

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



Tese

**Perfil eletroforético das proteínas do leite e estabilidade no
teste do álcool**

ROSÂNGELA SILVEIRA BARBOSA

Pelotas, 2011

ROSÂNGELA SILVEIRA BARBOSA

Perfil eletroforético das proteínas do leite e estabilidade no teste do álcool

Tese apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação da Prof^a. Vivian Fischer, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração: Produção Animal, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Vivian Fischer

Co-orientadores: Waldyr Stumpf Junior

Antônio Sílvio do Egito

Jerri Teixeira Zanusso

PELOTAS, 2011

Dados de catalogação na fonte:

(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

B238p Barbosa, Rosângela Silveira

Perfil eletroforético das proteínas do leite e estabilidade no teste do álcool / Rosângela Silveira Barbosa ; orientador Vivian Fischer; co-orientadores Waldyr Stumpf Junior, Antônio Sílvio do Egito e Jerri Teixeira Zanusso. - Pelotas, 2011.-134f. : il. - Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2011.

1.Rebanho leiteiro 2.Nutrição animal 3.Leite instável não ácido 4 Eletroforese 5 Determinação de proteínas

BANCA EXAMINADORA:

Dr^a. Vivian Fischer

Dr^a. Isabella Dias Barbosa Silveira

Dr. Luiz Barros Vidal

Dr^a. Maira Balbinotti Zanela

Dr. Jorge Schafhäuser Júnior

Nossa alma espera no SENHOR; ele é o nosso auxílio e o nosso escudo. Pois nele se alegra o nosso coração; porquanto temos confiado no seu santo nome. Seja a tua misericórdia, SENHOR, sobre nós, como em ti esperamos. (Salmo 33, 20-22)

Ao meu marido, Leandro von Hausen.

Grande incentivador.

Sempre presente com sua dedicação, compreensão e imenso amor.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora por iluminar o meu caminho e guiar os meus passos rumo a realização dos meus sonhos.

Ao meu marido que juntos ganhamos uma filha saudável e maravilhosa durante a realização de nossas tarefas científicas. Por entender-me pela ausência em muitos momentos que me dediquei ao doutorado e a nossa filha.

À minha filha Nathalia Barbosa von Hausen e meus filhos de coração, Gabriel e Mateus Barbosa Jacondino, que com a pureza de seus sorrisos cheios de amor incentivaram-me a prosseguir sempre sem medo e com firmeza na realização dos meus objetivos de vida.

À minha família extraordinária. Meus pais insubstituíveis, Suly e Celina, que me orientaram para a vida e fizeram disso, uma tarefa incansável de amor e perseverança. Ângela e Benhur Jacondino, mais que uma irmã e que um cunhado, pelo apoio, carinho e amor. E, é claro, que não poderia deixar de agradecer que durante os meus momentos ausentes, vocês me substituíram muito bem no cuidado, carinho, educação, zelo e amor à minha filha.

Aos meus sogros, Leandro e Dalva von Hausen, pelo apoio, zelo e amor à minha filha nos momentos ausentes de meu marido e compreensão pelos meus atos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal de Pelotas, professores, funcionários e colegas, na pessoa de incríveis, Orientadora Prof. Vivian Fischer, do Prof. Jerri Teixeira Zanusso e Prof. Isabella Dias Barbosa Silveira por acreditarem no meu potencial, pela oportunidade de realização do doutorado e contribuírem no meu crescimento científico.

À Embrapa pelo convênio de pesquisa, recursos financeiros, cessão das instalações, animais experimentais, funcionário e apoio logístico. Aos pesquisadores, funcionários e estagiários, na pessoa de pesquisadores ilustres, Maria Edi Rocha Ribeiro; Waldyr Stumpf Junior, Jorge Schafhäuser Júnior e Maira Balbinotti Zanela, da Embrapa Clima Temperado e Antônio Sílvio do Egito, da Embrapa Caprinos pelos ensinamentos, incentivo e amizade.

À Universidade de Montevideo, Faculdade de Veterinária, pelo convênio de pesquisa e pela colaboração atuante do Prof. Luis Eduardo Barros Vidal.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Aos demais parentes e amigos pela paciência e compreensão da ausência, incentivo e carinho.

RESUMO

BARBOSA, ROSÂNGELA SILVEIRA. **Perfil eletroforético das proteínas do leite e estabilidade no teste do álcool**. 2011. 135f. Tese (Doutorado) – Programa em Pós-Graduação em Zootecnia – FAEM - Universidade Federal de Pelotas. Pelotas/RS.

O Leite Instável Não Ácido (LINA) caracteriza-se pela perda da estabilidade das caseínas, resultando em precipitação positiva ao teste do álcool, sem apresentar acidez elevada – acima de 18°D e com alterações nas suas propriedades físico-químicas. Dentre as propriedades químicas destaca-se a diferença na porcentagem de proteína total e das frações protéicas entre leite estável e aquele instável no teste do álcool. O objetivo foi avaliar a relação entre o perfil eletroforético das frações protéicas do leite e sua estabilidade no teste do álcool com vacas recebendo diferentes dietas. Os experimentos foram conduzidos na bacia leiteira de Pelotas, zona sul do Rio Grande do Sul – Brasil. O primeiro foi realizado na Embrapa Clima Temperado, nas estações de outono e inverno (de abril a agosto), com dois tratamentos: controle (dieta equilibrada) e restrição alimentar (60% de fornecimento de alimento), em seis vacas em lactação da raça Jersey, no estágio inicial de lactação. O segundo experimento foi realizado na Embrapa Clima Temperado, na estação do outono (maio a junho), com três tratamentos: controle (atendendo 100% das exigências nutricionais), adição de bicarbonato de sódio e adição de citrato de sódio, usando 17 vacas da raça Jersey, com média de 30 semanas de lactação). O terceiro experimento foi realizado no Colégio Agrícola Visconde da Graça – UFPel,

nas estações: final de verão e início do outono (março a abril), com 3 tratamentos: controle (sem atender as necessidades nutricionais dos animais), 100% de atendimento das exigências energéticas e 100% de atendimento das exigências energético-protéicas, usando 12 vacas da raças Jersey e Holandês, no primeiro e segundo estágio de lactação. Em todas as etapas foram realizadas as análises: teste do álcool (68 a 80°GL v/v, acidez titulável, pH, fervura, composição química (gordura, proteína, lactose, sólidos totais), contagem de células somáticas. Foram avaliados os parâmetros de produção de leite, peso corporal, escore da condição corporal. Além dessas, foi realizado eletroforese em gel de poliacrilamida 15% para determinação das frações protéicas do leite. No primeiro experimento, conclui-se que as dietas não alteraram as frações protéicas, composição e estabilidade do leite e parâmetros produtivos das vacas em estudo, com exceção da produção de leite. Já com relação a comparação de leite estável e leite instável no teste do álcool houve diferenças na fração protéica β -caseína. O grupo de vacas com menor estabilidade do leite apresentou menor proporção de β , mas maior de κ -CN, caseína total e proporção de caseína. No segundo experimento, os aditivos bicarbonato de sódio e citrato de sódio influenciaram apenas as frações protéicas β e κ -caseína. O leite instável apresentou maiores quantidades de α_s -caseína. No terceiro experimento, as dietas ajustadas foram suficientes para reverter o quadro de LINA, causar influência na produção do leite, proteína, sólidos totais e teor de cálcio no leite e sangue.

Palavras-chave: Rebanho leiteiro. Nutrição Animal. Leite Instável Não Ácido. Eletroforese. Determinação de proteínas.

ABSTRACT

BARBOSA, ROSÂNGELA SILVEIRA. **Electrophoretic profile of milk proteins and stability in alcohol test.** 2011. 135f. Tese (Doutorado) – Programa em Pós-Graduação em Zootecnia – FAEM - Universidade Federal de Pelotas. Pelotas/RS.

Unstable non acid milk (LINA) characterizes for lack of stability of caseins, resulting in coagulation in the alcohol test, without high acidity, above 18°D and with changes in the milk's physic and chemical properties. Among chemical attributes, differences of total crude protein and protein fractions percentages are noticeable between stable and unstable milk. This study aimed to evaluate the relation between milk's electrophoretic profile and stability in the alcohol test with cows being fed with different diets. The trials were conducted at the dairy region of Pelotas, at the south of Rio Grande do sul State, Brazil. The first trial was held at the Embrapa Clima Temperado, from April to August, with two diets: control and feeding restriction, 100 and 60% of previous feeding amounts, with six Jersey cows, at the beginning of their lactation. The second trial was held at the Embrapa Clima Temperado, from May to June, with three diets: control (no additive inclusion), addition of sodium bicarbonate and addition of sodium citrate, with 17 Jersey cows at all lactation stages (76 to 293 days in milking). The third trial was held at the Colégio Agrícola Visconde da Graça – UFPEL, from march to April, with three diets: control (deficient), 100% of energy nutritional requirements and 100% of protein-energy nutritional requirements, using 12 Holstein and Jersey cows, at the beginning and mid lactation. In all evaluations the following analyses were performed: alcohol test (with ethanol concentration from 68 to 80°GL v/v), titrable acidity, pH, boiling test, chemical composition, Somatic Cells Count (SCC). Besides, milk production, body weight, body condition score were

also evaluated. Milk's protein fractions were evaluate with electrophoreses in 12% poliacrilamide gel. In the first trial, diets did not change protein fraction of the milk not its composition and stability, just milk production. However, stable milk and unstable milk presented differences for κ -CN percentages. In the second, the addition of sodium bicarbonate and addition of sodium citrate, influenced protein fraction β e κ -CN. The unstable milk presented higher amounts of α_s -CN. In the third, the adjusted diets could alter milk production, protein, total solids and levels of calcium in milk and blood.

Key words: Dairy herd. Animal nutrition. Unstable non acid milk. Electrophoreses. Protein fractions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelos sugeridos para as micelas de caseína.....	27
Figura 2	Comparação eletroforética das caseínas de alguns mamíferos poligástricos e monogástricos.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Aminoácidos essenciais e não-essenciais nos mamíferos.....	23
Tabela 2	Concentração média de substâncias nitrogenadas (% nitrogênio total) do leite de vaca.....	24
Tabela 3	Diferenças importantes entre caseínas e proteínas do soro.....	25
Tabela 4	Composição (%) do leite de vacas de diferentes raças especializadas de regiões temperadas.....	40
Tabela 5	Composição química da dieta do período pré-experimental fornecida vacas em lactação da raça Jersey.....	57
Tabela 6	Composição química da dieta controle do período experimental fornecida às vacas em lactação da raça Jersey.....	58
Tabela 7	Distribuição de dietas aos grupos de vacas durante a realização do experimento com vacas em lactação.....	58
Tabela 8	Valores médios da composição físico-química e estabilidade do leite de vacas da raça Jersey submetidas à dieta controle e de restrição e valores de probabilidade do efeito do período experimental.....	62
Tabela 9	Valores percentuais das frações protéicas do leite de vacas da raça Jersey submetidas à dieta controle e de restrição e valores de probabilidade do efeito do período experimental.....	64
Tabela 10	Valores percentuais das frações protéicas e composição física e estabilidade do leite de acordo com o grupo de vacas da raça Jersey submetidas à dieta equilibrada e de restrição.....	66
Tabela 11	Valores médios dos parâmetros produtivos de vacas da raça Jersey submetidas à dieta controle e de restrição.....	67
Tabela 12	Valores médios das frações protéicas do leite de vacas da raça	

	Jersey suplementadas com aditivos quanto à dieta.....	79
Tabela 13	Valores percentuais das frações protéicas no leite de vacas da raça Jersey sob dietas suplementadas com aditivos (bicarbonato e citrato) de acordo com a estabilidade do leite no teste do álcool 72% (v/v), experimento e interação estabilidade x experimento (ESTAB x EXP).....	80
Tabela 14	Quantidade dos alimentos (expressos como kg de matéria seca/animal/dia) utilizados na formulação dos suplementos e sua composição química.....	92
Tabela 15	Valores médios das características físico-químicas do leite em rebanho misto com dietas ajustadas: controle, sem ajuste; dieta energética; dieta energética e protéica, em Pelotas/RS.....	97
Tabela 16	Valores médios das características químicas e Contagem de Células Somáticas (CCS) do leite em rebanho misto com dietas ajustadas: controle, sem ajuste; dieta energética; dieta energética e protéica, em Pelotas/RS.....	99
Tabela 17	Valores médios do cálcio iônico no leite, cálcio total no sangue e no leite em rebanho misto com dietas ajustadas: controle, sem ajuste; dieta energética; dieta energética e protéica, em Pelotas/RS.....	99

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	19
REVISÃO DE LITERATURA.....	22
1. Leite.....	22
1.1. Composição do leite.....	22
1.1.1. Proteínas.....	23
1.1.1.1. Caseínas.....	25
1.1.1.1.1. Estrutura da micela natural da caseína.....	26
1.1.1.1.2. Propriedades da caseína.....	28
1.1.1.1.3. Estabilidade da micela de caseína.....	29
1.1.1.2. Soro-proteínas.....	32
1.1.1.2.1. Estabilidade das soro-proteínas.....	33
1.1.1.3. Desnaturação protéica.....	34
1.1.1.4. Eletroforese.....	34
1.1.2. Lactose.....	37
1.1.3. Gordura.....	38
1.1.4. Sais e minerais.....	38
1.2. Fatores que interferem na produção e composição do leite.....	39
1.2.1. Genéticos (espécie, raça e indivíduo).....	39
1.2.2. Não-genéticos.....	40
1.2.2.1. Idade.....	40

1.2.2.2. Número de lactações.....	41
1.2.2.3. Gestação.....	41
1.2.2.4. Período de lactação.....	41
1.2.3. Ambientais.....	42
1.2.3.1. Período seco e condições físicas da vaca.....	42
1.2.3.2. Peso das vacas.....	42
1. 2.3.3. Intervalo entre partos.....	42
1.2.3.4. Intervalo entre ordenha.....	43
1.2.3.5. Durante a ordenha.....	43
1.2.3.6. Estação do ano, temperatura e umidade do ar.....	43
1.2.4. Saúde do rebanho.....	44
1.2.5. Stress do animal.....	45
1.2.6. Alimentação.....	46
1.3. Leite Instável Não Ácido (LINA).....	48
1.3.1. Conceito.....	48
1.3.2. Ocorrência do LINA.....	48
1.3.3. Características físico-químicas do LINA.....	49
1.3.4. Perfil sanguíneo do LINA.....	50
1.3.5. Influência da nutrição no LINA.....	51
 CAPÍTULO 1.....	 52
 AVALIAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS, COMPOSIÇÃO E ESTABILIDADE DO LEITE DE VACAS EM LACTAÇÃO COM RESTRIÇÃO ALIMENTAR.....	 52
 INTRODUÇÃO.....	 53
 MATERIAL E MÉTODOS.....	 56
1. Seleção dos animais.....	56
2. Período pré-experimental.....	56

3. Período experimental.....	57
4. Análises físico-químicas do leite.....	58
5. Análises eletroforéticas.....	59
6. Parâmetros produtivos.....	60
7. Análise estatística.....	60
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
CONCLUSÃO.....	69
 CAPÍTULO 2.....	 70
RELAÇÃO ENTRE O PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS COM A COMPOSIÇÃO E ESTABILIDADE DO LEITE DE VACAS JERSEY CONSUMINDO DIETAS COM OU SEM ADITIVOS.....	 70
 INTRODUÇÃO.....	 71
 MATERIAL E MÉTODOS.....	 73
1. Seleção dos animais.....	73
2. Período Experimental.....	73
3. Análises eletroforéticas no leite.....	74
4. Análises físicas do leite.....	75
5. Análise estatística.....	75
 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 77
CONCLUSÃO.....	85
 CAPÍTULO 3.....	 86
 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE INSTÁVEL NÃO ÁCIDO SOB DIETAS AJUSTADAS EM ENERGIA E PROTEÍNA.....	 86
 INTRODUÇÃO.....	 87

MATERIAL E MÉTODOS.....	90
1. Seleção dos animais.....	90
2. Alimentação.....	90
3. Avaliação de parâmetros produtivos e análises físico-químicas do leite.....	93
4. Análises eletroforéticas no leite.....	93
5. Análises de minerais no sangue.....	94
6. Análise estatística.....	95
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	96
CONCLUSÃO.....	101
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
APÊNDICES.....	117

INTRODUÇÃO GERAL

O cenário brasileiro de produção de leite apresentou mudança a partir de 2004, com isso, o Brasil passou a ser um país exportador de produtos lácteos, mais precisamente de leite em pó e leite condensado. Atualmente, ocupa o sexto lugar em produção mundial com 29 milhões de toneladas, mas ainda, necessita vencer muitos desafios para a consolidação e abertura de novos mercados.

