amostras apresentaram CCS inferior a 200 mil céls/mL e 2,5% apresentaram valores acima de 500 mil céls/mL. Apenas 9,5% das amostras de leite apresentaram estabilidade igual ou inferior a 72% v/v e 81,4% apresentaram estabilidade alta (acima a 80% v/v). Com relação aos demais parâmetros analisados, cerca de 89,2% das amostras de leite apresentaram acidez entre 14 – 18°D e 91,2% apresentaram CRIO entre -0,530 a -0,555 °H, ou seja, dentro do preconizado pela IN 76/77.

A partir dos valores de estabilidade as amostras de leite foram classificadas em três níveis de estabilidade: alta (estabilidade em etanol acima de 80% v/v), intermediária (estabilidade em etanol entre 78 – 80% v/v) e baixa (estabilidade em etanol entre 72 – 76% v/v). De acordo com a classificação aproximadamente 72,6% das amostras não coagularam quando submetidas ao teste do etanol à 80% v/v, sendo então consideradas amostras de alta estabilidade. Apenas 13,5% das amostras de leite apresentaram estabilidade baixa e 13,9% apresentaram estabilidade intermediária. Com relação ao percentual de amostras consideradas LINA, apenas 13,5% das amostras apresentaram características de LINA.

Não houve diferença ($P>0,05$) entre PL, ECC, gordura, proteína, ST, acidez e CRIO entre as classes de estabilidade do leite (Tabela 6). O grupo de alta estabilidade (A) foi caracterizado por animais jovens (com menor número de partos) e menor DEL, em relação aos grupos de intermediária (I) e baixa (B) estabilidade. As amostras de leite de A e I estabilidade foram caracterizadas pela maior concentração de lactose (4,76 e 4,71 g/100g, respectivamente), quando comparados às amostras de B estabilidade, com valor médio de lactose inferior (4,49 g/100g) ($P<0,05$). As amostras de leite com A estabilidade apresentaram ECS mais baixo, com média de 1,51 céls/log10, quando comparado aos demais níveis de estabilidade (I e B).

As amostras do grupo A (estabilidade acima de 82% v/v), apresentaram menor concentração de Ca^{2+} comparadas com as amostras classificadas como I e B. Nesta análise, as amostras classificadas como de I tiveram estabilidade ao etanol de 79% v/v e as amostras de B estabilidade ao etanol 73% v/v, com concentrações de cálcio de 91,6 e 104 mg/L, respectivamente, para as amostras de I e B estabilidade ($P<0,05$).

Tabela 6 – Valores médios das variáveis número de partos (NPARTOS), produção de leite (PL), dias em leite (DEL), escore de condição corporal (ECC), gordura; proteína; lactose, sólidos totais (ST), escore de células somáticas (ECS), estabilidade ao etanol (EST), cálcio iônico (CA_i), acidez titulável e crioscopia (CRIO) de amostras de leite de vacas da raça Holandesa em função do nível de estabilidade (alta, intermediária e baixa)

Média	Estabilidade			P
	A	I	B	
NPARTOS	2,36 ^b	2,54 ^{ab}	3,35 ^a	=0,0126
PL (litros/vaca/dia)	40,1	39,8	35,7	NS
DEL (dias)	186,3 ^b	219,1 ^{ab}	278,7 ^a	=0,0035
ECC (pontos)	3,17	3,19	3,06	NS
Gordura (g/100g)	3,53	3,83	3,74	NS
Proteína (g/100g)	3,36	3,35	3,48	NS
Lactose (g/100g)	4,76 ^a	4,71 ^a	4,49 ^b	<0,001
ST (g/100g)	12,5	12,7	12,6	NS
ECS (células/log10)	1,51 ^a	1,73 ^b	1,73 ^b	=0,0090
EST (% v/v)	82 ^a	79,2 ^b	73,1 ^c	<0,001
CA _i (mg/L)	80,8 ^a	91,6 ^b	104,0 ^c	<0,001
Acidez (°D)	15,3	15,3	15,6	NS
CRIO (°H)	-0,543	-0,544	-0,545	NS

Letras diferentes na linha: diferença significativa entre os níveis. P: nível de significância.

A: Alta estabilidade, acima de 82% v/v; I: Estabilidade intermediária, entre 78 – 80% v/v; B: baixa estabilidade entre 72 – 76% v/v.

Fonte: A autora.

As correlações entre as variáveis estudadas foram positivas ou negativas, sendo consideradas muito fracas (0 – 0,25) e fracas (0,26 – 0,50) (Tabela 7). O número de partos apresentou correlação positiva e muito fraca com a CCS (0,25), negativa e fraca com a acidez (-0,31) e negativa e muito fraca com a EST (-0,24). Observou-se correlação positiva muito fraca e não significativa com o ECC (0,12), indicando que o ECC não tem relação com o nível de estabilidade do leite, não sendo, portanto, um parâmetro para investigar a ocorrência de leite instável.

Tabela 7 – Níveis de correlação entre as variáveis número de partos (NPARTOS), dias em leite (DEL), sólidos totais (ST), contagem de células somáticas (CCS), escore de condição corporal (ECC), estabilidade ao etanol (EST), cálcio iônico (CA_i), acidez e crioscopia (CRIO) de amostras de leite de vacas da raça Holandesa

	NPARTOS	DEL	ST	CCS	ECC	EST	CA _i	Acidez	CRIO
NPARTOS	100	0,10	0,01	0,25*	0,05	-0,24*	-0,12	-0,31*	-0,01
DEL		100	-0,04	0,17	-0,07	-0,20*	-0,06	0,01	-0,23*
ST			100	0,07	0,12	0,04	0,09	0,44	-0,19
CCS				100	0,02	-0,01	0,04	-0,02	-0,02
ECC					100	0,12*	0,02	0,26*	0,01
EST						100	-0,32*	-0,18	-0,02
CA _i							100	-0,08	-0,12
Acidez								100	0,02
CRIO									100

*Variáveis com correlações significativas.

Fonte: A autora.

Por outro lado, o NPARTOS (-0,24) e o DEL (-0,20) apresentaram correlação negativa e significativa com a estabilidade do leite ($P < 0,05$), indicando que animais mais velhos (maior número de partos) e DEL avançado, podem apresentar maior frequência de leite instável quando comparado a animais mais jovens. Houve correlação negativa fraca, porém, significativa entre a estabilidade e o CA_i (-0,32). Este resultado indica que quanto maior a concentração de cálcio iônico no leite, menor será a estabilidade ao teste do etanol. A acidez apresentou correlação positiva fraca (0,26) e significativa com o ECC. Quanto à crioscopia, verificou-se correlação negativa muito fraca (-0,23) e significativa com o DEL.

A análise de cargas fatoriais mostrou a associação entre as variáveis originais (NPARTOS, DEL, ST, CCS, ECC, EST, CA_i, acidez e CRIO) e a ocorrência de instabilidade no leite (Tabela 8). Foram encontrados três fatores principais (FP) significativos (eigenvalues iguais ou superiores a 1,0) que explicam 49,65% da variância total. No FP1 as variáveis originais com maiores cargas fatoriais foram ST, ECC e acidez, que apresentaram associação positiva entre si. No PF2 as variáveis originais com maiores cargas fatoriais foram NPARTOS, DEL e CCS, associadas positivamente entre si. Já no FP3, as variáveis originais com maiores cargas fatoriais foram EST e a CA_i, com forte associação negativa entre si.