O Brasil é uma imensa bacia leiteira com aproximadamente 558 microrregiões, 1,3 milhões de produtores de leite e centenas de pessoas envolvidas em toda a cadeia produtiva do leite. Mas, infelizmente, o índice de analfabetismo está estimado ao redor de 14%, destes, a maioria estão ligados ao meio rural. No entanto, é um fato consumado, de que a maioria dos municípios brasileiros possui pessoas ligadas ao meio rural e mais precisamente a produção de leite. Logo, há um caminho árduo a percorrer para proporcionar o conhecimento técnico e científico a esses produtores de leite, a fim de mantê-los no meio rural com condições de produzirem de forma eficiente e com qualidade. Baseado nisto, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) através da Instrução Normativa 51 (IN 51/2002) vem trabalhando com avidez, desenvolvendo ações desde o produtor até a indústria como: estímulo à refrigeração do leite na propriedade; transporte do leite a granel; criação da Rede Brasileira de Controle de Qualidade do Leite – RBQL, com laboratórios regionais centralizados; cadastro de produtores e indústria de leite; coletas de amostras de leite mensais para análise de qualidade; limites legais para componentes, células somáticas e contagem bacteriana total do leite; erradicação de brucelose e tuberculose; Plano Nacional de controle de resíduos e contaminantes e habilitação de indústrias para exportação.

Com isso, novos desafios são almejados para o fortalecimento da cadeia produtiva do leite. Segundo Ribas (2010) deve haver ações integradas entre MAPA, Indústria, Laboratórios de Qualidade do Leite e Produtores; ações de “Educação Continuada” para produtores, com trabalho integrado das Federações de Agricultura, Cooperativas, EMATERs e Associações de Produtores para a implementação de programas de boas práticas de produção, qualidade do leite e gestão de propriedades leiteiras.

Entretanto, existem muitas falhas em toda a cadeia produtiva. No que se refere à produção da matéria-prima, à reprodução, à alimentação e à sanidade dos animais (nesta, destaca-se a qualidade do leite) são fatores que influenciam diretamente na eficiência produtiva da unidade de produção de leite (UPL). Embora o Brasil possua algumas características muito particulares, como baixo custo de produção de leite e acessibilidade a oferta de alimentos concentrados, é necessário que haja melhora nesta eficiência produtiva para que ascenda no mercado exportador com continuidade e permanência, principalmente com relação à fortificação do sistema a pasto, tecnificação da mão-de-obra e a qualidade do leite.

Com relação à qualidade do leite, não deve apresentar alterações na composição físico-química e organoléptica, ter baixa contagem de células somáticas e contagem total de bactérias, originado de rebanhos com sanidade controlada e ser isento de resíduos de antibióticos, desinfetantes ou adulterantes. Segundo a IN 51 (BRASIL, 2002) a indústria utiliza muitos critérios para verificação da qualidade do leite, no entanto, o transportador utiliza o teste do álcool no momento da coleta do leite na UPL como indicador da estabilidade do leite submetido, posteriormente, ao processamento térmico. Com tudo, pesquisas mostram que o referido teste apresenta imprecisão e subjetividade. E, muitas vezes, erroneamente classifica um leite como ácido e não transporta até a indústria, tratando-se na verdade de instabilidade do leite sem, portanto, haver alterações na sua acidez.

Atualmente, a instabilidade do leite é um problema frequentemente encontrado em países em desenvolvimento e em vários estados do Brasil, apresentando uma ocorrência acima de 50%. No Brasil, esta instabilidade foi denominada como Leite Instável Não Ácido (LINA). O LINA caracteriza-se pela perda da estabilidade da caseína, resultando em precipitação positiva ao teste do

álcool, sem apresentar acidez elevada – acima de 18°D e com alterações nas propriedades físico-químicas do leite. Dentre as propriedades químicas destaca-se, não mais importante que as outras, a diferença na porcentagem de proteína total e na quantidade das frações protéicas do leite.

A hipótese do trabalho é que a diferença quantitativa das frações protéicas do leite pode alterar a sua estabilidade, objetivando com isso, avaliar o perfil eletroforético do leite de vacas recebendo diferentes dietas e relacionar com a estabilidade no teste do álcool.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Leite

No Primeiro Congresso Internacional para a Repressão de Fraudes realizado em Genebra, em 1908, definiu-se o leite como o produto integral, não alterado nem adulterado e sem colostro, procedente da secreção de glândula mamárias dos mamíferos (SGARBIERI, 1996), obtido por ordenha higiênica, regular, completa e ininterrupta das fêmeas domésticas saudáveis e bem-alimentadas (ORDOÑEZ, 2005).

O leite é o único alimento para os mamíferos e humanos na primeira etapa da vida (SGARBIERI, 1996; ORDOÑEZ et al., 2005). Contudo, o leite e seus derivados são os principais componentes da dieta humana em muitas partes do mundo (FOX & MCSWEENEY, 1998) e constituem uma das principais fontes de proteínas na alimentação de mamíferos jovens e de humanos de todas as idades (SGARBIERI, 1996).

1.1. Composição do leite

O leite bovino é um fluído composto de uma série de nutrientes sintetizados na glândula mamária, a partir de precursores derivados da alimentação e do metabolismo. É uma mistura homogênea composta de água, proteínas, gorduras, lactose, minerais, vitaminas e enzimas (GONZÁLEZ, 2001). Dentre os constituintes, a água é o componente que se apresenta em maior proporção. Enquanto que, a gordura é o componente mais variável entre as espécies, alcançando valores extremamente elevados em determinados mamíferos e entre raças; de maneira

geral, o seu teor é inversamente proporcional à quantidade de leite produzido (ORDÓÑEZ et al., 2005). Alguns minerais apresentam-se na forma de solução iônica, a lactose e a albumina aparecem como solução verdadeira, a gordura na forma de pequenos glóbulos dispersos, constituindo uma emulsão e a caseína e os fosfatos no estado de dispersão coloidal (TRONCO, 1997).

1.1.1. Proteínas

As proteínas são moléculas de grande porte (macromoléculas) e todas elas constituídas a partir de 20 aminoácidos (Tabela 1), unidos por ligações peptídicas, variando nas diferentes proteínas tão somente o número e a sequência dos aminoácidos. Todos os aminoácidos têm em comum a presença de um grupo carboxila e de um grupo amina unidos ao mesmo carbono (carbono α) e diferem entre si na estrutura do seu grupo residual (grupo R) (GONZÁLEZ & SILVA, 2006; KAMOUN, 2006).

Tabela 1. Aminoácidos essenciais e não-essenciais nos mamíferos

AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS	AMINOÁCIDOS NÃO-ESSENCIAIS
Arginina	Alanina
Histidina	Aspártico
Isoleucina	Asparagina
Leucina	Glutâmico
Lisina	Glutamina
Metionina	Cisteína
Fenilalanina	Glicina
Treonina	Prolina
Triptofano	Serina
Valina	Tirosina

Fonte: GONZÁLES & SILVA, 2006.

González & Silva (2006) dizem que o organismo dos mamíferos não pode sintetizar todos os aminoácidos que formam parte das proteínas. Dez dos 20 aminoácidos protéicos são *aminoácidos essenciais* (Tabela 1), isto é, devem ser incorporados na dieta dos mamíferos. Sem estes aminoácidos o organismo não

pode sintetizar as proteínas de reposição e aquelas necessárias nos processos de crescimento ou aqueles que exigem síntese protéica (gestação, lactação, etc.). Entretanto, os ruminantes comportam-se de uma forma diferente, pois as bactérias do rúmen têm condições de sintetizá-los (VAN SOEST, 1994).

As proteínas representam 95% dos compostos nitrogenados e sua grande importância no leite se refere tanto ao ponto de vista quantitativo como qualitativo. Na tabela 2, apresenta-se a composição em substâncias nitrogenadas do leite de vaca.

TABELA 2. Concentração média de substâncias nitrogenadas (% nitrogênio total) do leite de vaca

PROTEÍNAS	95%
Caseínas	76
α_{s1}	30
α_{s2}	8
β	27
κ	9
γ	2
Proteínas do soro	19
β -lactoglobulina	9,5
α -lactoalbumina	3,5
Soroalbumina bovina	1,0
Imunoglobulinas	2,0
Outras	3,0
NITROGÊNIO NÃO-PROTÉICO	5%
Peptídeos	
Aminoácidos livres	
Outras substâncias	

Fonte: adaptado de ORDÓÑEZ et al., 2005.

Ordóñez et al. (2005) diz que as β -lactoglobulina e a α -lactoalbumina representam 50 e 20% das proteínas do soro. Já, Farrell et al. (2004) afirmam que as caseínas α_{s1} , α_{s2} , β e κ constituem aproximadamente 40, 10, 45 e 5% da fração de caseína no leite bovino e as quantidades de imunoglobulina do leite são de aproximadamente 6% do total de proteínas do soro.

As proteínas do leite podem ser classificadas em quatro grupos: caseínas, proteínas do soro, proteínas das membranas dos glóbulos de gorduras e outras. Segundo Ordóñez et al. (2005), as caseínas e as proteínas do soro diferenciam-se por sua origem, características químicas e tecnológicas (Tabela 3).

Tabela 3. Diferenças importantes entre caseínas e proteínas do soro

CARACTERÍSTICA	CASEÍNAS	PROTEÍNAS DO SORO
Solubilidade a pH 4,6	Não	Sim
Coagulação por quimosina (enzima)	Sim	Não
Termoresistência	Sim	Não
Fósforo	Sim	Não
Enxofre	0,8% (fundamentalmente Metionina)	1,7% (Metionina e Cisteína*)
Origem	Glândula mamária	Glândula mamária e plasma sanguíneo
Estado	Coloidal	Em dissolução

Fonte: adaptado de ORDÓÑEZ et al., 2005. *A presença de dois resíduos de cisteína por molécula, com grupos –SH livres, é muito importante porque permite a união dessas proteínas com as outras mediante ligações dissulfeto.

Todas as caseínas são sintetizadas na glândula mamária, enquanto algumas proteínas do soro (p.ex., imunoglobulinas, transferrina e soroalbumina) chegam ao leite procedentes do plasma e outras são de origem mamária (α -lactoalbumina, β -lactoglobulina e lactoferrina) (ORDÓÑEZ et al., 2005).

1.1.1.1. Caseínas

No leite, a caseína existe como grandes partículas coloidais, 5-600 nm de diâmetro (média ~150 nm), chamado “micelas de caseína”. As propriedades tecnológicas do leite, por exemplo, sua cor branca, a estabilidade ao calor ou etanol e de coagulação por coalho, são devido às propriedades das micelas de caseína, o que tem sido um incentivo econômico e tecnológico para caracterizar suas propriedades e elucidar a sua estrutura (FOX & BRODKORB, 2008).

A caseína pode ser definida, de maneira simplificada, como fosfoproteína precipitada por acidificação do leite cru desnatado a um pH 4,6 a 20°C (JENNESS et al., 1956 apud FARRELL, JR. et al., 2004), representando aproximadamente 80% do total de proteínas no leite bovino (FOX & BRODKORB, 2008). Três principais componentes são obtidos a partir da caseína: α (s_1 e s_2), β e κ , representando 50% (do total), 45% e 5%, respectivamente (FARRELL, JR. et al., 2004), existindo ainda quantidades variáveis do componente γ . Esta representa segmentos C-terminal da β -caseína, enquanto as partes correspondentes N-terminal são protease- peptonas (FOX & BRODKORB, 2008). A análise elementar da caseína (complexo α , β , κ) revela a seguinte composição: C, 53%; H 7,05%; N, 16,65%; S, 0,76%; P, 0,85%. A presença de P nas caseínas permite classificá-las como fosfoproteínas (SGARBIERI, 1996).

1.1.1.1.1. Estrutura da micela natural da caseína

Devido à sua importância comercial, as caseínas têm sido estudadas extensivamente e são, provavelmente, o melhor sistema de proteína caracterizada como alimento (FOX & BRODKORB, 2008).

Já em 1880, Danilewsky e Radenhausen informaram que a estrutura da caseína é isoelétrica e heterogênea, mas, em 1983, Hammersten desenvolveu um método de precipitação isoelétrica em pH 4,6 e em 1885 concluiu que devidamente o preparado isoelétrico da caseína é homogêneo (FOX & BRODKORB, 2008). Para Tronco (1997) a caseína é uma fosfoproteína relativamente hidrofóbica, mas apresentando também parte hidrofílica na forma de micela (grandes grânulos de proteína). Os grupos fosfato covalentes da molécula de caseína estão envolvidos na ligação com o cálcio. Após a caseína ser fosforilada, o cálcio se liga ao fosfato, formando o CCP (derivado das iniciais de *colloidal calcium phosphate* –fosfato de cálcio coloidal) para iniciar a polimerização das partículas de micela (TRONCO, 1997; ORDÓÑEZ et al., 2005). Tronco (1997) reforça dizendo que essa estrutura (caseína - PO_4 - Ca^{++} - PO_4 - caseína) é chamada de micela em formação. Ordóñez (2005), complementa, dizendo que o CCP é composto não apenas por fosfato cálcico, mas também por citrato, magnésio e outros elementos minerais.

As estruturas exatas das subunidades e das micelas de caseína ainda não foram determinadas, apenas alguns modelos têm sido sugeridos por diversos autores. Na Figura 1, pode-se observar modelos representando a estrutura das micelas de caseína. Na figura 1, letra A, mostra o modelo em roseta com subunidades de α_{s1} e β -caseínas dispostas radialmente e κ -caseína periféricamente, ou seja, mais externamente nas micelas; o modelo B, mostra a composição uniforme contendo em todas as subunidades α_{s1} , β e κ -caseínas, representando a associação das subunidades através de ligações de cálcio ou fosfato de cálcio coloidal, representado por S.

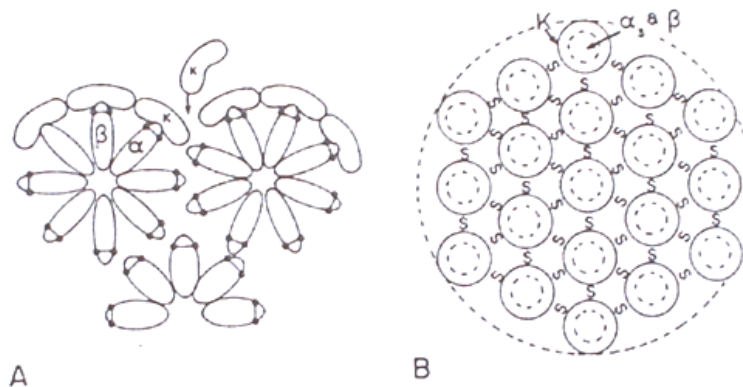


Figura 1. Modelos sugeridos para as micelas de caseína.

Fonte: Sgarbieri, 1996.

Segundo Ordóñez et al. (2005), resumindo, pode-se dizer que as micelas são partículas coloidais hidratadas com diâmetro entre 40 e 300 μm de estrutura porosa, formadas por submicelas e sua superfície é rica em κ -caseínas. Diz, ainda, que, a partir destas, sobressaem pequenas saliências em forma de capa pilosa (zonas C-terminais, carregadas negativamente).

1.1.1.1.2. Propriedades da caseína

Dentre as propriedades da caseína podemos citar a aptidão para associação e aptidão para a fixação de íons. As associações são: interações hidrofóbicas, interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio, ligações dissulfeto e complexo coloidal de fosfato de cálcio (CCP). Estas associações têm um papel importante na formação e estabilidade da micela de caseína (CHEFTEL, 1989, SGARBIERI, 1996). Mesmo na ausência de íons minerais, as caseínas têm um nível de associação muito elevado, superior ao das proteínas globulares. Esta propriedade está ligada à desigual repartição de cargas e as cadeias laterais apolares ao longo das cadeias peptídicas (CHEFTEL, 1989).

Segundo Ordóñez (2005) os aminoácidos das caseínas também não estão uniformemente distribuídos; há zonas ricas em aminoácidos polares, enquanto, em outras, concentram-se os resíduos mais apolares. A caseína β apresenta um caráter mais hidrófobo representando um poder de associação-dissociação mais elevado (CHEFTEL, 1989), dependendo da concentração de proteína, da temperatura e do pH (SGARBIERI, 1996), enquanto que a mais hidrofílica é a α_{s2} . Já, a zona próxima à carbonila terminal da κ -caseína é acentuadamente polar, sobretudo, quando contém o grupo glicosídico, enquanto o resto da molécula é bastante hidrofóbica.

Com relação à aptidão para fixação de íons, CHEFTEL (1989) diz, que uma das propriedades mais importantes da α_s e β -caseínas é a de fixar cátions bivalentes (principalmente Ca^{++}). Ao contrário das séries α_s e β , as cargas da κ -caseína não são provenientes de fosfato o que provavelmente explica a não reatividade da κ -caseína com o cálcio, mas, na presença de íons Ca^{++} reagem com as caseínas α_{s1} e β para formar micelas termodinamicamente estáveis. Existe uma concentração crítica em íons Ca^{++} superficialmente acima da qual os complexos caseína- Ca^{++} precipitam. A κ -caseína retarda estas reações, e ao evitar a precipitação, exerce um papel estabilizador de repulsão (SGARBIERI, 1996). Alguns pesquisadores dizem que a κ -caseína pode estabilizar até 10 vezes o seu peso das caseínas Ca -sensível (α_{s1} , α_{s2} e β) através da formação de micelas, pois são solúveis na presença de Ca^{++} e corresponde a aproximadamente 12% da caseína total (FOX & BRODKORB, 2008). Em presença de baixas quantidades de Ca^{++} , a κ -caseína pode associar-se às α_s e β -caseínas formando micelas sintéticas análogas as micelas naturais, mas

menos instáveis; seu tamanho depende da proporção de κ -caseína e da concentração de Ca^{++} (CHEFTEL, 1989).

Sgarbieri (1996) diz que na remoção de cálcio do sistema por agentes quelantes ou diálise verifica-se a dissociação das micelas em suas subunidades, que voltam a se reestruturar pela adição de cálcio e que a desfosforilação das caseínas α_{s1} reprime a interação estabilizadora da κ -caseína, tornando a micela instável. Sugere que o CCP desempenha um papel importante integrando as micelas (FOX & BRODKORB, 2008).

Quando o pH diminui e a força iônica aumenta se observa um decréscimo da fixação dos íons. A proporção desta fixação depende do número de sítios de fixação (variando conforme o tipo de caseína, sendo a κ -caseína mais estável); concentração de Ca^{++} no meio; temperatura; pH e força iônica (CHEFTEL, 1989).

1.1.1.1.3. Estabilidade da micela de caseína

As moléculas individuais de caseína não são muito solúveis no ambiente aquoso do leite. No entanto, os grânulos da micela de caseína mantêm uma suspensão colóide no leite. Se a estrutura micelar se perde, as micelas se dissociam e a caseína fica insolúvel, formando um material gelatinoso conhecido como coalho (GONZÁLEZ, 2001).

É surpreendente constatar que as micelas resistem muito bem temperaturas superiores a 100°C e fortes tratamentos de homogeneização, mas elas podem desestabilizar em ligeiras variações da composição do soro (CHEFTEL, 1989). Entretanto, Anema (2008), em trabalhos que submeteu o leite a vários níveis de temperatura variando de 20-90 ° C por 15 min, em pH 6,5-6,9, observou que a κ -caseína dissocia-se das micelas de caseína em todas as temperaturas citadas acima, o nível no soro aumenta com o aumento da temperatura e o pH em aquecimento. Essa dissociação da κ -caseína a partir das micelas pode preceder a interação das proteínas do soro desnaturadas com κ -caseína, e que existe uma interação preferencial das proteínas do soro desnaturadas com fase sérica da κ -caseína. Segundo (FOX & BRODKORB, 2008) κ -caseína é facilmente hidrolisada

pela quimosina (~35 kDa), reagindo através da interação sulfidril dissulfeto com β -lactoglobulina (dimérica, ~36 kDa) em aquecimento do leite.

A temperatura (abaixo de 4°C) exerce influência considerável sobre a β -caseína, despolimerizando-a, devido à ruptura de numerosas interações hidrófobas, deixando-a mais sensível a hidrólises por proteases. Assim, como, a β -caseína, a κ -caseína se associa facilmente e as α -caseínas se associam muito fortemente, mas sem formar micelas. Durante o armazenamento do leite no frio (4 a 7°C), as micelas se dissociam parcialmente em submicelas e liberam até 50% das β -caseína em 24 horas (CHEFTEL, 1989; SGARGIERI, 1996), devido à distribuição desuniforme dos aminoácidos ao longo da sua cadeia (FARREL et al., 2004). Por aquecimento, ela volta a associar-se lentamente às micelas, mas não se sabe se irão para os lugares iniciais (SGARBIERI, 1996).

Com a elevação da temperatura, ocorre uma diminuição continuada da caseína solúvel constituída principalmente por β -caseína. A estabilidade da micela ao calor está muito ligada ao meio (pH, Ca^{++} ou outras proteínas). Assim, a estabilidade aumenta quando o conteúdo em κ -caseína se eleva ou diminui o fosfato de cálcio coloidal.

A caseína, normalmente, não é afetada pela pasteurização, permanecendo estável, entretanto, quando há acidificação do leite ocorre desestruturação das micelas de caseína, mesmo em temperatura ambiente, e formação de coágulo (FONSECA & SANTOS, 2000; ORDÓÑEZ et al., 2005).

Modificações do meio influenciam na estabilidade da caseína. Ajustando o pH (4,6 como média) das caseínas, aumentam as atrações eletrostáticas intra e interprotéicas, o que motiva a desestabilizar a fase mineral da micela. A caseína isoelétrica desmineralizada se mantém insolúvel. A eliminação do cálcio por citrato, fosfato ou EDTA, provoca a destruição da micela de caseína. Eliminando uma parte do cálcio ocorre perda da β -caseína e um aumento do tamanho da micela, podendo ser explicado pela ação dos íons de Ca^{++} exercendo um efeito de contração por formação de pontes iônicas (CHEFTEL, 1989).

As substâncias orgânicas, como etanol, podem desestabilizar as micelas, sob um pH inferior a 6,4 (CHEFTEL, 1989). Sgarbieri (1996) diz que a precipitação com etanol é obtida com concentrações menores com pH inferiores a 6,7. Entretanto, Fox & Brodtkorb, (2008) dizem que as micelas são, também, dispersas pela uréia, SDS (dodecilsulfato sódio), pH alto ou etanol (>35%, >70°C), indicando que ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas também estão envolvidos na integridade da micela.

Em trabalhos realizados por Horne & Davidason (1986) foi verificado variações na coagulação das micelas de caseína de leite bovino em presença de álcool, com diferenças na espessura das barreiras entre os raios micelares e o álcool livre. Essas variações foram obtidas através da alteração do pH, força iônica e nível de cálcio. Horne (1986) diz que a espessura dessas barreiras aumenta com o tamanho das micelas e a espessura correlaciona-se positivamente com a concentração de etanol necessária para induzir a agregação das micelas de caseína.

A ação das proteases coagulantes também exerce um papel importante na estabilização da caseína, dependendo muito da proporção de κ -caseína. O ataque específico nessa caseína por uma protease – quimosina (FOX & BRODKORB, 2008), pepsina, proteases de origem fúngica - conduz a uma desestabilização da micela (CHEFTEL, 1989; ORDÓÑEZ et al., 2005), promovendo associações hidrofóbicas intermicelares e formação de coágulo (SGARBIERI, 1996).

A hidrólise enzimática da caseína pela plasmina libera um peptídeo que é formado pela atividade desta na β -caseína (β -caseína f1-28). Esse peptídeo reduz a passagem de K pelos canais K^+ na membrana apical para o lúmen alveolar, reduzindo a síntese dos componentes osmóticos e a produção de leite (SILANIKOVE et al., 2006, 2009).

1.1.1.2. Soro-proteínas

Quando a caseína é removida do leite desnatado, o líquido remanescente recebe o nome de soro de leite. As proteínas do soro representam cerca de 20% das proteínas do leite e estão constituídas por proteínas globulares, tais como a β -lactoglobulina (9,5% do nitrogênio total do leite), α -lactoalbumina (3,5%), imunoglobulinas (2%), soroalbumina - BSA (1%) (Tabela 2) e, também, proteose-peptonas, lactoferrina, transferrina e enzimas (SGARBIERI, 1996; ORDÓÑEZ et al., 2005).

Como características das soro-proteínas, podemos citar sua estrutura globular que se caracteriza por dispersão molecular e estrutura terciária - pela presença de 5 resíduos de cisteína na β -lactoglobulina, formando duas pontes dissulfeto (ORDÓÑEZ et al., 2005), ao contrário das caseínas, que apresentam estrutura quaternária (micelar) (CHEFTEL, 1989).

Segundo CHEFTEL (1989) em comparação com as caseínas, a influência das proteínas do soro sobre as propriedades físico-químicas do leite é pequena, entretanto, possuem alto valor nutricional, devido ao alto teor de aminoácidos sulfurados - cisteína e metionina, boa composição de aminoácidos essenciais, elevada digestibilidade, além de inúmeras aplicações industriais, quando não desnaturadas, as proteínas do soro do leite são altamente solúveis – espumantes, emulsificantes, geleificantes (KINSELLA, 1984; WIT & KLARENBECK, 1984; SGARBIERI, 1996).

Segundo Ordóñez et al. (2005) a função biológica da α -lactoalbumina é perfeitamente conhecida, fazendo parte do sistema enzimático responsável pela síntese da lactose na glândula mamária (SGARBIERI, 1996). É sensível à relação existente entre a concentração dessa proteína e a da lactose no leite; ou seja, em leites muito ricos em α -lactoalbumina encontra-se sempre elevada proporção de lactose.

A soroalbumina bovina passa para o leite através do sistema vascular, possivelmente por vias similares às das imunoglobulinas do soro (SGARBIERI,

1996). Não se conhece exatamente sua função, mas assinalou-se que ela pode unir-se a ácidos graxos e estimular as atividades lipásicas (ORDÓÑEZ et al., 2005).

A lactoferrina (LF) é uma família de soroproteínas específicas de ligação de ferro que ocorre em leite. Além da origem mamária, alguns pesquisadores afirmam que também ocorre nas secreções de outras células epiteliais, bem como, em leucócitos polimorfonucleares – primeira linha de defesa na ocorrência de mastite (FARREL et al., 2004). Segundo este autor, sua concentração aumenta consideravelmente em resposta a inflamação ou infecção, como também, como afirma alguns pesquisadores, possui uma atividade antibacteriana causada pela habilidade de se ligar a membrana de bactérias gram negativas (FARREL et al., 2004) e atividade antiviral contra os dois vírus DNA e RNA (VAN DER STRATE et al., 2001).

1.1.1.2. 1. Estabilidade das soro-proteínas

Podem ser ordenadas da maior à menor estabilidade: α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, soroalbumina bovina, imunoglobulinas (ORDÓÑEZ et al., 2005)

As soroproteínas não são fosforiladas, o que diminui sua estabilidade térmica e solubilidade ao íon cálcio (CHEFTEL, 1989) Entretanto, a α -lactoalbumina é uma metaloproteína que liga um átomo de cálcio por molécula. Esse elemento confere-lhe certa estabilidade térmica, sendo, de fato, a soroproteína menos termolábil (ORDÓÑEZ et al., 2005).

Durante o tratamento térmico nas temperaturas superiores a 80°C, as proteínas do soro se desnaturalizam (TRONCO, 1997). Já Ordóñez et al. (2005) considera que as soroproteínas são relativamente termolábeis (acima de 65°C). O comportamento térmico das soro-proteínas é definido principalmente pelas propriedades da β -lactoglobulina, e, portanto, dependente do pH do meio, teores de lactose, cloreto de sódio, cálcio iônico, entre outros (CHEFTEL, 1989). Chen et al. (2005) verificaram perda de quase 90% e desnaturação da β -lactoglobulina (LG), mas não α -lactoalbumina (LA), em algumas marcas de leite processado e em pó.

Parte da perda foi atribuída à formação de grandes múltiplas formas de LG no produto processado em tratamento térmico acima de 80°C/15 seg.

Segundo Ordóñez et al. (2005) numa solução de β -lactoglobulina, as moléculas começam a soltar-se ao se atingir 65°C, com rompimento das suas ligações dissulfeto, entretanto, a presença de grupos SH livres permite a formação de novas ligações, isto é, formam-se polímeros de tamanho pequeno. No entanto, se for o leite que receber o tratamento térmico, a desnaturação ocorre da mesma forma, mas nesse caso, a β -lactoglobulina deposita-se sobre a micela, ancorando-se firmemente mediante ligações dissulfeto com os restos –SH livres da k-caseína. Entretanto, Chen et al. (2005) postulam que o tratamento térmico acima de 80 ° C em 15s pode induzir uma significativa desnaturação da LG do leite, com formações de estruturas desordenadas.

1.1.1.3. Desnaturação protéica

Neurath e colaboradores em 1944 definiram desnaturação como “qualquer alteração não proteolítica da estrutura específica de uma proteína nativa, originando alterações nas propriedades químicas, físicas ou biológicas da proteína”. E, Kausmann em 1959 definiu a desnaturação de proteínas como “um processo ou sequência de processos, em que os arranjos espaciais de uma cadeia polipeptídica, dentro das moléculas das proteínas são transformadas, em relação às proteínas nativas, para arranjos mais desordenados” (SGARBIERI, 1996).

Os agentes de desnaturação poderão ser classificados em físicos (calor, irradiação ultra-violeta, ultrassom, etc.) e químicos (cloreto de guanidina, uréia, brometo de lítio, solventes orgânicos, detergentes e extremos de pH) (SGARBIERI, 1996).

1.1.1.4. Eletroforese

As proteínas totais lácteas são, com frequência, determinadas por espectrofotometria por radiação infravermelha (FONSECA & SANTOS, 2000),

enquanto que, as frações protéicas podem ser determinadas por meio de eletroforese, em gel de poliacrilamida em presença de uréia e com ou sem mercaptoetanol (FARREL JR. et al., 2004), a qual consiste em obter informações adicionais sobre as diferentes frações protéicas. Segundo González & Silva (2006), a eletroforese é uma técnica que permite a separação dos diferentes tipos de proteínas em um suporte - normalmente acetato de celulose, gel de agarose ou para Sgarbieri (1996) em gel de poliacrilamida.