Tabela 8 – Cargas fatoriais, comunalidade e percentual de variância das variáveis utilizadas para a análise fatorial que relaciona a ocorrência de instabilidade no leite de vacas da raça Holandesa

	Fatores			Comunalidade
	Fator 1	Fator 2	Fator 3	
NPARTOS	-0,30481	0,69828*	-0,03179	0,58
DEL (dias)	-0,03352	0,63740*	0,24952	0,46
ECC (pontos)	0,65815*	-0,00318	-0,23699	0,48
ST (g/100g)	0,79610*	0,03550	0,14097	0,65
CCS (mil células/mL)	0,06667	0,73534*	-0,02058	0,54
EST (% v/v)	0,07699	-0,27614	-0,70623*	0,58
CA _i (mg/L)	0,04756	-0,10306	0,80467*	0,66
Acidez titulável (°D)	0,79227*	-0,19409	0,10108	0,67
CRIO (°H)	-0,27970	-0,34468	-0,33324	0,30
% Variância	18,79	16,79	14,07	

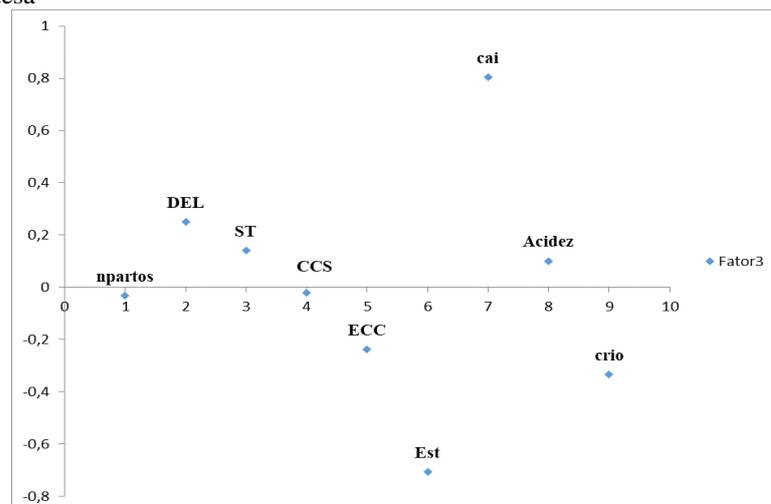
*Variáveis responsáveis pela maior parte da variância retidas análise fatorial.

NPARTOS: número de partos; DEL: dias em leite; ECC: escore de condição corporal; ST: sólidos totais; CCS: contagem de células somáticas; EST: estabilidade ao etanol; CA_i: concentração de cálcio iônico; CRIO: índice crioscópico.

Fonte: A autora.

De acordo com os resultados fatoriais o FP3 foi considerado o fator com maior influência na ocorrência de instabilidade no leite, devido à forte associação negativa da variável estabilidade com a concentração de cálcio iônico no leite que pode ser observada no gráfico de escore 1.

Gráfico 1 – Gráfico de escore associando as variáveis retidas no fator principal 3 na análise fatorial da raça Holandesa



Fonte: A autora.

Os FP2 e 3 foram retidos na análise de regressão logística para avaliação do risco de uma amostra ser considerada LINA (Tabela 9). O FP3 apresentou maior associação (29,18)

em relação ao risco de ocorrência de LINA nas amostras, tendo como principal associado a CA_i . As variáveis originais NPARTOS, DEL, CA_i e a acidez foram retidas na regressão logística, apresentando associação positiva para a ocorrência de instabilidade do leite. A variável original com maior associação foi a acidez titulável (2,99).

Tabela 9 – Análise de regressão logística relacionando as variáveis retidas na análise fatorial e as variáveis originais na ocorrência de instabilidade do leite em vacas da raça Holandesa

Parâmetro	Estimativa	Erro Padrão	Qui-quadrado	P
FATOR 2	0,91	0,32	7,63	=0.0057
FATOR 3	29,18	0,49	34,23	<0.0001
NPARTOS	0,38	0,12	10,27	=0.0014
DEL (dias)	0,004	0,001	9,10	=0.0025
CA_i (mg/L)	0,03	0,008	16,08	<0.0001
Acidez titulável (°D)	2,99	1,34	4,91	=0.0267

NPARTOS: número de partos; DEL: dias em leite; CA_i : concentração de cálcio iônico.
Fonte: A autora.

2.4.2 Raça Jersey

Os valores relativos à análise descritiva dos animais da raça Jersey encontram-se na Tabela 10. O NPARTOS apresentou variação, porém, 47,4% dos animais eram vacas primíparas, e apenas 6% animais de quinta ordem de parto. A produção de leite apresentou variação acentuada, de 4,5 a 49,7 litros/vaca/dia. No entanto, apenas cerca de 6,7% das vacas com produções abaixo de 15 litros/vaca/dia, e 93,3% com produções superiores. Ressalta-se que 56,6% apresentaram produções acima de 25 litros/vaca/dia e uma pequena proporção dos animais avaliados (4%) produziram mais de 40 litros/vaca/dia.

O DEL apontou variação de 45 a 459 dias, sendo que 20,2% dos animais tiveram DEL inferior a 100 dias. Por outro lado, apenas 1,9% das vacas tiveram DEL acima de 300 dias. Observou-se maior concentração de animais (59,6%) com DEL médio de 180 dias. O ECC apresentou variação entre a escala de 2,3 a 4, sendo que 32,4% dos animais tiveram escore entre 2,1 a 3 e 61,9% com escore entre 3,1 a 3,5.

A composição do leite apresentou grande amplitude de variação. O teor de gordura de 91% das amostras foi acima de 3,0 g/100g e apenas 9,39% apresentaram teores menores que 3,0 g/100g, com a maior concentração (70,4%) de amostras com teores acima de 4,0 g/100g. Com relação aos teores proteicos das amostras, 100% apresentam teores de proteína acima de 2,9 g/100g, destacando-se que aproximadamente 30% alcançaram teores maiores

que 4,0 g/100g. Os teores de lactose em 72% das amostras ficaram acima de 4,6 g/100g. A porcentagem de ST apresentou valores acima de 12,0 g/100g em 93,4% das amostras de leite. Uma pequena porcentagem de amostras (6,6%) teve teores se ST menores que 12,0 g/100g e cerca de 54% das amostras apresentaram teores acima que 14,0 g/100g.

Tabela 10 – Análise descritiva dos índices reprodutivos, da produção de leite, escore de condição corporal e características físico-químicas do leite de vacas da raça Jersey

Variável	n	Média	Mediana	Moda	Amplitude	CV (%)
NPARTOS	213	2,1	3	1	1 – 5	0,5
PL (litros/vaca/dia)	150	28,4	26	21,4	4,5 – 49,7	1,3
DEL (dias)	213	170,3	165	133	45 – 459	0,4
ECC (pontos)	213	3,2	3,2	3,25	2,3 – 4	0,1
Gordura (g/100g)	213	4,70	4,47	4,90	1,77 – 9,06	0,3
Proteína (g/100g)	213	3,90	3,88	3,70	2,97 – 5,07	0,1
Lactose (g/100g)	213	4,70	4,67	4,80	3,68 – 5,31	0,06
ST (g/100g)	213	14,10	14,07	14,56	10,80 – 18,34	0,1
CCS (mil céls/mL)	213	132	75,5	44	6 – 1.701	1,7
EST (% v/v)	213	80	78,5	82	72 – 82	0,04
CA _i (mg/L)	213	87	80,5	100	41 – 170	0,3
Acidez (°D)	208	16	15	16	10 – 20	0,2
CRIO (°H)	212	-0,544	-0,543	-0,546	-0,512 - 0,598	-0,02

NPARTOS: número de partos; PL: produção de leite; DEL: dias em leite; ECC: escore de condição corporal; LAC: lactose; ST: sólidos totais; CCS: contagem de células somáticas; EST: estabilidade ao etanol; CA_i: concentração de cálcio iônico; CRIO: índice crioscópico; CV: coeficiente de variação.

Fonte: A autora.

Com relação aos níveis de CCS apenas 14% tiveram níveis acima de 200 mil céls/mL sendo que cerca de 70% das amostras apresentaram CCS inferiores a 100 mil céls/mL. Em relação à estabilidade, 57,3% das amostras foram estáveis a 80% v/v de etanol. A concentração de cálcio iônico do leite variou entre 41 e 170 mg/L, 35,2% das amostras apresentaram concentrações menores que 80 mg/L, e 18% com concentrações superiores a 100 mg/L. A acidez teve variação de 10 a 20 °D, 83,6% das amostras avaliadas tiveram acidez entre 14 a 18 °D, 11% das amostras apresentaram acidez inferior a 13 °D e 5,3% com acidez superior a 18 °D. Quanto à crioscopia, 78% das amostras apresentaram índice crioscópico entre -0,530 à -0,549 °H.

Na Tabela 11 são apresentadas as frequências amostrais das variáveis gordura, proteína, lactose, ST, CCS, EST, acidez e CRIO, de acordo com as exigências estabelecidas pela legislação em vigência para leite de tanque (IN 76/77) (BRASIL, 2018). Uma alta

frequência de amostras atendeu aos padrões de qualidade exigidos pela IN e apenas um pequeno percentual de amostras (menos de 9%) apresentou níveis de proteína, lactose e ST, inferiores aos preconizados pela legislação. Com relação aos teores de ST, mais de 90% das amostras apresentaram teores de sólidos superiores aos preconizados pela legislação, demonstrando alta qualidade na composição de sólidos das amostras avaliadas.

Quanto aos valores de CCS 86% das amostras apresentaram valores menores que 200 mil céls/mL e 4,6% com valores acima de 500 mil céls/mL, estando assim em conformidade com as exigências da legislação. Em apenas 7,5% das amostras avaliadas apresentaram estabilidade inferior ou igual a 72% v/v, e em 71,4% das amostras a estabilidade foi considerada alta (acima de 80% v/v). Com relação aos demais parâmetros analisados, cerca de 83,6% das amostras de leite apresentaram acidez entre 14 – 18°D e 79,7% apresentaram CRIO entre -0,530 a -0,555 °H, destacando-se que 17,4% das amostras apresentaram CRIO maior que -0,555.

Tabela 11 – Frequência amostral dos teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST), contagem de células somáticas (CCS), estabilidade ao etanol (EST), acidez, crioscopia (CRIO) de amostras de leite de vacas da raça Jersey e níveis recomendados pela IN 76/77

Variável	Frequência amostral na mesma faixa		
Gordura (g/100g)	< 3,0**	-	≥ 3,0*
	9,4%		90,6%
Proteína (g/100g)	< 2,9	-	≥ 2,9*
	-		100,0%
Lactose (g/100g)	< 4,3**	-	≥ 4,3*
	6,6%		93,4%
ST (g/100g)	< 11,4**	-	≥ 11,4*
	1,9%		98,1%
CCS (mil céls/mL)	< 200	200 – 500*	> 500**
	86,0%	9,4%	4,6%
EST (% v/v)	≤ 72*	76 – 78	≥ 80
	7,5%	21,1%	71,4%
Acidez (°D)	< 14**	14 – 18*	> 18**
	11,0%	83,6%	5,3%
CRIO (°H)	> -0,530**	-0,530 a -0,555*	< -0,555**
	2,8%	79,7%	17,4%

*Valor de referência conforme a Instrução Normativa 76, IN 76/77 (BRASIL, 2018). **Valores fora dos padrões preconizados pela IN 76/77 77 (BRASIL, 2018).

Fonte: A autora.

A partir dos valores de estabilidade as amostras leite foram classificadas em três níveis de estabilidade: alta (A), intermediária (I) e baixa estabilidade (B). De acordo com a classificação aproximadamente 57,3% das amostras não coagularam quando submetidas ao

teste do etanol à 80% v/v, sendo então consideradas amostras de alta estabilidade. Apenas 13,6% das amostras de leite apresentaram estabilidade baixa e 29% apresentaram estabilidade intermediária. Com relação ao percentual de amostras consideradas LINA, apenas 13,6% das amostras apresentaram características de LINA.

Com relação aos parâmetros analisados em função do nível de estabilidade das amostras (A, I e B), não houve diferença ($P>0,05$) para o NPARTOS, PL, DEL, ECC, proteína, lactose, ECS e CRIO (Tabela 12). Os valores médios de CA_i do nível de estabilidade A foram menores que dos níveis de estabilidade I e B. O nível A apontou menores teores de gordura e menores teores de sólidos totais, quando comparado aos níveis I e B.

Tabela 12 – Valores médios das variáveis número de partos (NPARTOS), produção de leite (PL), dias em leite (DEL), escore de condição corporal (ECC), gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST), escore de células somáticas (ECS), estabilidade ao etanol (EST), cálcio iônico (CA_i), acidez titulável e crioscopia (CRIO) de amostras de leite de vacas da raça Jersey em função do nível de estabilidade (alta, intermediária e baixa)

Média	Estabilidade			P
	A	I	B	
NPARTOS	2,09	2,25	2,27	NS
PL (litros/vaca/dia)	25,7	26,2	25,6	NS
DEL (dias em leite)	161,9	167,9	173,6	NS
ECC	3,25	3,22	3,18	NS
Gordura (g/100g)	4,50 ^b	4,88 ^{ab}	5,14 ^a	=0,0383
Proteína (g/100g)	3,82	3,91	3,92	NS
Lactose (g/100g)	4,70	4,66	4,63	NS
ST (g/100g)	13,9 ^b	14,3 ^{ab}	14,6 ^a	=0,0371
ECS (log10)	1,81	1,81	1,71	NS
EST (% v/v)	82 ^a	78,9 ^a	73,7 ^b	<0,001
CA_i (mg/L)	81,5 ^b	93,7 ^a	95,0 ^a	<0,001
Acidez (°D)	15,9 ^a	15,9 ^a	14,4 ^b	=0,007
CRIO (°H)	-0,543	-0,543	-0,543	NS

A: Alta estabilidade, acima de 82% v/v; I: Estabilidade intermediária, entre 78 – 80% v/v; B: baixa estabilidade, entre 72 – 76% v/v. P: nível de significância.

Fonte: A autora.

Os resultados das correlações entre as variáveis estão descritos na Tabela 13. A EST apresentou correlação negativa muito fraca ($P<0,05$) com ST (-0,20), indicando que a maior concentração de ST no leite pode interferir negativamente em sua estabilidade. A concentração de CA_i foi negativamente muito fraca relacionada ($P<0,05$) com o ECC (-0,17) e negativamente fraca com a EST (-0,26). Este resultado indica que a maior concentração de CA_i está associado ao menor ECC, porém de forma não tão significativa.