Segundo Sgarbieri (1996) a eletroforese em poliacrilamida poderá ser conduzida com a proteína em sua forma nativa (eletroforese simples) ou com a proteína desnaturada pela ação de dodecil sulfato de sódio (SDS). A eletroforese em poliacrilamida atua por dois princípios: por exclusão molecular, devido à porosidade característica do gel; por migração no campo elétrico devido à diferença na densidade de cargas de cada proteína. Segundo. González & Silva (2006) a migração deve ser em campo elétrico com baixa voltagem. Para Kamoun et al. (2006) o campo elétrico deve ser em torno de 110 volts de corrente contínua.

Em pH alcalino, a maioria das proteínas estão carregadas negativamente e, ao aplicar um campo elétrico, migram para o pólo positivo com diferentes velocidades, dependendo de suas propriedades físicas (GONZÁLEZ & SILVA, 2006), da densidade de cargas, do tamanho e da forma molecular (SGARBIERI, 1996), obtendo-se sua separação em frações.

Sgarbieri (1996) diz que ao se tomar várias proteínas de pesos moleculares conhecidos e submetê-las à eletroforese de poliacrilamida mediante tratamento com SDS, a mobilidade dessas proteínas no gel será inversamente proporcional aos pesos moleculares.

A determinação das frações protéicas por eletroforese pode ser realizada com leite total desnatado ou, ainda, realizar a purificação das proteínas, que segundo Kamoun et al. (2006), consiste na extração da proteína bem definida a partir de uma mistura complexa. Entretanto, é preciso saber qual a quantidade da proteína pesquisada em relação às outras proteínas e dispor de um método que permita dosar todas as proteínas do meio.

Kamoun et al. (2006) dizem que, em certos casos, é necessário eliminar da solução de proteína certos compostos de pequeno peso molecular, o que é facilmente obtido colocando a solução em um saco de diálise: membrana formada de substâncias altamente polimerizadas que constituem uma peneira molecular. Outras técnicas, também, são usadas para concentrar as soluções de proteínas, como: a *liofilização* que consiste em eliminar a água, fazendo-a passar diretamente do estado sólido para o gasoso ou, como no caso das proteínas lácteas, do estado líquido para o sólido.

Para revelação, o suporte é tratado com corantes específicos (negro de amido, azul de Coomassie ou azul de bromofenol) aparecendo as frações protéicas como bandas com intensidade de cor variável, podendo ser quantificadas por um densitômetro (GONZÁLEZ & SILVA, 2006). A revelação também pode ser feita por aplicação de sais de prata (KAMOUN et al., 2006). Os resultados se mostram no proteinograma ou imagem das distintas frações protéicas (Figura 2). A largura e altura de cada fração indicam a quantidade relativa de cada fração protéica. Combinando essa informação com a concentração de proteínas totais, é possível calcular os valores absolutos de cada fração protéica (GONZÁLEZ & SILVA, 2006).

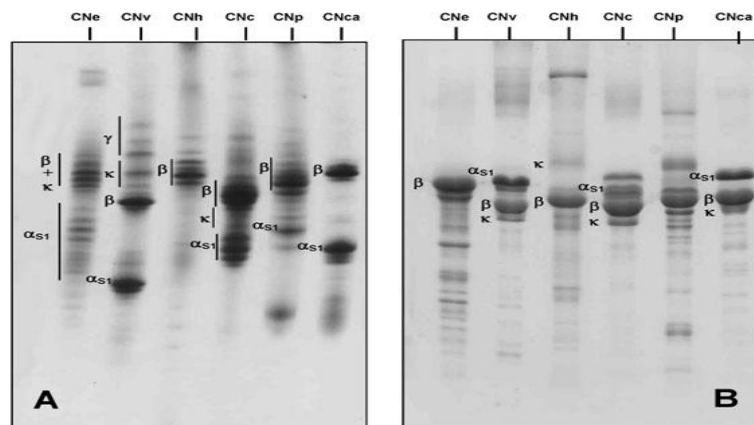


Figura 2. Comparação eletroforética das caseínas de alguns mamíferos poligástricos e monogástricos. Uréia-PAGE (A) e SDS-PAGE (B). Quando as bandas são conhecidas, o tipo de caseína é indicado ao lado (α_{s1} , β , κ e γ). CNe, caseína de égua; CNv, caseína de vaca; CNh, caseína humana; CNC, caseína de cabra; CNp, caseína de porca; CNca, caseína de camela.

Fonte: EGITO et al., 2006.

1.1.2. Lactose

A lactose é o único glicídeo livre que existe em quantidades importantes em todos os leites; e também o componente mais abundante, o mais simples e o mais constante em proporção. Quimicamente, é um dissacarídeo formado por uma molécula de glicose e outra de galactose, a partir do sangue duas moléculas de glicose passam para a glândula mamária e, nesta, ocorre a fosforilação e conversão a UDP-galactose de uma das moléculas (ORDÓÑEZ et al., 2005, THOMPSON et al., 2009). Costuma encontrar-se em proporções compreendidas entre 45 e 50g/litro (ORDÓÑEZ et al., 2005). O leite é a única fonte conhecida de lactose (THOMPSON et al., 2009).

Um componente é UDP-galactosil transferase que transfere galactose de UDP-galactose a algumas moléculas aceptoras na biosíntese de glicoproteínas e glicolípidos. A especificidade da transferase é controlada e modificada pela α -lactoalbumina (α -La), uma das principais proteínas do soro do leite, reduzindo a constante de Michaelis (K_M) para dobrar a passagem de glicose e, na sua presença, a maior parte da galactose é transferida à glicose, com a síntese de lactose. Há correlação positiva entre as concentrações de lactose e α -lactoalbumina no leite (THOMPSON et al., 2009).

Além da lactose, existem no leite outros carboidratos, como glicose e galactose livres. Outros carboidratos que podem ser encontrados são os nitrogenados (n-acetil glicosamina e N-acetil-galactosamina), os ácidos (ácido siálico) e os neutros (poliosídeos que contêm fucose). Todos eles aparecem em quantidades residuais (ORDÓÑEZ et al., 2005).

A redução na concentração da lactose em animais infectados subclínicamente, em que a integridade das junções firmes estão praticamente ou inteiramente mantidas, indicam que a redução está relacionada à redução na secreção da lactose pelas células da glândula mamária (LEITNER et al., 2007, LEITNER et al., 2011). O resíduo N- terminal 1-28 (da digestão da β -CN pela plasmina) bloqueia os canais de K^+ na membrana apical das células da glândula mamária (SILANIKOVE et al., 2000), afetando, assim, a secreção de lactose no leite

(Silanikove et al., 2000, 2009). Assim, a ativação do sistema plasmina irá resultar na redução da secreção de lactose.

1.1.3. Gordura

A gordura é um dos constituintes do leite que mais varia, de 1,5 a 7,0% (BEHMER,1984) podendo ser influenciada pela raça, época do ano, zona geográfica, manejo dos criadores de gado (ORDÓÑEZ et al., 2005), alimentação, condições físicas das vacas ao parto, do estágio e da duração do período de lactação, do número de ordenhas diárias e da idade dos animais a parição (GIANNONI & GIANNONI, 1987).

A gordura do leite é formada de glóbulos de diversos tamanhos, que se encontram em suspensão no líquido, dando-lhe aspecto emulsivo e opaco. Os triglicerídeos são os componentes majoritários, constituindo mais de 95% do total de lipídeos, sendo sempre acompanhados de pequenas quantidades de di e monoglicerídeos, de colesterol livre e seus ésteres, de ácidos graxos livres e fosfolipídeos, e ainda de glicolipídeos e de outros componentes minoritários como vitaminas lipossolúveis (ORDÓÑEZ et al., 2005).

No que se refere aos ácidos graxos, foram identificados mais de 150, dos quais os mais majoritários são: ácido mirístico (8 a 15%), palmítico (20 a 32%), estereárico (7 a 15%) e oléico(15 a 30%) (BEHMER, 1984; ORDÓÑEZ et al., 2005). Aproximadamente 25% dos ácidos graxos do leite são derivados da dieta e 50% do plasma sanguíneo. O resto é elaborado na glândula mamária a partir de precursores, principalmente de acetato

1.1.4. Sais e minerais

O leite possui sais dissolvidos (moléculas e íons) e em estado coloidal (LUQUET, 1991). Os compostos majoritários no leite são fosfatos, citratos, cloretos, sulfatos, carbonatos e bicarbonatos de sódio, potássio, cálcio e magnésio. Há outros

elementos em quantidades menores, como cobre, ferro, boro, manganês, zinco, iodo, etc (ORDÓÑEZ et al., 2005). O conteúdo total de sais é bastante constante: em torno de 0,7 a 0,8% do leite em peso úmido (BEHMER, 1984; ORDÓÑEZ et al., 2005).

O cálcio e fósforo são os elementos mais abundantes na fase coloidal no leite (ORDÓÑEZ et al., 2005) e são fundamentais na estrutura da micela de caseína, condicionando a sua estabilidade da fase coloidal. O magnésio é outro elemento muito importante, que interfere, como o cálcio, na estabilidade da micela de caseína, 1/3 dele faz parte da micela e o resto se encontra dissolvido no leite (LUQUET, 1991).

Entre todos os minerais, o iodo é aquele cuja concentração no leite mais se altera em função da alimentação (GIANNONI & GIANNONI, 1987). No caso do cálcio do leite, ele procede do plasma sanguíneo, que tem por sua vez origem nos alimentos e no esqueleto. Em geral, é difícil aumentar o conteúdo de cálcio do leite, através da dieta, uma vez que há um equilíbrio entre o cálcio sanguíneo e o cálcio do esqueleto (GONZÁLEZ et al, 2001).

1.2. Fatores que interferem na produção e composição do leite

Existe acentuada variação na produção e composição do leite entre raças bovinas, entre indivíduos dentro de raças e entre rebanhos. De forma didática podemos classificar os fatores que interferem na produção e composição do leite em: fisiológicos (genéticos: espécie, raça e indivíduo; não genéticos: idade, número de lactações, estágio de lactação e gestação) e ambientais (período seco, condições físicas da vaca, intervalo entre partos, intervalo entre ordenha, ordenha completa, estação do ano, temperatura, saúde do animal e alimentação).

1.2.1. Genéticos (espécie, raça e indivíduo)

Dentro de qualquer espécie, a composição de leite varia entre animais individuais e entre raças; no caso da gordura do leite bovino existe grande diferença

inter-raça (BEHMER, 1984) e, dentro de qualquer raça e entre indivíduos (THOMPSON et al., 2009). A porcentagem alta de gordura é uma característica genética das raças indianas e é provável que na medida em que a produtividade do zebu aumente, a sua taxa de gordura decline. Entretanto, a Jersey e a Guernsey são uma exceção dentro das raças européias (GIANNONI & GIANNONI, 1987). A Tabela 5 apresenta a composição do leite de vacas de diferentes raças especializadas.

Tabela 4. Composição (%) do leite de vacas de diferentes raças especializadas de regiões temperadas

CONSTITUINTES (%)	HOLANDESA	JERSEY	PARDO-SUIÇO
Proteína	3,29	3,98	3,64
Gordura	3,54	5,13	3,99
Cinzas	0,72	0,77	0,74
Lactose	4,68	4,83	4,94
EST (Extrato Seco Total)	12,23	14,71	13,31

Fonte: Adaptado de Behmer, 1984; Fonseca & Santos, 2000.

A lactose pode ser um fator limitante na produção de leite, visto que as quantidades de leite produzidas na glândula mamária dependem das possibilidades de síntese de lactose (ORDÓÑEZ et al., 2005). Há correlação positiva entre as concentrações de lactose e α -Lactoalbumina no leite (THOMPSON et al., 2009).

1.2.2. Não genéticos

1.2.2.1. Idade

A lactação de bovinos de origem européia, em clima temperado, acompanha uma curva de produção que se inicia com 70 a 75% da produção máxima atingida aos 6-7 anos de idade então ocorre declínio gradual. Quanto aos zebuínos a curva inicia mais baixa (menos quilos de leite), o ponto de máxima produção provavelmente é alcançado em idades menores (5 a 6 anos). Entretanto, em pesquisas brasileiras mostra que o máximo ocorre entre oito e dez anos, isto

porém, deve estar ligado à deficiência dos manejos: geral, reprodutivo e de alimentação que levam a vaca à primeira parição com quatro a cinco anos (GIANNONI & GIANNONI, 1987). Neiva (2000) diz que a produção de leite máxima é alcançada entre os 6 e 8 anos de idade, decrescendo após os 8 anos.

1.2.2.2. Número de lactações

A produção de leite vai aumentando da segunda a sétima cria; da sétima a décima, a produção mantém-se mais ou menos estacionária e em geral, da décima parição em diante, começa a diminuir a produção, ocasião em que se deve substituir o animal (BEHMER, 1984).

1.2.2.3. Gestação

A gestação reduz a produção de leite das vacas e esta diminuição aumenta com o seu avançar, atingindo o ponto máximo por volta do quinto mês, representando em média no oitavo mês decréscimo de 20% na produção de vacas gestantes em relação às vazias (GIANNONI & GIANNONI, 1987).

1.2.2.3. Período de lactação

As porcentagens de gordura e proteína no leite são altas imediatamente após o parto, decrescem até um mínimo aproximadamente aos 50 dias, e aumentam daí em diante até o final da lactação, enquanto a produção de leite decresce (TEIXEIRA et al., 2003).

As modificações são mais marcadas durante os primeiros dias após o parto, especialmente na fração de imunoglobulina e de alta produção de gordura e açúcar (principalmente oligossacarídeos). A composição do leite permanece relativamente constante durante o meio de lactação, mas as modificações ocorrem, consideravelmente, no terço final da lactação, refletindo na involução do tecido

glandular mamário e o menor fluxo de constituintes do sangue (THOMPSON et al., 2009).

Com relação às propriedades tecnológicas, no início da lactação, o leite tende a ter boa formação do coalho (White & Davies, 1958 apud LEITNER et al., 2011) que, em contrapartida, o leite de lactação tardia que é considerado menos adequado para fabricação de queijos, principalmente por causa dos defeitos de sinérese da coalhada (O'Keeffe, 1984 apud LEITNER et al., 2011).

1.2.3. Ambientais

1.2.3.1. Período seco e condições físicas da vaca

A condição física da vaca no momento do parto afeta a produção de leite, isto porque após a lactação anterior o animal deve regenerar os tecidos secretores da glândula mamária e acumular reservas para a próxima lactação durante o período seco. Os efeitos do período seco sobre a produção de leite são marcantes, uma vez que a quantidade de leite para a próxima lactação aumenta linearmente com 50 para 60 dias de período seco e decresce a partir desses dias de descanso. Logo, os períodos longos afetam a produção porque reduzem o número de dias de ordenha dentro do período de 305 dias de lactação, reduzindo o retorno financeiro (GIANNONI & GIANNONI, 1987).

1.2.3.2. Intervalo entre partos

É constituído pelo intervalo parto-monta/inseminação artificial e pelo período de gestação. A lactação é afetada pela parição precedente e pelo número de dias de gestação durante a produção corrente de leite. Em consequência, intervalos entre partos com durações variáveis podem afetar em até 10% a produção de leite (GIANNONI & GIANNONI, 1987).

1.2.3.3. Intervalo entre ordenha

Na maioria dos países é adotado um intervalo de 8 a 10 horas. O intervalo de 12 horas é considerado ótimo, quando se utilizam duas ordenhas diárias havendo um aumento de 2 a 3% na produção de leite (RIBEIRO et al., 2006).

1.2.3.5. Durante a ordenha

Segundo González et al. (2001) mesmo durante a ordenha, a composição do leite pode variar. A gordura do leite de vaca é um bom exemplo, sendo menor no leite do início da ordenha, aumentando gradualmente em percentagem quando o leite é retirado da glândula mamária. O último leite da glândula é o mais alto em conteúdo de gordura.