A acidez titulável apresentou correlação negativa fraca ($P < 0,05$) (-0,33) com o NPARTOS, constatando que à medida que ocorre aumento do número de partos (idade), menor será a acidez titulável no leite (leite alcalino). No entanto, quando se relacionou a acidez com a estabilidade, houve correlação positiva muito fraca ($P < 0,05$), indicando que o aumento da estabilidade está relacionado com o aumento da acidez titulável, ou seja, acidez do leite. O DEL apresentou correlação positiva fraca (0,27) com o ST ($P < 0,05$), indicando que quanto maior o DEL do animal, maior a concentração de ST no leite.

Tabela 13 – Níveis de correlação entre as variáveis número de partos (NPARTOS), dias em leite (DEL), sólidos totais (ST), contagem de células somáticas (CCS), escore de condição corporal (ECC), estabilidade ao etanol (EST), cálcio iônico (CA_i), acidez e crioscopia (CRIO) de amostras de leite de vacas da raça Jersey

	NPARTOS	DEL	ST	CCS	ECC	EST	CA_i	Acidez	CRIO
NPARTOS	100	0,22	-0,19	0,10	-0,17	0,01	0,11	-0,33*	0,11
DEL		100	0,27*	0,04	0,03	-0,11	-0,07	0,16	0,01
ST			100	0,20	0,05	-0,20*	-0,06	0,04	-0,01
CCS				100	-0,02	0,14	-0,01	-0,08	-0,10
ECC					100	0,01	-0,17*	-0,07	-0,05
EST						100	-0,26*	0,20*	0,02
CA_i							100	-0,01	-0,10
Acidez								100	-0,09
CRIO									100

*Variáveis com correlações significativas.

Fonte: A autora.

Cinco fatores principais (FP) foram significativos (com *eigenvalues* igual ou superior a 1,0) e explicaram 64,8% da variância total (Tabela 14). No FP1 as variáveis originais com maior carga fatorial foram NPARTOS, Acidez e CCS, com associação negativa entre o NPARTOS e a acidez. No FP2 as variáveis originais com maior carga fatorial foram DEL e ST, com associação positiva entre si. Enquanto que no FP3 as variáveis originais com maior carga fatorial foram EST e CA_i , com forte associação negativa da CA_i . No FP4 as variáveis originais com maior carga fatorial foram ECC e CA_i , com associação negativa do CA_i . Por último, no FP5, as variáveis originais com maior carga fatorial foram CCS e a CRIO, com associação negativa da CCS.

Tabela 14 – Cargas fatoriais, comunalidade e percentual de variância das variáveis originais utilizadas para a análise fatorial que relaciona a ocorrência de instabilidade no leite de vacas da raça Jersey

	Fatores					Comunalidade
	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4	Fator 5	
NPARTOS	-0.71071*	0.04009	-0.01028	-0.38930	0.13054	0,67
DEL (dias)	-0.00670	0.80557*	-0.00401	-0.13387	0.11148	0,67
ECC	0.03069	0.01942	0.05702	0.86379*	-0.02831	0,75
ST (g/100g)	0.12139	0.73655*	-0.13102	0.23318	-0.16770	0,65
CCS (mil céls/mL)	-0.41290*	0.32388	0.36343	-0.04410	-0.61604*	0,78
EST (% v/v)	0.13476	-0.25787	0.81795*	-0.08098	-0.05406	0,76
CA _i (mg/L)	-0.09890	-0.15587	-0.64312*	-0.41349*	-0.19811	0,65
Acidez (°D)	0.80766*	0.17901	0.24329	-0.18996	-0.04662	0,78
CRIO (°H)	-0.26380	0.08193	0.16407	-0.04309	0.79132*	0,73
% Variância	14,41	14,27	13,21	11,87	11,08	

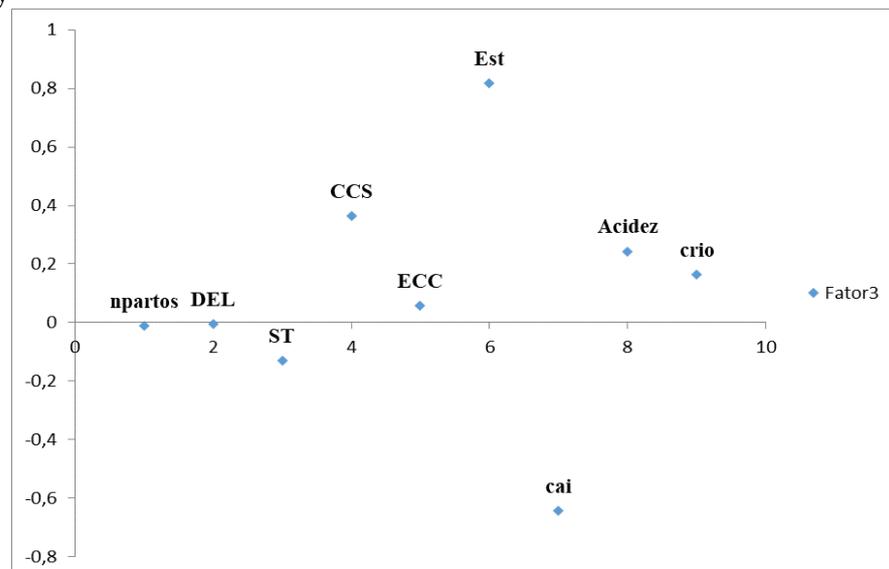
*Variáveis responsáveis pela maior parte da variância retidas análise fatorial.

NPARTOS: número de partos; DEL: dias em leite; ECC: escore de condição corporal; ST: sólidos totais; CCS: contagem de células somáticas; EST: estabilidade ao etanol; CA_i: concentração de cálcio iônico; Acidez titulável; CRIO: índice crioscópico.

Fonte: A autora.

De acordo com os resultados fatoriais o FP3 foi considerado o fator com maior influência na ocorrência de instabilidade no leite, devido à forte associação negativa da variável estabilidade com a concentração de cálcio iônico no leite que pode ser observada no gráfico de escore 2.

Gráfico 2 – Gráfico de escore associando as variáveis retidas no fator principal 3 na análise fatorial da raça Jersey



Fonte: A autora.

Os FP3, 4 e 5 foram retidos na análise de regressão logística (Tabela 15). O FP3, não foi associado com o risco do LINA mas, observando as cargas fatoriais retidas nesse fator, ele está fortemente relacionado com a estabilidade do leite. O FP4 e 5, apresentaram associações positivas com a ocorrência de LINA, sendo o FP4 mais relevante. Dentre as variáveis originais retidas na análise de regressão, a concentração de ST aumentou o risco da ocorrência de instabilidade do leite. O ECS e acidez não foram associadas com a ocorrência de instabilidade na raça Jersey.

Tabela 15 – Análise de regressão logística relacionando as variáveis retidas na análise fatorial e as variáveis originais na ocorrência de instabilidade do leite em vacas da raça Jersey

Parâmetro	Estimativa	Erro Padrão	Qui-quadrado	P
Fator 3	-4,99	1,09	20,7212	<0.0001
Fator 4	1,31	0,57	5,3183	=0.0211
Fator 5	1,63	0,73	4,9697	=0.0258
ST (g/100g)	0,50	0,16	9,1742	=0.0025
ECS (log 10)	-1,65	0,63	6,8553	=0.0088
Acidez (°D)	-5,48	1,30	17,7522	<0.0001

ST: sólidos totais; ECS: escore de células somáticas; Acidez: acidez titulável.

Fonte: A autora.

2.5 DISCUSSÃO

Os animais das raças Holandesa e Jersey avaliados no presente trabalho são provenientes de rebanhos especializados, de genética aprimorada e criados em sistemas tecnificados que possibilitaram o alto nível de produtividade. Os teores de sólidos no leite (gordura, proteína, lactose e ST) dentro de cada rebanho variaram expressivamente (Tabela 4 e 10), porém apesar da variação observada mais de 80% das amostras tiveram teores de sólidos acima do recomendado pela IN 76/77, ainda que, os valores médios que são recomendados pela legislação sejam para o leite de tanque e não individual (Tabela 5 e 11). Pelos resultados obtidos, a raça Jersey obteve os teores de sólidos mais elevados. Animais da raça Jersey produzem leite com até 30% a mais de sólidos em comparação com as outras raças leiteiras (ROCHA; CARVALHO; RESENDE, 2020). Com relação ao maior percentual de amostras de leite com baixos teores de gordura encontrados na raça Holandesa (Tabela 5), pode-se justificar pela influência da própria raça, que apresenta maior volume de produção (Tabela 4). Segundo Chalfun, (2009) os teores de gordura podem ser reduzidos quando a

produção de leite (volume) é mais elevada. Porém, esse percentual de baixa gordura no leite ainda foi agravado pelo fato das amostras serem coletadas na segunda ordenha, que apresenta naturalmente menores teores de gordura. Além disso, observou-se também que a relação gordura: proteína de 18% das vacas Holandesas foi inferior a 1,05. Esta relação é um importante indicativo do metabolismo nutricional dos animais, pois relações inferiores a 1,0, podem indicar acidose ruminal (PACHECO *et al.* 2020). A queda da gordura no leite pode ser causada devido ao excesso de carboidratos não fibrosos que causam a queda do pH ruminal e facilitam a biohidrogenação incompleta de ácidos graxos (BERCHIELLI; PIRES; OLIVEIRA, 2006). No entanto outros fatores também podem contribuir mudanças metabólico-nutricionais que afetam a gordura do leite como fatores ambientais (composição da dieta e manejo) e fatores individuais (genética, sanidade, balanço metabólico energético e período de lactação) (GONZÁLEZ, 2009).

A CCS observadas nas amostras dos animais da raça Holandesa e Jersey apresentaram valores de CCS inferiores a 200 mil céls/mL (Tabela 5 e 11). De acordo com Brito *et al.* (2007) para que a glândula mamária (GM) seja considerada saudável, a CCS deve estar entre 50 e 200 mil células/mL. Sendo assim, os animais do presente estudo apresentam glândulas mamárias saudáveis. Em estudo conduzido por Botaro; Machado (2011), a média de CCS para vacas da raça Holandesa e Jersey foi de 639 mil céls/mL e 567 mil céls/mL, respectivamente, demonstrando grande diferença dos resultados encontrados no presente trabalho (82,3 e 132 mil céls/mL, na raça Holandesa e Jersey). Essas diferenças nas duas propriedades estudadas podem estar relacionadas com o manejo de ordenha eficiente, contando com a correta utilização do pré e pós-dipping, e os animais seguiam uma linha de ordenha para diminuir o risco de contaminações. Ainda os equipamentos de ordenha eram higienizados de acordo com as recomendações e a sua manutenção era feita rotineiramente.

Os resultados de amostras instáveis e consideradas como LINA, definidas neste trabalho como leite instável em etanol igual ou inferior a 76% v/v demonstraram que, em ambos os rebanhos, houve grande percentual de amostras estáveis a 80% v/v, ou seja, uma pequena incidência de LINA. As principais indústrias da região buscam leite de alta estabilidade ao etanol, ou seja, leite estável a 78% v/v. Uma grande porcentagem (72,6% da raça Holandesa e 57,3% da raça Jersey) das amostras avaliadas não apresentou nenhum grau de precipitação (coagulação) quando submetidas ao teste do etanol na concentração mais elevada (80% v/v). Esses resultados demonstram que, em os dois rebanhos avaliados eram

constituídos de animais especializados na produção de leite e a estabilidade ao etanol foi alta. Silva *et al.* (2012) avaliaram a estabilidade do leite em quatro concentrações alcoólicas (68, 72, 76 e 78% v/v) na região norte do Paraná e verificaram a ocorrência de LINA em 43,6% das amostras de leite, em um total de 352 amostras. Deve-se ressaltar que, embora a estabilidade das amostras do presente estudo tenha sido alta (acima de 80% v/v), ela representa a apenas uma pequena fração de animais do estado, oriundas de duas propriedades altamente tecnificadas. Estas apresentaram instalações modernas, controle de temperatura, alimentação balanceada e rigoroso controle sanitário, o que possivelmente contribuiu com os resultados. Voges *et al.* (2018) observaram que a ocorrência de LINA é mais comum em propriedades familiares, com menor uso de tecnologias. Esses resultados demonstram a grande variação com relação a ocorrência de instabilidade e LINA, dependendo da região e das condições de cada rebanho, uma vez que o LINA é um fenômeno complexo e multifatorial (FISCHER, 2005).

De acordo com a classificação das amostras quanto a estabilidade (A, I e B) na raça Holandesa (Tabela 6), o percentual de amostras de leite com alta estabilidade está relacionado com animais mais jovens ($2,36 \pm 1,79$), baixo DEL ($183,6 \pm 151,4$), baixo ECS ($1,51 \pm 157,2$) e baixa concentração de Ca_i ($80,8 \pm 25,1$). Um dos fatores que podem provocar a instabilidade do leite está relacionado com o aumento das concentrações de Ca^{2+} no leite. O Ca^{2+} diminui a capacidade das caseínas em manter sua estrutura, reduzindo repulsão eletrostática. Isso provoca agregação das micelas (PHILIPPE *et al.* 2003), causando a coagulação (instabilidade) do leite. Este fato foi observado nas amostras classificadas como de baixa estabilidade no rebanho da raça Holandesa e Jersey (Tabela 6 e 12), onde a maior concentração de Ca^{2+} (104,0 mg/L – Holandesa e 95,0 mg/L - Jersey) diminuiu a repulsão eletrostática das micelas de caseínas, reduzindo a estabilidade do leite na prova do etanol (73,1% v/v Holandesa e 73,7% v/v Jersey). Segundo Gaucheron (2005) o estágio de lactação e doenças como a mastite podem modificar a concentração de íons na glândula mamária. Esses efeitos estão de acordo com os resultados observados na pesquisa, onde verificou-se que animais com estágio de lactação mais avançado e com maior ECS (raça Holandesa), embora não tão expressivo, apresentaram maiores concentrações de Ca^{2+} , e conseqüentemente menor resistência à prova do etanol.

Na raça Jersey o maior percentual de amostras de alta estabilidade (Tabela 12) está associado com baixa concentração de Ca_i ($81,5 \pm 19,41$) e menor teor de sólidos totais

(13,9±1,49). O alto teor de sólidos no leite de animais da raça Jersey proporciona maior acidez natural no leite (DURR; FONTANELI; MORO, 2001), causando maior predisposição desses animais a ocorrência de instabilidade no leite. Fato observado no presente estudo onde, o leite de alta estabilidade apresentou menores concentrações de sólidos totais no leite ($P < 0,05$). Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira *et al.* (2011), que reportaram menores teores de gordura e ST nas amostras estáveis ao etanol. Por outro lado Fagnani; Beloti; Battaglini (2014) não encontraram diferenças na composição química entre leite instável e estável. Além disso, observou-se que os teores de gordura na raça Jersey (Tabela 12) nas amostras de alta estabilidade foram inferiores às amostras de baixa estabilidade. A gordura do leite é o componente que mais sofre variação no leite. Alterações na síntese de gordura do leite podem estar associados com alterações na proporção de ácidos graxos produzidos no rúmen (AGENÄS; DAHLBORN; HOLTENIUS, 2003).