1.2.3.6. Estação do ano, temperatura e umidade do ar

Segundo Giannoni & Giannoni, (1987), pesquisas realizadas nos Estados Unidos e no Brasil, em gado leiteiro, indicaram que as vacas paridas no inverno apresentaram médias produtivas mais elevadas do que as que tiveram partos no verão. Entretanto, considera-se que o frio repentino, diminui a produção tanto em leite como em gordura. Com frio constante, porém, as vacas produzirão mais ou menos o normal se forem bem alimentadas; apenas o teor de gordura será um pouco reduzido (MOHALYI apud BEHMER, 1984).

Quando uma vaca em lactação é submetida a uma temperatura ambiente de 29 °C (estresse pelo calor), logo após encontrar-se sob condições de termoneutralidade ou conforto (18 °C), sua reação é adaptar-se fisiologicamente ao estresse agudo, desencadeando a reação de alarme com uma acentuada queda na produção de leite. Após poucos dias, a recuperação da produção de leite é limitada, havendo uma tendência para estabelecer-se um nível de aclimação, o qual está abaixo do potencial genético sob condições de termoneutralidade (LALONI et al., 2004).

As elevadas temperatura e umidade relativa do ar, assim como a intensidade de radiação solar, são fatores climáticos que causam estresse e que estão frequentemente associados com baixo desempenho do gado leiteiro (PINHEIRO et al. 2005). De modo geral, a zona termoneutra para vacas holandesas, em lactação, varia de 4 °C a 26 °C (HUBER, 1990) e quando excede a temperatura ambiente a produção de leite passa a ser muito prejudicada. Este limite varia entre raças e conforme Nääs (1998), a faixa de 13 a 18 °C é termicamente confortável para a maioria dos ruminantes, especificamente para as vacas em lactação, podendo essa faixa estender-se de 4 a 24 °C, restringindo-se aos limites de 7 a 21 °C em função da umidade relativa do ar e da radiação solar.

1.2.4. Saúde do rebanho

Assim como parasitas internos e externos, tristeza parasitária, febre do leite, brucelose, entre outras, a mastite, contribui decisivamente para reduzir a produção de leite e para estabelecer diferenças entre rebanhos. (GIANNONI & GIANNONI, 1987).

A mastite é a doença que mais acomete o rebanho leiteiro do mundo todo, em ambas formas de manifestação, clínica e subclínica (LEITNER et al., 2011). Com isso, traz grandes prejuízos para o produtor, como: diminuição da produção de leite, alterações na composição físico-química do leite, alta contagem de células somáticas.

No final da lactação, muitos animais possuem mastites crônicas ou subclínicas que não são percebidas pelos produtores, em virtude da falta do uso rotineiro do teste da caneca, Califórnia mastite teste (CMT) ou de técnicas laboratoriais avançadas (LEITNER et al., 2011).

E no caso da mastite subclínica, resultaria em deficiência na qualidade do leite destinado à produção de iogurte e queijo (LEITNER et al., 2011). Este tipo de mastite, normalmente está associado a um moderado aumento da contagem de células somáticas (FONSECA & SANTOS, 2000) que muitas vezes não é percebido no montante total no leite de tanque. Pois, ocorre diluição do leite de boa qualidade

com leite provido de glândulas infectadas subclínicamente, logo, a eficácia da CCS como avaliador da qualidade do leite fica prejudicada ao nível de leite de tanque, assim como o nível de lactose, % caseína (LEITNER et al., 2011).

Kelly et al., (2006) durante indução experimental de mastite com CCS alta, detectaram a presença de elastase no leite, em PMN (leucócitos polimorfonucleares que representam o primeiro tipo de célula produzida devido ao estresse e ocorrência de mastite) recuperado de leite. PMN (HEEGARD et al., 1994). Um inibidor desta enzima tem sido encontrado em leite e alguns peptídeos identificados no leite com alta CCS foram atribuídos à ação de elastases endógenas. Assim, parece provável que em certas circunstâncias, PMN secretam elastase, de modo que a enzima estaria presente, não só dentro dessas células no leite, mas também nas células livre do leite (KELLY et al., 2006).

1.2.8. Estresse

Alguns pesquisadores afirmam que a produção de leite depende, também, de fatores externos, tais como: estresse psicológico, estresse térmico, diminuição da água de consumo (SILANIKOVE et al., 2000).

Os PMN no leite (leucócitos polimorfonucleares que representam o primeiro tipo de célula produzida devido ao estresse e ocorrência de mastite e são conhecidos como uma importante fonte ativadora da atividade do plasminogênio (HEEGARD et al., 1994).

O estresse externo ativa eixo hipotálamo-hipófise-adrenal liberando cortisol no plasma sanguíneo, o qual induz a liberação do sistema ativador de Plasminogênio (PA) e aumenta a atividade da plasmina liberando peptídeos a partir da digestão da β -caseína (Silanikove et al., 2006, 2010). SILANIKOVE et al. (2000) denominam esses peptídeos de PPCB (PP, pelo fato de que ele é um proteose-peptona e fosfopeptídeo e CB, para sua atividade de bloqueio de canais de K^+). Esse peptído refere-se aos resíduos do N-terminal 1-28. A inibição dos canais de K^+ pelo PPCB desencadeia o processo, ainda desconhecido, que reduz a secreção de lactose e íons monovalentes dentro do lúmen da glândula levando à diminuição do

volume de leite. Outro peptídeo formado é a γ_1 -caseína (resíduos do C-terminal 29-209) (ANDREWS, 1978 apud SILANIKOVE et al. 2000).

1.2.9. Alimentação

Cada animal tem seu potencial de produção determinado pela genética, porém só atingirá esse potencial se for alimentado convenientemente. Com isso, se um animal for alimentado em demasia, não produzirá mais leite ou leite com maior teor de gordura que a sua capacidade permite, entretanto, uma alimentação deficiente vai logo refletir-se numa produção bem abaixo do nível normal (BEHMER, 1984).

Segundo Giannoni & Giannoni (1987) a subnutrição da vaca durante a lactação reduz a produção de leite e poderá elevar o seu teor de gordura. Por outro lado, animais que na época da parição apresentam boas condições físicas, produzem entre o primeiro e o segundo mês de lactação, maiores taxas de gordura do que as vacas que chegam magras ao parto. Para Mühlbach (2000) para melhorar o quadro de subnutrição em que se encontra boa parte do rebanho leiteiro brasileiro, é fundamental uma adequada disponibilidade de forrageiras para o ano todo, baseado nas necessidades e dinâmica do rebanho.

A quantidade de fibra na dieta a partir das forrageiras exerce influência na manutenção do ambiente ruminal e de proporções adequadas de ácidos graxos voláteis – AGV (acético, butírico e propiônico). A relação volumoso:concentrado mais utilizada e recomendada para rebanhos especializados é de 60:40, entretanto, dietas com baixo conteúdo de fibras (menos que 60% de volumoso) diminui o tempo de ruminação, o que acarreta menor produção de saliva e seus tamponantes, redução do pH ruminal (abaixo de 6,0) e da relação acetato/propionato (abaixo de 2,2) a níveis considerados propícios à queda no teor de gordura do leite (PERES, 2001).

Assim como a quantidade, a qualidade da fibra dos alimentos interfere no consumo e na produção e composição do leite dos animais. A concentração de parede celular (FDN) das forragens da dieta é um indicador químico do consumo e

eficiência na conversão de energia metabolizável em energia líquida no produto animal. Um elevado conteúdo de parede celular, além de limitação da digestibilidade da matéria seca, também reduz o consumo através de um efeito físico de “enchimento” do rúmen e diminuição da taxa de passagem da digesta pelo trato. Dietas para vacas leiteiras com 32% ou mais de FDN têm seu consumo limitado. As concentrações de FDN na dieta não devem baixar de 26 – 28%, pois abaixo desses níveis observam-se sérios problemas de diminuição de gordura no leite, acidose, laminite, flutuações crônicas no consumo e um baixo escore corporal das vacas, especialmente no início da lactação (VAN SOEST, 1994).

O tipo de alimentação fornecida às vacas em lactação pode elevar ou baixar a porcentagem de gordura do leite (GIANNONI & GIANNONI, 1987), podendo variar de 2 – 3 unidades percentuais e considera-se “normal” uma variação de cerca de 0,2 pontos percentuais (PERES, 2001). Enquadram-se no primeiro caso, elevação da gordura, rações ricas em gorduras e fibras, bicarbonato de sódio ou potássio, óxido e o carbonato de magnésio e hidróxido de cálcio e no segundo as compostas por altas quantidades de concentrados e as peletizadas ou, ácidos graxos insaturados (óleo de: fígado de bacalhau, soja, canola, milho, girassol e peixe) (GIANNONI & GIANNONI, 1987; PERES, 2001). Logo, tais dietas podem alterar a volatilidade dos ácidos gordurosos no rúmen, com influências no metabolismo da gordura na glândula mamária (STUMPF JR et al., 2000).

Com relação ao conteúdo da proteína é muito difícil alterar através da composição da alimentação (STUMPF JR et al., 2000). Rações deficientes em proteínas reduzem a produção de leite e o seu teor de sólidos não gordurosos, entretanto, o fornecimento de proteína acima das exigências dos animais não melhora a produção e promove apenas ligeiro acréscimo na porcentagem desta substância no leite (GIANNONI & GIANNONI, 1987). Para Peres (2001) pode se considerar uma variação “normal” de 0,1 pontos percentuais nos teores de proteína. No entanto, animais que receberam dieta com predominância de silagem de milho obtiveram um aumento no teor de proteína (0,09 e 0,2 pontos percentuais) comparado a base alimentar predominante de pastagem e feno, respectivamente (DIAS, 2006).

O teor de lactose do leite praticamente não é afetado por alterações das dietas alimentares oferecidas às vacas (GIANNONI & GIANNONI, 1987). Talvez, esse fato esteja associado à regulação da pressão osmótica na glândula mamária, de forma que maior produção de lactose determina maior produção de leite (PERES, 2001).

1.3. Leite Instável Não Ácido (LINA)

1.3.1. Conceito

O LINA caracteriza-se pela perda da estabilidade das caseínas do leite, resultando em precipitação positiva ao teste do álcool, sem apresentar acidez elevada – acima de 18ºD e podendo apresentar alterações nas suas propriedades físico-químicas.

1.3.2. Ocorrência do LINA

Atualmente, no Brasil, há uma alta ocorrência de leite instável o que pode acarretar problemas tanto para os produtores, com seus produtos descartados erroneamente; como para a indústria com perdas significativas no processamento. Das 2.396 amostras de leite analisadas na região noroeste do RS teve uma ocorrência de LINA de 55,2%, estatisticamente diferente ($P=0,0001$) das amostras negativas ao LINA (44,8%), que compreenderam 36,9% de amostras normais, 6,1% alcalinas e 1,8% ácidas (ZANELA et al., 2009). Marques et al. (2007), que avaliou a ocorrência do leite instável na bacia leiteira de Pelotas, RS analisou 9.892 amostras de leite, no período de abril de 2002 a setembro de 2003 apresentando uma ocorrência de LINA de 58%.

Na região nordeste do RS, Machado et al. (2010) encontraram uma incidência de 43% de amostras positivas ao teste do álcool considerando o que é preconizado pela IN 51 (concentrações de 72% v/v), as quais seriam descartadas já na UPL (Unidade de Produção Leiteira), enquanto que o índice aumentaria para

87% diante do que é exigido pelas indústrias de laticínios (concentrações de 78% v/v). Sendo que, todas as amostras demonstravam normalidade no tocante à acidez.

Na região de Casa Branca/SP, Lopes (2008) encontrou uma incidência de 64,77% de LINA e 35,23% de leite com presença de acidificação (acidez titulável em °D superior a 18) e Roma Junior et al. (2006) monitoraram mensalmente 250 UPL localizadas na região Sudeste, envolvendo os Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo e do total de 2.981 amostras analisadas houve uma porcentagem de incidência de 7,4% de proteína instável, mostrando efeito significativo da época com índices mais elevados no início do outono e final do inverno.

Diversos autores identificaram a ocorrência de variações sazonais na frequência do leite instável, contudo há variações de acordo com a região estudada. A maioria deles encontrou índices maiores durante o outono o que coincide com períodos de menor disponibilidade de alimentos; enquanto que os menores índices encontram-se durante a primavera (MARQUES et al., 2007; LOPES, 2008; MACHADO, 2010). Entretanto, Zanela et al. (2009) constataram que na região noroeste a incidência de LINA é maior nos meses de verão. A maioria dos produtores do Rio Grande do Sul não faz reserva de alimentos, volume e qualidade, principalmente nos meses de outono, os quais apresentam uma transição entre as pastagens de verão e inverno (BITENCOURT et al., 2000). Enquanto, na primavera ocorre maior disponibilidade de pastagens e condições de rebrote do campo nativo. Para MARQUES (2007) provavelmente, isso pode ter contribuído para menor ocorrência de LINA.

1.3.3. Características físico-químicas do LINA

Com relação à acidez, o LINA apresenta-se dentro dos padrões considerados normais pela IN51, pH entre 6,6-6,8 e acidez titulável entre 14-18°D. Para Fischer et al (2006a) o leite instável mostrou níveis mais altos de gordura na região de Panambi e em Pelotas, mas níveis mais baixos de lactose e menos sólidos totais do que o leite estável. Em experimentos de restrição alimentar, não houve

diferença nos componentes químicos do leite instável e estável (Zanela et al, 2006; Fruscalso, 2007; Abreu, 2008). No experimento com dieta aniônica, o leite instável mostrou valores mais baixos de gordura, lactose e sólidos totais e valores mais altos no teor de cálcio iônico (MARQUES et al., 2011). Para Machado (2010), Abreu (2008), Viero et al. (2010) e Fruscalso (2007) não encontraram diferenças significativas entre leite instável e leite normal quanto à variação da composição química do leite, discordando de Marques et al. (2007) e Zanela et. al. (2006a). A porcentagem de gordura não variou entre leite normal e LINA, entretanto os teores de proteína bruta, lactose, sólidos totais e sólidos desengordurados foram mais baixos no LINA (ZANELA et al., 2009). Enquanto, Lopes (2008) encontrou diferença apenas em uma época do ano com aumento da gordura, e um decréscimo da lactose e proteína bruta no leite instável. A autora diz que esses resultados podem estar associados à maior ingestão de volumosos ou por um desequilíbrio na concentração de concentrado:volumoso. O aumento de volumosos leva a um aumento na concentração de ácido acético que é o principal precursor da gordura do leite e decréscimo do ácido propiônico (precursor da produção de lactose do leite) (BARROS,2001).

Machado (2010) diz que o nível de concentrado na dieta pode afetar a concentração de uréia no leite, pois o grupo alimentado com menor proporção de concentrado apresentou maiores níveis desse componente, embora os três grupos apresentassem valores de uréia do leite dentro do valor normal (18 mg/dL).

1.3.4. Perfil sanguíneo do LINA

Segundo Fischer et al (2006b), as vacas com leite instável apresentaram valores de alguns metabólitos sanguíneos diferentes com relação àquelas vacas que produziam leite estável. No primeiro experimento, com valores mais altos de uréia e conteúdos mais baixos de fósforo; no segundo experimento, mostraram valores altos de uréia e de cálcio, mas valores mais baixos de magnésio e de cloro; e, no terceiro experimento, houve níveis mais altos de cálcio, mas níveis mais baixos de fósforo.

Para Machado (2010) houve diferença significativa no sangue para os níveis de fósforo (7,75 e 6,58 mg/dL; $P = 0,0345$), cálcio (6,02 e 5,56 mg/dL; $P = 0,0141$) e glicose (58,51 e 50,08 mg/dL; $P = 0,0187$) entre leite normal e LINA, respectivamente. Entretanto, González & Silva (2001) afirmam que os níveis de glicose no sangue se mantêm em homeostasia no organismo e que é necessário haver mudanças muito bruscas na dieta para que haja alterações radicais na mesma.

1.3.5. Influência da nutrição no LINA

O LINA vem sendo relacionado com situações de desequilíbrio nutricional ou mesmo subnutrição (MARQUES et al., 2010b; ZANELA et al., 2006a e b; Fruscalso, 2007), adição de sais aniônicos na dieta, mesmo com pleno atendimento das necessidades nutricionais dos animais (MARQUES et al., 2011). Em experimento com vacas que receberam altos níveis de energia e proteína o leite foi mais estável na prova do álcool (foi necessária maior concentração de álcool na solução alcoólica) que o leite produzido por baixo nível de proteína e alto nível de proteína (MARQUES et al., 2010b).

O aumento do aporte nutricional com atendimento de 100% das necessidades nutricionais dos animais proporcionou aumento da estabilidade do leite, assim, reduzindo a frequência de amostras com coagulação positiva no teste do álcool com concentrações alcoólicas até 76% v/v (ABREU, 2008).

Marques et al (2010a) mesmo com aumento do aporte nutricional para vacas da raça Holandesa em estágio muito avançado de lactação não diminui a ocorrência de LINA e não apresentou diferença significativa entre os tratamentos (controle e dieta ajustada).

CAPÍTULO 1

AVALIAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS, COMPOSIÇÃO E ESTABILIDADE DO LEITE DE VACAS EM LACTAÇÃO COM E SEM RESTRIÇÃO ALIMENTAR

INTRODUÇÃO

As empresas laticinistas buscam leite cru com elevada qualidade e estabilidade térmica adequada. No entanto, a baixa estabilidade térmica do leite, estimada pelo teste do álcool (BRASIL, 2002), é um problema grave e freqüentemente encontrado em vários estados do Brasil, como no Rio Grande do Sul (MARQUES et al., 2007; ZANELA et al., 2009; MACHADO, 2010), em São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro (DONATELE et al., 2001; ROMA JUNIOR et al., 2007; LOPES, 2008).

O teste do álcool pode estimar a estabilidade térmica para leite pasteurizado com uma concentração mínima de 72% v/v (BRASIL, 2002) e para o leite UHT a uma concentração mínima de 74% v/v (SHEW, 1981). Concentrações mais elevadas de etanol seriam contraproducentes, pois existe pequena correlação entre o teste do álcool e outras medidas de avaliação da estabilidade térmica como o tempo de coagulação a temperatura de 140-145°C (CHAVEZ ET AL., 2004, MOLINA ET AL., 2001). O Leite Instável Não Ácido (LINA) recebe outras denominações como: Síndrome de alteração do leite (Utrecht abnormality of Milk - Netherlands, 1930), Instabilidade alcalina no teste do álcool (BARROS, 2006), Síndrome do Leite Anormal (HERNÁNDEZ & PONCE, 2006), contudo, a principal alteração encontrada é a instabilidade da caseína do leite ao teste do álcool, entretanto, sem haver alterações na acidez do leite.

Nos últimos anos, pesquisadores brasileiros vêm estudando as causas do LINA, mas essas ainda não estão bem elucidadas. A instabilidade do leite é um complexo multifatorial, contudo, sabe-se que a alimentação exerce grande influência sobre o resultado do teste do álcool. Mudanças bruscas da dieta, variações com dietas ou pastos ricos em cálcio, com deficiências ou desequilíbrios minerais (Ca, P, Mg) (BARROS, 2001), deficiência de energia (PONCE & HERNADEZ, 2001;

MARQUES et al., 2010b) e subnutrição (ZANELA et al., 2006a; BARROS, 2006; FRUSCALSO, 2007; ABREU, 2008) tem sido sugeridas como possíveis causas de instabilidade. Em trabalhos experimentais se conseguiu induzir a instabilidade e reverter o quadro na maior parte dos animais estudados, com dietas de restrição alimentar e dietas equilibradas, respectivamente, logo, relacionando-o à nutrição animal (ZANELA ET AL., 2004, 2006a; FRUSCALSO, 2007). Já Hernandez e Ponce (2005, 2006) conseguiram induzir o quadro de SILA, em Cuba com dietas de restrição alimentar atendendo a 80% das necessidades nutricionais.

Além das condições de alimentação e aporte nutricional, parece haver grande variação individual entre os animais mesmo quanto a sua suscetibilidade à indução e reversão da instabilidade (ZANELA et al., 2006a). Esse fato pode estar associado a diferenças das frações protéicas do leite, como a proporção de kappa-caseína (ROBITAILLE ET AL., 2001) e ao polimorfismo genético (PATERSON et al, 1999; BOTARO ET AL., 2007; 2009). Caroli et al. (2009) dizem que os genes de proteínas do leite têm sido exaustivamente investigados em bovinos e que uma notável variação genética tem sido identificada e caracterizada. As variantes genéticas das proteínas do leite influenciam a composição e estabilidade do leite, com impacto no processamento de queijos (Chen et al., 2005).

A expressão dos genes polimórficos da β -lactoglobulina está relacionada com as características de composição e tecnológicas do leite (Oner & Elmaci, 2006) podendo alterar as características físico-químicas devido à mudança na estrutura primária (Hill et al., 1996 apud Botaro et al., 2007). Entretanto, Botaro et al. (2007) em amostras de leite de tanque não encontraram efeito do polimorfismo da β -lactoglobulina sobre a estabilidade do leite e sobre as características físico-químicas do leite.

Robitaille et al. (2001) verificaram resultados demonstrando que o polimorfismo genético na expressão do gene da κ -caseína pode afetar a estabilidade ao etanol. Os autores verificaram que o leite do grupo de vacas holandesas que apresentava maior quantidade do alelo B, necessitou de maior concentração de etanol para provocar a precipitação do que o grupo que apresentava a mesma quantidade dos alelos A e B. Barros et al. (2004) encontraram diferenças entre leite

instável e leite estável quanto aos teores de κ -caseína e β -lactoglobulina, as quais apresentaram valores menores no leite instável.

No entanto, Botaro et al. (2009) não encontraram associação entre a estabilidade do leite e os genótipos da κ -caseína. Da mesma forma, não foi encontrada diferença significativa nas frações protéicas entre leite estável e LINA em experimentos realizados por Lopes (2008).

O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil eletroforético das proteínas lácteas, composição e estabilidade do leite e parâmetros produtivos de vacas em lactação em duas condições de alimentação: com e sem restrição alimentar.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Seleção dos animais:

Os animais foram selecionados a partir do rebanho leiteiro do Sistema de Desenvolvimento e Pecuária Leiteira (SISPEL), da Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, na estação do outono e inverno (abril a agosto de 2008). Foram utilizadas seis vacas da raça Jersey. No início do trabalho, a média da produção diária de leite foi $16,4 \pm 3,2$ L, o estágio médio de lactação de $48,3 \pm 30,4$ dias, o peso vivo médio dos animais de $382,4 \pm 15,39$ kg e a condição corporal média de $2,6 \pm 0,33$. Foi realizado um período pré-experimental e 4 períodos experimentais.

2. Período pré-experimental:

Durante o período pré-experimental com duração de 15 dias, foram fornecidos duas vezes ao dia, a todos os animais, 6,44 kg de ração concentrada e 4 kg de feno de alfafa por animal por dia, além de sal mineral à vontade em cocho separado. A composição média do concentrado da dieta do período pré-experimental foi 54,3% de sorgo em grão; 17,7% de milho em grão; 26,4 % de farelo de soja e 1,6% de fosfato bicálcico. A composição química da dieta está descrita na Tabela 5. Após a ordenha da manhã, todos os animais eram mantidos em piquetes com pastagem de milheto (*Pennisetum americanum*) à vontade.

Tabela 5. Composição química dos ingredientes usados durante o período pré-experimental na dieta de vacas em lactação da raça Jersey

COMPONENTE (%)*	PERÍODO		
	PRÉ-EXPERIMENTAL		
	Pasto	Concentrado	Feno
Matéria seca (MS)	26,74	90,29	90,25
Cinza	8,20	6,55	7,21
Matéria orgânica	91,80	93,45	92,79
Fibra Detergente Neutro (FDN)	63,43	17,00	44,48
Fibra Detergente Ácido (FDA)	34,62	7,92	31,74
Fibra Bruta (FB)	28,73	6,62	26,34
Proteína Bruta (PB)	9,26	15,82	17,90
Nutrientes Digestíveis Totais	71,70	88,26	73,78

*Resultados das análises corrigidas à 100% da matéria seca

3. Período experimental:

O experimento contou com quatro períodos experimentais de 30 dias/cada e dois tipos de dietas: CONTROLE: atendendo 100% das necessidades nutricionais; RESTRIÇÃO: 60% da quantidade de feno e concentrado fornecida ao grupo controle. A dieta controle consistiu de 41,2% de sorgo em grão, 47% de casca de soja, 10,3% de farelo de soja e 1,5% de fosfato bicálcico (Tabela 6).

Foram fornecidos 6,44 kg de ração concentrada e 4 kg de feno de alfafa por animal por dia da dieta controle, fracionada em duas vezes, além de sal mineral à vontade em cocho separado. No cálculo da dieta restrição, forneceu-se 60% da quantidade de concentrado e feno oferecida pelas vacas no período pré-experimental. Durante o dia, todos os animais eram mantidos em piquetes com pastagem de milheto (*Pennisetum americanum*), azevém anual (*Lolium multiflorum*) e aveia preta (*Avena strigosa*) à vontade.

Tabela 6. Composição química dos ingredientes da dieta controle do período experimental fornecidas às vacas em lactação da raça Jersey

COMPONENTE (%)*	PERÍODO		
	EXPERIMENTAL		
	PASTO	CONCENTRADO	FENO
Matéria seca	30,91	94,12	92,19
Cinza	13,40	6,12	9,82
Matéria orgânica	86,60	93,88	90,18
Fibra Detergente Neutro	59,46	46,39	50,20
Fibra Detergente Ácido	34,03	28,45	31,91
Fibra Bruta	28,25	23,61	26,49
Proteína Bruta	17,11	16,81	21,50
Nutrientes Digestíveis Totais	69,28	72,62	71,47

*Resultados das análises corrigidas à 100% da matéria seca

Os animais foram separados em dois grupos de três animais, grupo 1 (vacas 1, 3, 5) e grupo 2 (vacas 2, 4, 6), conforme os dias de lactação e ordem de parto dos grupos. No primeiro período experimental os animais do grupo 1 receberam a dieta restrição e àqueles do grupo 2 foram mantidos com a dieta controle, no segundo período os tratamentos foram invertidos entre os dois grupos e assim sucessivamente (Tabela 7).

Tabela 7. Distribuição de dietas aos grupos de vacas durante a realização do experimento com vacas em lactação.

GRUPO	PERÍODO EXPERIMENTAL			
	1	2	3	4
1	R	C	R	C
2	C	R	C	R

4. Análises físico-químicas do leite

As amostras de leite foram coletadas no final dos períodos experimentais (nas datas 19/05; 18/06; 14/07 e 11/08), nas ordenhas da manhã e tarde. Essas amostras de cada ordenha foram misturadas compondo uma amostra composta por animal e por data de avaliação, as quais foram encaminhadas para o Laboratório de Qualidade de Leite da Embrapa, no qual foram quantificados os percentuais de gordura, lactose, proteína, sólidos totais determinadas por meio de espectrofotometria por radiação infravermelha no equipamento Bentley 2000®) e contagem de células somáticas (CCS) por contagem eletrônica por citometria de fluxo no equipamento Somacount 300® (FONSECA & SANTOS, 2000). Também, foram realizadas as análises físicas como: determinação da estabilidade do leite no teste do álcool, com concentrações de etanol na solução alcoólica de 68% até 80% v/v (ZANELA et al., 2006a), pH, acidez titulável (°Dornic) e teste da fervura (adaptado de BRASIL, 1981).

5. Análises eletroforéticas

Amostras de leite após as coletas (19/05; 18/06; 14/07 e 11/08) foram acondicionadas em gelo e mantidas em freezer à -20°C até o momento do uso. Na preparação das amostras o leite foi descongelado lentamente à 8°C e desnatado por centrifugação ($2100 \times g$ por 30 minutos à 32°C). Posteriormente, as amostras foram liofilizadas e acondicionadas em freezer à -20°C até o momento da realização da eletroforese (Adaptação de EGITO et al., 2002, 2006).

Para a avaliação do perfil eletroforético das proteínas utilizou-se um Cuba para eletroforese vertical, da Amersham pharma Biotech, modelo Hoefer SE 600 Standard Dual Cooled Vertical, por meio do método de SDS-PAGE (SDS – eletroforese em gel de poliacrilamida). A SDS-PAGE foi realizada mediante géis com concentração de 4,9% em 125mM de tampão Tris-HCl, pH 6,8 e com géis de separação com 15,4% de poliacrilamida em 380mM de tampão Tris-HCl, pH 8,8, contendo 0,1% de SDS. As amostras (2mg/ml) foram dissolvidas em tampão Tris-HCl, pH 6,8, na presença de 0,1% de SDS e 5% de β -mercaptoetanol. Em seguida foram aquecidas a 100°C por 3min, e volumes de 20 μl foram depositados nos géis (Adaptação de EGITO et al., 2002, 2006).

Após a corrida, as proteínas foram fixadas no gel com 12% de ácido tricloroacético (TCA) durante 30min e, em seguida, coradas com 0,1% de azul de Coomassie R250, dissolvido em uma mistura de 50% de etanol e 2% de TCA, durante 120min. A descoloração foi realizada durante uma noite com uma solução a 30% de etanol e 7,5% de ácido acético (EGITO et al., 2006).

As imagens dos géis foram scaneados e processados por análise (GelPro® 6.0 média Cibernex). Para quantificar a densidade óptica de cada fração protéica, o resultado da porcentagem de cada faixa de eletroforese foi calculado com base nas proteínas totais na coluna. Foi utilizado um marcador de peso molecular padrão (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) para identificar as frações de proteínas contendo miosina (200.0kDa), β -galactosidase (116.2 kDa), fosforilase b (97.4kDa), soro albumina bovina (66.2 kDa), ovalbumina (45.0kDa), anidrase carbônica (31.0 kDa), inibidor de tripsina (21.5 kDa), lisozima (14.5 kDa, e aprotinina (6.5 kDa). As bandas identificadas e quantificadas das proteínas do leite obtidas pela densitometria foram: lactoferrina (Lf); albumina sérica bovina (BSA); imunoglobulina sérica de cadeia pesada (IgM); frações de caseína: alfa_{s2} (aS2), alfa_{s1} (aS1), beta (b), kappa (k); proteínas solúveis: beta-lactoglobulina (LG) e alfa-lactoalbumina (LA).

6. Parâmetros produtivos

Os dados de produção leiteira, peso corporal, escore de condição corporal, foram coletados nas datas 19/05, 18/06, 14/07 e 11/08. A produção de leite, de cada vaca, foi medida por meio de medidores automáticos. Os animais foram pesados individualmente em balança específica e tiveram suas condições corporais avaliadas em escala de 1 a 5 (FERGUSON et al., 1994).

7. Análise estatística

O delineamento adotado foi o reversível com dois grupos, os efeitos testados foram grupo (n=2), tratamento (dietas: controle e restrição, n=2) e período (n=4). Os dados foram submetidos à análise de variância, a comparação de médias pelo DMS de Fischer ($\alpha=0,05$), através dos procedimentos GLM e Lsmeans do SAS

(2001) e a associação entre as variáveis pela correlação linear usando o coeficiente de Pearson pelo procedimento CORR. O modelo estatístico é representado simbolicamente por:

$$Y_{ijkl} = m + T_i + G_j + P_k + E_{ijkl}, \text{ onde:}$$

m = média geral, T_i = efeito da dieta, G_j = efeito do grupo de vacas, P_k = efeito de período e E_{ijkl} = erro experimental.