Na raça Jersey houve diferença significativa ($P < 0,05$) nas análises de acidez do leite, sendo que as amostras classificadas como de baixa estabilidade (instáveis entre o etanol 72 - 76% v/v), apresentaram leite com acidez de 14,4 °D (Tabela 12). Apesar do referido valor de acidez estar em acordo com o preconizado pela legislação, esse resultado está incompatível com outros estudos, pois a raça Jersey apresenta maior acidez natural do leite devido a maior concentração de proteína total. Esta é a acidez natural do leite da raça Jersey, não sendo causada devido a presença de micro-organismos. O dióxido de carbono, a proteína, os fosfatos e os citratos são os componentes que contribuem para esta acidez natural (DURR; FONTANELI; MORO, 2001). Porém, observou-se que os teores de proteína não variaram ($P > 0,05$) em função dos os níveis de estabilidade (Tabela 12). A diferença nos valores acidez das amostras podem ter sido causadas por outros fatores que não foram mensurados na presente pesquisa, como as proporções de caseínas e suas variantes genéticas, além da concentração de fosfatos e citratos nas amostras.

Outro resultado importante encontrado neste estudo foi a diminuição ($P < 0,05$) dos teores de lactose no leite de baixa estabilidade nos animais da raça Holandesa. Essa diminuição pode não estar relacionada com a instabilidade, mas sim com o DEL mais avançado e o ECS, que embora não seja considerado alto, apresentou diferença estatística quando comparado as amostras de alta de estabilidade (Tabela 6). Pesquisas mostraram que altos valores de CCS estão relacionados com a baixa estabilidade do leite devido à proteólise, aos baixos teores de caseína e altos valores de sódio e cloro. Estes compostos causam

desestabilização das micelas de caseína (HORNE, 2016), promovendo a formação de coágulos. Machado *et al.* (2017) avaliaram leite de tanque e observaram que amostras de alta estabilidade (estáveis ao etanol acima de 78% v/v), apresentaram menores teores de lactose, causado segundo os autores pela alta CCS e CBT das amostras, demonstrando que a CCS pode interferir negativamente na estabilidade do leite. Além disso, a medida que ocorre o avanço do DEL dos animais, ocorre a redução da instabilidade do leite, causada principalmente pela descamação epitelial e o aumento da permeabilidade das junções firmes da glândula mamária (BARROS, 1999). A redução da secreção de leite e o aumento do transporte celular de componentes do sangue para o leite, no final da lactação, causa maior desequilíbrio de sais, causando instabilidade (STELWAGEN; SINGH, 2013). Esses fatores podem ter contribuído para a queda da lactose no leite na raça Holandesa pois, os animais apresentaram DEL 278,7, sendo próximo ao final de lactação, que tem duração média de 305 dias.

As correlações observadas na presente pesquisa, em sua maioria, foram consideradas muito fracas (menor que 0,25) e fracas (0,25 – 0,50) (Tabelas 7 e 13). Contudo, correlações das variáveis analisadas com a estabilidade foram obtidas em ambas as raças. Na raça Holandesa, a estabilidade apresentou correlação negativa ($P < 0,05$) com o NPARTOS, DEL e Ca^{2+} . Marques *et al.* (2010) avaliaram o efeito de duas dietas (alta e baixa suplementação), em vacas em estágio avançado de lactação, e não obtiveram melhoria na estabilidade do leite. Segundo os autores, este resultado pode estar relacionado com alterações no equilíbrio salino do leite que ocorre em vacas em estágio final de lactação. Portanto, o aumento do NPARTOS e avanço da lactação (maior DEL) verificados neste estudo podem ter reduzido a estabilidade no leite. Esse resultado está em concordância com o estudo feito por Pereira *et al.* (2019), onde vacas com acima de quatro partos apresentaram maiores incidência de leite instável.

Na raça Jersey, a estabilidade apresentou correlação negativa ($P < 0,05$) com a concentração de ST e de Ca^{2+} , e correlação positiva com a acidez (Tabela 13). A raça Jersey apresenta acidez natural do leite mais elevada, causada pelo maior teor de sólidos no leite. Isso explica a correlação negativa com o ST e positiva com a acidez. De acordo com Marques *et al.* (2011) a redução do pH do leite e da urina, causa aumento de Ca^{2+} no sangue e no leite, reduzindo a concentração de etanol necessária para induzir a precipitação do leite. Esse resultado foi semelhante ao observado na pesquisa, constatando a correlação negativa da

estabilidade com o Ca^{2+} . A mensuração do ECC das raças Holandesa e Jersey não foi correlacionado significativamente com a estabilidade do leite.

Nos resultados das análises fatoriais com as variáveis originais retidas, relacionadas com a ocorrência de LINA, em ambos os rebanhos o NPARTOS, DEL, ECC, ST, EST, CA_i, acidez e CCS, que explicaram a maior parte da variância total dos rebanhos (Tabelas 8 e 14). Barbosa *et al.* (2009) observaram que o estágio de lactação influenciou nos teores de gordura, proteína, sólidos totais e lactose. Assim como, as amostras de leite instáveis apresentaram maiores teores de cálcio iônico e menor pH do leite. Fato observado no atual estudo, onde o aumento do DEL e do NPARTOS foi associado com a menor porcentagem de sólidos totais e desengordurados e a acidez. Por sua vez, o aumento da acidez foi associado com o cálcio iônico e com a redução da estabilidade.

Com relação aos resultados obtidos da regressão logística de cargas fatoriais e variáveis originais (Tabela 10 e 15), o fator que apresentou maior associação com a ocorrência de instabilidade do leite foi o FP3, que apresentou associação negativa entre a estabilidade e a CA_i. Embora na raça Jersey, o FP3 não apresentar associação na análise de regressão, esse fator apresentou maior associação com a estabilidade apresentando forte associação negativa da estabilidade e a CA_i (Tabela 14). Faria *et al.* (2017), relataram que o leite instável apresenta menor condutividade elétrica, possivelmente causada pela maior concentração de Ca^{2+} no leite. Além disso na raça Holandesa, foi observada associação positiva da acidez com a ocorrência de instabilidade. Essa associação é justificada pois, em pH ácido (menor que 6,5), ocorrem mudanças no equilíbrio de íons para a manutenção da estrutura das micelas, ocasionando aumento da passagem de cálcio da fase coloidal para solúvel, provocando aumento da concentração de Ca^{2+} no leite, causando a desestabilização das micelas e sua precipitação (SINGH, 2004). Em contrapartida, na raça Jersey não houve associação da acidez com a instabilidade, mas, o teor de ST foi associado com o aumento da ocorrência de instabilidade. Esta associação pode ser justificada pelo maior teor de sólidos no leite, específico da raça Jersey, que promove maior acidez natural do leite (DURR; FONTANELI; MORO, 2001). Devido a isso, a acidez na raça Jersey, não apresentou associação com a ocorrência de instabilidade no leite na presente pesquisa.