Posteriormente os dados foram agrupados conforme a estabilidade do leite: amostras de leite que coagularam em concentrações de etanol menores ou iguais a 72% foram consideradas instáveis e aquelas que coagularam em concentrações de etanol maiores que 72% foram consideradas estáveis. Os dados foram submetidos à análise da variância considerando o efeito de estabilidade (leite estável e leite instável; $n=2$).

A Contagem de Células Somáticas (CCS) sofreu transformação logarítmica antes da análise estatística.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os períodos e as dietas não alteraram a composição físico-química e estabilidade do leite (Tabela 8). Embora a restrição dos alimentos fornecidos no cocho (concentrado + feno) tenha sido de 40%, a manutenção das vacas na pastagem pode ter permitido uma compensação, com aumento da quantidade ingerida de pasto, embora o consumo de pasto não tenha sido avaliado. Infere-se isto pela redução de 14% da produção leiteira provocada pela restrição alimentar, e pela ausência de efeito da restrição alimentar sobre o peso corporal e o estado de condição corporal.

Tabela 8. Valores médios da composição físico-química e estabilidade do leite de vacas da raça Jersey submetidas à dieta controle e de restrição e valores de probabilidade do efeito do período experimental.

VARIÁVEL	DIETA		P>F	P>F
	controle	restrição	dieta	Período
PC ¹	74,85	73,20	0,2146	0,1007
pH	6,84	6,84	0,8615	0,0013
°D ²	15,85	14,87	0,1815	0,7196
% gordura	4,85	4,79	0,8710	0,3088
% proteína	3,41	3,33	0,3898	0,4029
%Lactose	4,23	4,25	0,7577	0,8591
% ST ³	13,59	13,44	0,7259	0,1748
CCSc ⁴	5,59	5,57	0,8305	0,9856
CCS (céls/mL) ⁵	1.418,75	1.152,83	-	-

Nota: ¹ Ponte de corte: Menor porcentagem de álcool (v/v) na mistura que provocou a coagulação do leite; ²acidez titulável em graus Dornic; ³sólidos totais; ⁴ Contagem de Células Somáticas corrigida por transformação logarítmica; ⁵ Contagem de Células Somáticas.

Experimentos que mostraram alteração da composição química do leite impuseram níveis de restrição mais severos, como os de Zanela et al. (2006c). O'Brien et al. (1999) encontraram diminuição significativa nos teores de proteínas, gordura, lactose e estabilidade do leite no teste com etanol com aumento da lotação animal acima do nível recomendado (reduzindo assim a oferta de forragem) durante as 28 semanas de lactação dos animais.

No presente trabalho a restrição alimentar não reduziu a estabilidade do leite no teste do álcool, provavelmente pela severidade moderada da restrição (Tabela 8). Todavia outros estudos (Zanela et al., 2006 a,b; Hernández & Ponce, 2006; Fruscalso et al., 2006) que restringiram mais severamente a alimentação ou impuseram maior desequilíbrio nutricional, verificaram redução da estabilidade do leite.

Os teores médios de proteína e gordura se apresentam dentro do esperado para a raça, enquanto o de lactose (Tabela 8) encontra-se abaixo do padrão para raça Jersey de 4,83% (FONSECA & SANTOS, 2000). Alguns pesquisadores dizem que a concentração de lactose é reduzida durante a mastite clínica e subclínica (LEITNER et al., 2011). Neste trabalho, os animais apresentavam mastite sub-clínica como é observado a partir dos elevados valores de CCS (Tabela 8), sugerindo que esta poderia ser a causa da redução do teor de lactose. Em caso de menor secreção da lactose pelas células da glândula mamária (LEITNER et al., 2007), devido à ação do resíduo N- terminal 1-28 (da digestão da β -CN pela plasmina) que bloqueia os canais de K⁺ na membrana apical da glândula mamária (SILANIKOVE et al., 2000), afetando, assim, a secreção de lactose no leite (SILANIKOVE et al., 2000, 2009). Assim, a ativação do sistema plasmina irá resultar na redução da secreção de lactose. Por sua vez, Leitner et al., (2011) dizem que existe correlação entre nível de lactose e firmeza da coalhada (CF), nas três espécies que estudou (bovina, ovina e caprina) a concentração de lactose $\leq 4\%$ foi associada com não coagulação do leite para produção de queijos.

Os períodos e a dieta de restrição não alteraram expressivamente as frações protéicas (Tabela 9), com exceção da κ -caseína, a qual aumentou a sua quantidade. Marques et al. (2011) forneceram dieta aniônica a vacas em lactação, a qual reduziu o peso, o escore de condição corporal, a estabilidade do leite e

aumentou o teor de κ -caseína. Por outro lado, O'Brien et al. (1999) verificaram que o aumento da lotação animal acima do nível recomendado (reduzindo, assim, a oferta de forragem) resultou em significativa diminuição da concentração de caseína total e das proteínas do soro. A alimentação pode influenciar a proporção das proteínas lácteas. Dias (2006) encontrou aumento das caseínas (α_{s1} , α_{s2} , β e κ) em vacas alimentadas com dieta com predominância de pastagem comparada aos grupos de animais alimentados predominantemente com silagem de milho ou feno.

Tabela 9: Valores percentuais das frações protéicas do leite de vacas da raça Jersey submetidas à dieta controle e de restrição e valores de probabilidade do efeito do período experimental.

VARIÁVEL	DIETA		P>F	P>F
	controle	Restrição	dieta	Per
α -CN ($s1 + s2$) ¹	34,65	35,93	0,4032	0,6717
β -CN ¹	27,51	27,86	0,8514	0,4695
κ -CN ¹	1,75	2,58	0,0371	0,2496
α -LA ²	3,44	3,32	0,8701	0,7909
β -LG ³	16,33	14,77	0,2411	0,4682
LF ⁴	0,64	0,97	0,6224	0,7534
BSA ⁵	0,84	0,97	0,3793	0,6775
IgM ⁶	1,08	1,16	0,5928	0,2047
Prot tot ⁷	87,94	87,90	0,9677	0,2678
Cas ⁸	64,70	65,03	0,8610	0,6852
Cas:prot ⁹	73,56	73,99	0,8030	0,7232

Nota: ¹caseínas; ² α -lactoalbumina; ³ β -lactoglobulina; ⁴lactoferrina; ⁵albumina sérica bovina; ⁶imunoglobulina (IgM); ⁷proteína total; ⁸caseína total; ⁹relação caseína:proteína total. **ns:** não existem diferenças significativas ($p > 0,05$).

Qualquer que seja a espécie, tanto β -caseína e α_{s1} (gen expresso CSN2 e CSN1S1, respectivamente) são caseínas importantes no leite bovino e representam 38% da fração de caseína integral. Por outro lado, α_{s2} e κ -caseínas (CSN1S2 e CSN3) são menos abundantes com uma percentagem que varia entre 9 e 13%. Discrepâncias nos valores das caseínas podem ser explicados por diversos fatores incluindo as condições de coleta, estágio de lactação, raças de animais, etc. (BEVILACQUA et al, 2006).

Quando se avaliaram as frações protéicas de acordo com a estabilidade do leite no teste do álcool 72% (v/v) foi detectada somente diferença significativa na fração β -CN, onde o leite instável apresentou maior valor percentual de β -CN (30,50%) comparado ao leite estável (26,92%) ($P=0,0493$), discordando de Lopes (2008). Não se tem explicação para esse resultado, na verdade a expectativa era que o leite instável apresentasse menor valor de β -caseína, já que essa caseína é especialmente sensível à ação da plasmina, e essa se encontra aumentada em situações de estresse como privação de água, injeção de corticosterona (SILANOKOVE et al., 2000) e estresse calórico (SILANIKOVE et al., 2009).

Em relação aos grupos de animais (Tabela 10) verifica-se aumento de β -caseína no grupo 1 que apresentava menor estabilidade do leite no teste do álcool, com precipitação em 72,35% v/v de álcool. Embora esse resultado seja coerente com o anterior, também não se tem uma explicação plausível e a expectativa era justamente o contrário, embora possa haver uma influência individual das vacas.

No aspecto tecnológico sabe-se que este tipo de caseína apresenta um enorme valor, pois é conhecida por afetar o rendimento, a textura e o sabor do queijo e tem sido estudada por vários pesquisadores através da Cromatografia líquida de alta performance - HPLC (JOLIVET et al., 2000). Segundo Farrell et al. (2004), a β -caseína é uma proteína que pode ser encontrada com valores até 45% da caseína do leite bovino e é uma das principais responsáveis pelo rendimento de queijos.

De acordo com a Tabela 10 verifica-se que o grupo 1 (com menor estabilidade do leite no teste do álcool) apresentou menores valores percentuais da κ -caseína em relação à proteína total do que o grupo 2. A κ -caseína costuma ser associada à estabilidade das micelas de caseína, pela sua posição mais externa nas micelas e seu papel na repulsão entre elas (SGARBIERI, 1996). Horne (1986) diz que a camada de superfície altamente hidratada que representa a estabilização das micelas de caseína (realizada pelas κ -caseínas), aumenta com o aumento do tamanho das micelas e que a concentração de etanol crítica necessária para induzir a agregação micelar aumenta com a espessura da camada. Dalglish et al. (1989) complementam dizendo que há uma relação entre o tamanho das micelas e o conteúdo de κ -caseína. Embora existam resultados discordantes sobre a associação

dos genótipos da κ -caseína e a estabilidade do leite, Robitaille (1995) sugeriu que o leite de genótipos de κ -caseína AA é mais estável no teste de etanol, enquanto, Paterson et al. (1999) encontraram maior estabilidade na κ -caseína de leite BB e o próprio Robitaille et al. (2001) verificaram que o leite do grupo de vacas holandesas que apresentava maior quantidade do alelo B (grupo HL), necessitou de maior concentração de etanol para proporcionar a precipitação do que o grupo que apresentava a mesma quantidade dos alelos A e B (grupo HH, chamado de grupo homozigoto). Entretanto, Botaro et al. (2009) não encontraram associação dos genótipos (AA, AB, BB) da κ -caseína com a estabilidade do leite em vacas das raças Holandês e Girolando ($P = 0.388$). A concentração média de etanol em que amostras de leite AA, AB e BB coagularam foram 79,16; 78,77 e 84 ° GL, respectivamente.

Tabela 10. Valores percentuais das frações protéicas e composição física e estabilidade do leite de acordo com o grupo de vacas da raça Jersey submetidas à dieta equilibrada e de restrição.

VARIÁVEL	GRUPO DE VACAS		P=F
	1 (vacas 1, 3, 5)	2 (vacas 2,4,6)	
α -CN (s1 + s2) ¹	35,50	35,08	0,6330
β -CN ¹	29,76	25,60	0,0377
κ -CN ¹	1,75	2,58	0,0371
α -LA ²	3,51	3,43	0,8869
β -LG ³	14,50	16,60	0,1214
LF ⁴	0,59	0,76	0,2851
BSA ⁵	0,84	0,96	0,4229
IgM ⁶	0,95	1,29	0,0260
CAS TOTAL ⁷	67,01	62,71	0,0315
PROT TOTAL ⁸	88,60	87,25	0,1868
CAS:PROT ⁹	75,64	71,91	0,0459
Ponto de Corte ¹⁰	72,35	75,71	0,0179
DORNIC	15,02	15,71	0,3444
pH	6,84	6,83	0,6510

Nota: ¹caseínas; ² α -lactoalbumina; ³ β -lactoglobulina; ⁴lactoferrina; ⁵albumina sérica bovina; ⁶imunoglobulina (IgM); ⁷relação caseína:proteína total; ⁸Proteína Total; ⁹caseína total; ¹⁰Ponte de corte: Menor porcentagem de álcool (v/v) na mistura que provocou a coagulação do leite no teste do álcool.

De acordo com a Tabela 10 houve aumento da caseína total e proporção de caseína no grupo 1, o que pode ser parcialmente devido à diferenças individuais dos

animais, pois Barros (2006) encontrou valores de caseína total significativamente menor no leite positivo ao teste de álcool ($73 \pm 5,8\%$) do que no negativo ($75 \pm 6,6\%$). No presente estudo, o aumento da caseína total, provavelmente tenha se dado por causa do aumento da β -caseína.

De acordo com os resultados individuais de cada animal (Apêndices A-F) verificamos que realmente as dietas e os períodos não alteraram as bandas e nas quantidades das frações protéicas, respectivamente, confirmando o que já foi mostrado na Tabela 9 quanto ao efeito do período, com exceção da κ -caseína. Horne & Parker (1981) dizem que existem diferenças individuais entre o leite dos animais com relação à estabilidade do mesmo no teste do álcool.

Os períodos e a restrição alimentar não alteraram expressivamente os atributos produtivos das vacas com exceção da produção de leite que apresentou menor valor médio durante a restrição, possivelmente pelo menor aporte de nutrientes (Tabela 11).

Tabela 11. Valores médios dos parâmetros produtivos de vacas da raça Jersey submetidas à dieta controle e de restrição.

VARIÁVEL	DIETA		P>F dieta	P>F Per ¹
	controle	restrição		
Peso ¹	386,78	383,36	0,5706	0,2901
ECC ²	2,35	2,46	0,1751	0,3973
DL ³	123,58	119,99	0,7867	0,0020
PL ⁴	14,13	12,17	0,0212	0,2588

Nota: ¹peso corporal; ²escore da condição corporal; ³Dias de lactação; ⁴Produção de Leite.

Com relação à produção de leite, Zanela et al. (2006a; 2006b) e Fruscalso et al. (2006) observaram redução média significativa na produção de leite dos animais durante a restrição alimentar em animais confinados e a pasto, respectivamente e, os mesmos autores não encontraram diferenças significativas nos teores dos componentes do leite. Contudo, Zanela et al. (2006a) observaram

menores teores de proteína, gordura, caseína e sólidos totais, enquanto Fruscalso et al. (2006) observaram o contrário em vacas com baixa oferta de pasto. MARQUES et al. (2010a) trabalhando com níveis altos e baixos de suplementação de vacas holandesas mantidas em campo nativo observaram alterações com aumento da produção de leite, do ganho de peso, do escore corporal, da gordura e dos sólidos totais nos animais que receberam nível alto de suplementação.

O'BRIEN et al. (1999) trabalharam com vacas holandesas divididas em três grupos: com restrição de pastagem; sem restrição de pastagem; sem restrição de pastagem + suplementação com concentrado e estes dois últimos com maior densidade animal do que o primeiro. Os autores verificaram que houve diminuição da produção de leite e do nível de plasminogênio, aumento da plasmina e do nível de PMN (leucócitos polimorfonucleares) à medida que aumento a densidade animal e a permanência dos animais no tratamento, ao longo das 28 semanas de lactação analisadas. Provavelmente, a restrição alimentar tenha causado algum tipo de estresse e este, pode ter ocasionado alterações no sistema plasminogênio-plasmina e PMN, com conseqüente diminuição da produção de leite, embora, essas variáveis não tenham sido avaliadas neste estudo. Pois, os PMN no leite (leucócitos polimorfonucleares que representam o primeiro tipo de célula produzida com estresse e ocorrência de mastite) e são conhecidos como uma importante fonte ativadora da atividade do plasminogênio (HEEGARD et al., 1994). O'BRIEN et al. (1999) dizem que a principal causa do aumento do conteúdo de plasmina foi a ativação do plasminogênio por células PMN, representado pela diminuição do conteúdo daquele no leite e POLITIS et al. (1989, 1990) dizem que isto está associado à redução da produção de leite.