2.6 CONCLUSÕES

Animais especializados dos rebanhos das raças Holandesa e Jersey apresentaram alta estabilidade do leite, com grande proporção de amostras estáveis em etanol acima de 80% v/v. Adicionalmente, apenas 20% das amostras de ambas as raças foram consideradas LINA.

A composição do leite das amostras dos dois rebanhos não foi afetada em função do nível de estabilidade, porém, o maior número de partos e DEL avançado causaram maior impacto na ocorrência de instabilidade do leite na raça Holandesa, enquanto que o maior teor de sólidos totais teve maior impacto na raça Jersey.

Na raça Holandesa, o DEL avançado e a CCS, esta ainda que não muito expressiva, interferiram negativamente nos teores de lactose e na estabilidade do leite. Por outro lado, o ECC não foi considerado uma medida segura para avaliar a estabilidade do leite nas raças Holandesa e Jersey, uma vez que a correlação entre ECC e estabilidade foi fraca e não significativa.

A acidez apresentou associação com a instabilidade do leite no rebanho Holandês. No entanto, no rebanho Jersey, essa associação não foi observada devido à maior acidez natural do leite desta raça.

A estabilidade do leite das amostras de leite dos rebanhos da raça Holandesa e Jersey apresentou forte associação negativa com a concentração de Ca^{2+} . Este foi considerado o principal fator associado à instabilidade do leite em ambas as raças, demonstrando que a concentração de cálcio iônico no leite é um importante parâmetro na avaliação da estabilidade.

REFERÊNCIAS

AOAC: Association of Official Analytical Chemists. In: **Official Methods of Analysis of AOAC International, Official Method 960.52/920.39**. 20 ed. Rockville, 2016. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19720492404>. Acesso em: 16 jun. 2021

AGENÄS, S.; DAHLBORN, K.; HOLTENIUS, K. Changes in metabolism and milk production during and after feed deprivation in primiparous cows selected for different milk fat content. **Livestock Production Science**, v. 83, n. 2–3, p. 153–164, 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0301622603000964>. Acesso em: 21 set. 2021.

ALVARES, C. A. et al. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische**

Zeitschrift, v. 22, n. 6, p. 711–728, 2013.

BACKES, R. G.; STEFANI, L. M.; PASETTI, M. Leite termicamente instável – problemas e soluções tecnológicas. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 11, n. 3, p. 254–260, 2012.

BARBOSA, R. S. et al. Efeito do período de lactação e estabilidade do leite sobre as características físico-químicas. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 3, n. 1, p. 7–12, 2009.

BARROS, L. et al. Prueba del alcohol em leche y relación con calcio iónico. **Veterinary Practice**, v. 9, p. 315, 1999.

BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nurtição de ruminantes**. 1 ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 583 p.

BOTARO, B.; MACHADO, P. F. Composição e frações proteicas do leite de rebanhos bovinos comerciais. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n. 1, p. 81–91, 2011. Disponível em: [https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/veterinaria-e-zootecnia/18-\(2011\)-1/composicao-e-fracoes-proteicas-do-leite-de-rebanhos-bovinos-comerciais/](https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/veterinaria-e-zootecnia/18-(2011)-1/composicao-e-fracoes-proteicas-do-leite-de-rebanhos-bovinos-comerciais/). Acesso em: 19 ago. 2020.

BRASIL. Lei Nº 13,584, de 26 de Dezembro de 2017. **Diário Oficial da União**, v. 247, n. 6, p. 7042, 2017. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/lei/L13584.htm#:~:text=LEI%20N%C2%BA%2013.584%2C%20DE%2026,eu%20sanciono%20a%20seguinte%20Lei%3A&text=Bras%C3%ADlia%2C%2026%20de%20de%20de,Independ%C3%Aancia%20e%20129%C2%BA%20da%20Rep%C3%ABlica. Acesso em: 10 maio 2021.

BRASIL. Instrução normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. **Diário Oficial da União**, p. 1–8, 2018. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750137/do1-2018-11-30-instrucao-normativa-n-76-de-26-de-novembro-de-2018-52749894IN%2076. Acesso em: 17 mar. 2021.

BRITO, L. G. et al. Cartilha para o produtor de leite de Rondônia. Parte II: Aspectos técnicos. *In: Documentos/Embrapa Rondônia*, v. 1, n. 21, 40p, 2007. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/709089/cartilha-para-o-produtor-de-leite-de-rondonia-parte-ii-aspectos-tecnicos>. Acesso em: 08 jun. 2021.

CHALFUN, L. T. F. **Produção e composição do leite de diferentes grupamentos genéticos da raça Holandesa**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras. Minas Gerais. 2009. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/PRODU%C3%87%C3%83O-E-COMPOSI%C3%87%C3%83O-DO-LEITE-DE-DIFERENTES-DA-Chalfun/3ea10168f24e9e74ddf76f1bb67aece394460124>. Acesso em: 20 set. 2021.

CLIMATEMPO. **Climatologia - Carambeí PR**. Disponível em: <https://www.climatempo.com.br/climatologia/4113/carambei-pr>. Acesso em: 15 jun. 2020.

DABDOUB, S. A. M.; SHOOK, G. E. Phenotypic relations among milk yield, somatic cell count, and clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 1, p. 163–164, 1984.

DAVIS, S. . et al. Sources of variation in milk calcium content. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 56, n. 2, p. 156, 2001.

DURR, J. W.; FONTANELI, R. S.; MORO, D. V. **Determinação laboratorial dos componentes do leite**. In: Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. In: GONZÁLEZ, F. H. D., DURR, J. W., FONTANELI, R. S. Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras, Porto Alegre, 2001. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/26656/000308502.pdf>. Acesso em: 20 maio 2021.

EDMONSON, A. J. et al. A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 1, p. 68–78, 1989. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030289790810>. Acesso em: 03 jun. 2021.

EMBRAPA. Anuário do leite 2018: Indicadores, tendências e oportunidades para quem vive no setor leiteiro. 2018. Brasília. **Anuário 2018**. Brasília: EMBRAPA, 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1094149/anuario-leite-2018-indicadores-tendencias-e-oportunidades-para-quem-vive-no-setor-leiteiro>. Acesso em: 20 maio 2021.

EMBRAPA. Anuário do Leite 2019: Novos produtos e novas estratégias da cadeia do leite para ganhar competitividade e conquistar os clientes finais. **Anuario Leite**. Brasília: EMBRAPA, 2019. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1109959/anuario-leite-2019-novos-produtos-e-novas-estrategias-da-cadeia-do-leite-para-ganhar-competitividade-e-conquistar-os-clientes-finais>. Acesso em: 20 maio 2021.

FAGNANI, R. et al. Acid-base balance of dairy cows and its relationship with alcoholic stability and mineral composition of milk 1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 5, p. 398–402, 2014.

FAGNANI, R. et al. Estabilidade do leite ao álcool ainda pode ser um indicador confiável? **Ciencia Animal Brasileira**, v. 17, n. 3, p. 386–394, 2016.

FARIA, P. F. et al. Unstable milk occurrence in the semi-arid region and its relation with the physico-chemical characteristics of milk. **Livestock Research for Rural Development**, v. 29, n. 1, p. 1–8, 2017.

FISCHER, V. Relatório técnico final das atividades desenvolvidas relativas ao projeto 474974/2003-0. Rio Grande do Sul. Anais [...] **Incidência, caracterização, quadro experimental e tratamento do leite instável não ácido (lina) no Rio Grande do Sul**. Rio Grande do Sul, 2005.

FISCHER, V. et al. Leite instável não ácido: Um problema solucionável? **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 3, p. 838–849, 2012.

GAUCHERON, F. The minerals of milk. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, n. 4, p. 473–483, 2005.

GONZÁLEZ, F. H. D. Ferramentas De Diagnóstico E Monitoramento Das Doenças Metabólicas. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, n. 4, p. 1–22, 2009. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/7662>. Acesso em: 21 set. 2021.

HORNE, D. S. Advanced dairy chemistry volume 1B: Ethanol Stability and Milk Composition. **Advanced Dairy Chemistry: Volume 1B: Proteins: Applied Aspects: Fourth Edition**, v. 1, n. 4, p. 225–246, 2016. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4939-2800-2_9. Acesso em: 04 jun. 2021.

HORNE, D. S.; PARKER, T. G. Factors affecting the ethanol stability of bovine milk V. Effects of chemical modification of milk protein. **Journal of Dairy Research**, v. 49, n. 3, p. 449–457, 1982.

KELLY, P. M. Innovation in milk powder technology. **International Journal of Dairy Technology**, v. 59, n. 2, p. 70–75, 2006. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1471-0307.2006.00251.x>. Acesso em: 20 jul. 2021.

MACHADO, S. C. et al. Seasonal variation, method of determination of bovine milk stability, and its relation with physical, chemical, and sanitary characteristics of raw milk. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 46, n. 4, p. 340–347, 2017.

MAPA. Instrução Normativa nº76, de 26 de novembro de 2018. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado. **Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 nov. 2018**, v. Seção 1, n. 89, p. 1–9, 2018. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750137/do1-2018-11-30-instrucao-normativa-n-76-de-26-de-novembro-de-2018-52749894IN%2076. Acesso em: 17 abr. 2020.

MARQUES, L. et al. Ocorrência do leite instável ao álcool 76% e não ácido (lina) e efeito sobre os aspectos físico-químicos do leite. **Revista brasileira de agrociencia**, v. 13, n. 1, p. 91–97, 2007.

MARQUES, L. T. et al. Fornecimento de suplementos com diferentes níveis de energia e proteína para vacas Jersey e seus efeitos sobre a instabilidade do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 12, p. 2724–2730, 2010.

MARQUES, L. T. et al. Produção leiteira, composição do leite e perfil bioquímico sanguíneo de vacas lactantes sob suplementação com sal aniônico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 5, p. 1088–1094, 2011.

MARTINS, C. M. M. R. et al. Effect of dietary cation-anion difference on performance of lactating dairy cows and stability of milk proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 4, p. 1–12, 2015.

MARX, I. G. et al. Ocorrência de Leite Instável não Ácido na Região Oeste do Paraná. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 13, n. 1, p. 101–112, 2011.

MOLINA, L. H. et al. Correlacion entre la termoestabilidad y prueba de alcohol de la leche a nivel de un centro de acopio lechero. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 33, n. 2, p. 233–240, 2001.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 425 p.

OLIVEIRA, C. A. F. DE et al. Composição e características físico-químicas do leite instável não ácido recebido em laticínio do Estado de São Paulo , Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12, n. 2, p. 508–515, 2011. Disponível em: <https://periodicos.ufba.br/index.php/rbspa/article/view/40474>. Acesso em: 27 maio 2021.

OMOARUKHE, E. D. et al. Effects of different calcium salts on properties of milk related to heat stability. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63, n. 4, p. 504–511, 2010. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1471-0307.2010.00613.x>. Acesso em: 09 jun. 2021.

PACHECO, R. F. et al. Probabilidade de produção de leite com teores de gordura e proteína desejados pela indústria. **Boletim de Indústria Animal**, v. 77, n. 0, p. 1–14, 2020. Disponível em: <http://iz.sp.gov.br/bia/index.php/bia/article/view/1710>. Acesso em: 07 jun. 2021.

PEREIRA, D. C. et al. Perfil das propriedades leiteiras e ocorrência de leite instável não ácido (LINA) da região de Muriaé, Minas Gerais. **Revista UniScience**, v. 2, n. 1, p. 66–77, 2019. Disponível em: <https://academico.univiosa.com.br/revista/index.php/RevistaTecnologiaeCiencia/article/view/1289>. Acesso em: 24 jun. 2021.

PRESCOTT, S. C.; BREED, R. S. The determination of the number of body cells. **American Journal of public hygiene**, v. 20, n. 3, p. 663–664, 1910. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2543863/>. Acesso em: 16 jun. 2021.

RIBEIRO JÚNIOR, J. C.; BELOTI, V.; SILVA, L. C. C.; TAMANINI, R. Avaliação da qualidade microbiológica e físico- química do leite cru refrigerado produzido na região de Ivaiporã, Paraná. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 392, p. 5–11, 2013. Disponível em: <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/23>. Acesso em: 09 jun. 2019.

ROCHA, D. T. DA; CARVALHO, G. R.; RESENDE, J. C. DE. **Cadeia produtiva do leite no Brasil: produção primária**. In: Circular Técnica, 123, 2020. Juiz de Fora. 2020. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/215880/1/CT-123.pdf>. Acesso em: 15 abr. 2021.

ROSA, P. P. et al. Fatores etiológicos que afetam a qualidade do leite e o Leite Instável Não Ácido (LINA). **Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 18, n. 12, p. 1–17, 2017.

SILVA, L. C. C. DA et al. Estabilidade Térmica Da Caseína E Estabilidade Ao Álcool 68 , 72 , 75 E 78 % , Em Leite Bovino. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 384, p. 55–60, 2012. Disponível em: <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/198>. Acesso em: 24 maio 2021.

SINGH, H. Heat stability of milk. **Journal of Dairy Research**, v. 47, n. 2/3, p. 199–210, 2004. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1471-0307.2004.00143.x>. Acesso em: 30 jun. 2021.

SHEW, D. I. **Technical aspects of quality assurance**. In: IDF Document 133, New Monograph on UHT Milk. International Dairy Federation. Belgium. 1981. Disponível em: <https://fil-idf.org/publications/bulletin/new-monograph-on-uht-milk/>. Acesso em: 20 jul. 2021.

SHOOK, G. E. Approaches to summarizing somatic cell count which improve interpretability. In: **Proceedings [...] National Mastitis Council Annual Meeting**, 21. 1982, Pennsylvanis. Madison: National Mastitis Council, 1982. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000117&pid=S1516-3598200400050002300019&lng=pt. Acesso em: 30 jun. 2019.

STELWAGEN, K. et al. Short communication: Effects of isolation stress on mammary tight junctions in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 1, p. 48–51, 2000.

TRONCO, V. M. **Manual para Inspeção da Qualidade do Leite**. 5 ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2013. 208 p.

VOGES, J. G. et al. Relationship between farm structure and animal feed in unstable non-acid milk occurrence in Planalto Norte of Santa Catarina. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 19, n. e-50399, p. 1–13, 2018.

ZANELA, M. B. et al. Leite instável não-ácido e composição do leite de vacas Jersey sob restrição alimentar. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 41, n. 5, p. 835–840, 2006.

ZANELA, M. B. et al. Ocorrência do leite instável não ácido no noroeste do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 61, n. 4, p. 1009–1013, 2009.