Neste trabalho, as vacas foram mantidas em semi-confinamento, provavelmente houve compensação alimentar do grupo com dieta de restrição quando as mesmas foram soltas na pastagem, provavelmente impedindo a detecção de diferenças significativas na maioria das variáveis analisadas.

CONCLUSÃO

A redução moderada de alimento não alterou significativamente as frações protéicas, composição e estabilidade do leite e parâmetros produtivos das vacas em estudo, com exceção da produção de leite. Entretanto, houve diferenças na proporção de β -caseína entre leite estável e leite instável no teste do álcool. O grupo de vacas com menor estabilidade do leite apresentou menor proporção de β , mas maior de k-CN, caseína total e proporção de caseína. A perda da estabilidade da caseína no teste do álcool, provavelmente, está associada a essas variações.

CAPÍTULO 2

RELAÇÃO ENTRE O PERFIL ELETROFORÉTICO DAS PROTEÍNAS COM A COMPOSIÇÃO E ESTABILIDADE DO LEITE DE VACAS JERSEY CONSUMINDO DIETAS COM OU SEM ADITIVOS

INTRODUÇÃO

A composição e a estabilidade do leite são critérios de avaliação de qualidade exigidos pela Instrução Normativa 51 (IN 51), do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2002). Com relação à composição do leite são feitas análises em amostras coletadas mensalmente pelos transportadores nas Unidades de Produção Leiteira (UPL), por meio de equipamentos computadorizados em laboratórios credenciados pelo MAPA. Esses laboratórios emitem laudos técnicos às indústrias lácteas, que por sua vez, podem utilizar os resultados dos laudos como parâmetros para pagamento do leite por qualidade aos seus fornecedores. Barros (2001) diz que o monitoramento da composição do leite é um elemento importante na prevenção e diagnóstico de alterações que afetam a produção leiteira e rentabilidade econômica.

Para avaliação da qualidade do leite nas UPL a indústria, ao longo dos anos, vem realizando o teste do álcool como indicador da estabilidade térmica. A falta da estabilidade do leite é um problema que acomete os rebanhos leiteiros e sua ocorrência vem sendo monitorada nos últimos anos (DONATELE et al., 2001; MARQUES et al., 2007; ROMA JUNIOR et al., 2007; LOPES, 2008 e ZANELA et al., 2009). Alguns autores denominam o leite instável sem acidez excessiva como Leite Instável Não Ácido – LINA. O LINA caracteriza-se por perda da estabilidade da caseína ao teste do álcool, com presença de precipitação, sem apresentar elevação na acidez titulável em graus Dornic e podendo ocasionar alterações nas características físico-químicas do leite.

As causas da ocorrência do LINA ainda não estão elucidadas, contudo, observou-se que a qualidade e tipo de alimentação contribuem para a estabilidade

do leite, além de poder alterar outros atributos físico-químicos. Nos últimos anos muita atenção tem sido dada ao uso da manipulação do balanço ácido-básico e eletrolítico em dietas para vacas leiteiras, no sentido de reverter e/ou prevenir distúrbios metabólicos relacionados (SCHAFHÄUSER JR, 2006). Essas dietas podem proporcionar alterações nos componentes e estabilidade do leite (BARROS, 2001; PONCE & HERNÁNDEZ, 2005; MARQUES et al., 2011). HU & MURPHY (2004) verificaram efeitos positivos quando da administração de dietas catiônicas a vacas em lactação, observando aumentos na produção de leite e nos teores de gordura. MARQUES et al. (2011) trabalharam com dietas aniônicas e constataram acidose metabólica nas vacas, com alterações nas características físico-químicas do leite e precipitação do leite com menores concentrações de etanol, mas maiores valores de cálcio ionizável. Já, Chan et al. (2005) não encontraram diferenças na concentração ou produção de gordura e proteína do leite de vacas em lactação da raça holandesa.

Muitos pesquisadores verificaram diferenças na composição química entre leite estável e instável. Com relação à concentração a proteína bruta, Ponce & Hernandez (2001), Hernández e Ponce (2006) e Lopez (2008) verificaram menor concentração no leite instável, discordando de Barros (2001). Barros et al. (2006) verificaram que o valor de caseína total foi significativamente menor no leite instável no teste do álcool, o que concorda com os resultados de Hernández & Ponce (2006). E em particular, os valores das concentrações de κ -caseína e β -lactoglobulina foram menores no leite instável. Lopes (2008), mesmo não encontrando diferenças significativas nas frações protéicas entre leite estável e LINA, verificou que no mês de julho houve menor concentração média de κ -caseína e coincidiu com a maior incidência de LINA.

Devido à importância das micelas de caseína para muitas das propriedades físico-químicas do leite e produtos lácteos, a sua estrutura e propriedades e os efeitos da composição e respectivos fatores de transformação tem sido estudado extensivamente (FOX & BRODKORB, 2008).

O objetivo deste estudo foi verificar o perfil eletroforético das frações protéicas e as características físico-químicas e suas relações com a estabilidade do leite em vacas suplementadas com ou sem aditivos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Seleção dos animais

O experimento foi realizado na Embrapa Clima Temperado, Pelotas/RS, na estação do outono (abril a junho). Foram utilizadas 17 vacas da raça Jersey confinadas em instalações tipo free-stall, com média de 30 semanas em lactação (210 dias de lactação), produção média de 12 kg.dia⁻¹, 420 kg de peso vivo, CCS de 437.875 cél/mL e 878.235 cél./mL no primeiro e segundo experimento, respectivamente. As vacas foram divididas em três grupos: controle, com cinco animais; Bicarbonato, com seis vacas; Citrato, com seis vacas.

2. Período Experimental

Foram realizados um período pré experimental e dois períodos experimentais com duração de 15 dias. Nos períodos pré-experimental e experimental I, a dieta basal fornecida a cada vaca se constituiu de 5 kg de ração concentrada, 30 kg de silagem de sorgo e 1,5 kg de feno de alfafa por dia. O concentrado fornecido apresentava 38% de soja grão, 20% de milho grão, 38% de farelo de arroz integral, 2% de mistura mineral-vitamínica, 0,8% de calcário calcítico e 1,2% de NaCl. A composição estimada era: 13,4 kg de matéria seca, 1,56 kg de proteína (ou 11,4% da matéria seca oferecida), 8,3 kg de NDT (ou 60% da matéria seca), 0,05 kg de cálcio e 0,05 kg de fósforo.

No Período experimental II a dieta foi ajustada para atender as exigências nutricionais de vacas com 420 kg de peso vivo, produção média diária de 12 kg de leite com 6% de gordura, sem ganho de peso e com 33 semanas de lactação (NRC,

2001), a qual consistiu de 21 kg de silagem de sorgo, 3,4 kg de feno de alfafa e 5,5 kg de ração concentrada (62% de farelo de trigo, 7% de farelo de soja, 29% de milho grão moído e 2% de calcário calcítico), por animal e por dia. A composição estimada era: 1,99 kg de proteína (14,7%) e 8,3 kg de NDT (61%), 0,08 kg de cálcio e 0,05 kg de fósforo.

No tratamento controle, os animais receberam dieta sem aditivos; no Bicarbonato, receberam 40g de Bicarbonato de Sódio/animal/dia e no Citrato, receberam 100g de Citrato de Sódio/animal/dia. O fornecimento diário foi realizado por lote, após as ordenhas da manhã e da tarde; a mistura dos aditivos à ração concentrada foi feita diariamente, antes do fornecimento da manhã.

3. Análises eletroforéticas

As amostras de leite, após a coleta, foram acondicionadas em gelo e mantidas em freezer à -20°C até o momento do uso. Na preparação das amostras o leite foi descongelado lentamente a 8°C e desnatado por centrifugação ($2100 \times g$ por 30 minutos a 32°C). Posteriormente, as amostras foram liofilizadas e acondicionadas em freezer à -20°C até o momento da realização da eletroforese (EGITO et al., 2006).

Para a avaliação do perfil eletroforético das proteínas utilizou-se um Cuba para eletroforese vertical, da Amersham pharma Biotech, modelo Hoefer SE 600 Standard Dual Cooled Vertical, por meio do método de SDS-PAGE (SDS – eletroforese em gel de poliacrilamida). A SDS-PAGE foi realizada mediante géis com concentração de 4,9% em 125mM de tampão Tris-HCl, pH 6,8 e com géis de separação com 15,4% de poliacrilamida em 380mM de tampão Tris-HCl, pH 8,8, contendo 0,1% de SDS. As amostras (2mg/ml) foram dissolvidas em tampão Tris-HCl, pH 6,8, na presença de 0,1% de SDS e 5% de β -mercaptoetanol. Em seguida foram aquecidas a 100°C por 3min, e volumes de 20 μl foram depositados nos géis (Adaptação de EGITO et al., 2002, 2006).

Após a corrida, as proteínas foram fixadas no gel com 12% de ácido tricloroacético (TCA) durante 30min e, em seguida, coradas com 0,1% de azul de

Coomassie R250, dissolvido em uma mistura de 50% de etanol e 2% de TCA, durante 120min. A descoloração foi realizada durante uma noite com uma solução a 30% de etanol e 7,5% de ácido acético (Adaptação de EGITO et al., 2002, 2006).

As imagens dos géis foram scaneados e processados por análise (GelPro® 6.0 média Cibernex). Para quantificar a densidade óptica de cada fração protéica, os resultados da porcentagem de cada faixa de eletroforese foi calculado com base nas proteínas totais na coluna. Foi utilizado um marcador de peso molecular padrão para identificar as frações de proteínas. As bandas identificadas das proteínas do leite obtidas pela densitometria foram: lactoferrina (Lf); albumina sérica bovina (BSA); imunoglobulina sérica de cadeia pesada (IgM); frações de caseína: alfa_{s2} (aS2), alfa_{s1} (aS1), beta (b), kappa (k); proteínas solúveis: beta-lactoglobulina (LG) e alfa-lactoalbumina (LA).

4. Análises físicas do leite

As amostras de leite de cada vaca foram coletadas no início e fim de cada período, nas ordenhas da manhã e tarde. As análises foram: determinação da estabilidade do leite por meio do teste do álcool 68% a 80% v/v (ZANELA et al., 2006a), pH, acidez titulável (°Dornic) e teste da fervura (adaptado de BRASIL, 1981).

5. Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o completamente casualizado, com medidas repetidas no tempo, usando o PROC MIXED, método MVIQUEO. Matriz de co-variância não estruturada, considerando como efeitos fixos os tratamentos e períodos e como efeito aleatório os animais aninhados dentro dos tratamentos. Foi considerado até $P < 0,05$ como significativo. O modelo estatístico é representado simbolicamente por:

$$Y_{ijkl} = m + T_i + P_j + TP_{ij} + A(T)_{k(i)} + E_{ijkl}; \text{ onde:}$$

m = média geral do experimento, T_i é o efeito de tratamento ($n=3$: controle, adição de bicarbonato e adição de citrato), P_j é o efeito de período ($n=4$, pré-experimental, experimental I, intermediário e experimental II), TP_{ij} é o efeito da interação entre tratamentos e períodos, $A(T)_{k(i)}$ é o efeito da vaca aninhada dentro dos tratamentos e E_{ijkl} é o erro experimental.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tratamentos alteraram apenas a fração protéica κ -CN (Tabela 12) e tenderam alterar a β -CN. As vacas recebendo as dietas com os aditivos bicarbonato e citrato produziram leite com maiores concentrações de β -CN, mas menores concentrações de κ -CN. Não se tem uma explicação para o fato. A maioria das vacas estava com o leite instável no início do experimento e poderiam estar em acidose metabólica subclínica. Os aditivos adicionados, bicarbonato e citrato, poderiam servir para incrementar as cargas positivas e melhorar a estabilidade do leite, mas seu efeito sobre a síntese protéica é desconhecido.

O efeito de práticas de alimentação é mais conhecido, embora a maioria dos autores reconheça a dificuldade em se modificar a fração protéica do leite. Bomfim et al. (2006) observaram um aumento na fração de β -caseína no leite de cabras alimentadas com farelo de glúten como fonte protéica. Dias (2006) encontrou maiores valores dessas caseínas em vacas alimentadas com dieta com predominância de pastagem comparada aos grupos de animais alimentados predominantemente com silagem de milho ou feno. Entretanto, Marques et al. (2011) encontraram diferença somente na concentração de imunoglobulinas do leite em vacas que receberam dieta aniônica comparada àquelas que receberam dieta controle.

Este aumento da β -CN observado no experimento pode ser um fator positivo quanto ao aspecto tecnológico, visto que esta maior concentração pode proporcionar melhoria no rendimento dos derivados, no caso do queijo. Normalmente, entre todas as caseínas, esta se encontram em maior quantidade

acima de 45% (FARRELL et al., 2004), sendo uma das principais responsáveis no rendimento de queijos. Entretanto, como houve uma redução da κ -caseína, isto pode influenciar a consistência da coalhada durante a fabricação do queijo. Segundo Creamer et al. (1998), a estabilidade da micela de caseína depende da presença de κ -caseína na superfície de sua micela. Há afirmações dos efeitos da κ -CN na qualidade reológica do leite e que o leite com a variante CSN3-B da κ -caseína reage mais rapidamente com coalho e tem um tempo de coagulação significativamente menor do que o leite com variante CSN3-A, enquanto que o leite das vacas heterozigotas mostra um comportamento intermediário (Caroli et al, 2009). Pois, a κ -caseína participa de forma fundamental no processo de produção de queijo, sendo o substrato específico da quimosina, originando por hidrólise a para- κ -CN (aminoácidos 1-105) e o caseinomacropéptido solúveis (CMP: aminoácidos 106-171).

Tabela 12. Valores médios das frações protéicas do leite de vacas da raça Jersey suplementadas com aditivos quanto à dieta.

VARIÁVEL	TRATAMENTO			P>F
	CONTROLE	BICABORNATO	CITRATO	
α_s -CN (s1 +s2) ¹	39,65	36,88	31,61	0,7683
β -CN ¹	7,35 a	17,05 b	21,54 b	0,0159
κ -CN ¹	10,04a	1,63 b	1,59 b	0,0001
β -LG ²	12,15	13,12	10,54	0,0959
α -LA ³	3,62	3,65	2,86	0,3871
LF ⁴	1,72	1,22	0,84	0,0778
BSA ⁵	1,48	2,124	1,36	0,3464
IgM ⁶	1,95	1,17	1,60	0,4097
Prot tot ⁷	91,81	89,91	89,38	0,0616
cas ⁸	63,77	62,36	65,96	0,6056
Cas:prot ⁹	68,74	69,34	73,67	0,3571

Nota: ¹frações de caseínas; ² β -lactoglobulina; ³ α -lactoalbumina; ⁴lactoferrina; ⁵albumina sérica bovina; ⁶imunoglobulina (IgM); ⁷proteína total; ⁸caseína total; ⁹relação caseína:proteína total. Médias seguidas da mesma letra, nas linhas, não diferiram significativamente (DMS Fischer $\alpha = 0,05$).

Se, ambos os tratamentos, bicarbonato e citrato, tivessem proporcionado aumento das duas frações protéicas, β -caseína e κ -caseína, isto seria de enorme valor para a utilização dos aditivos bicarbonato e citrato nas dietas de vacas em

lactação para proporcionar aumento no rendimento e melhor formação do coalho na fabricação de queijo. No entanto experimentos visando verificar o rendimento dos derivados serão necessários para confirmar a influencia deste tipo de dieta no processo tecnológico, somado a saúde do animal, quanto ao aspecto de uma dieta rica em citrato de sódio e bicarbonato de sódio por longo período.

Os valores de α_s -caseína do leite instável, no período experimental 2, foram significativamente superiores aos do leite estável, 57,63 vs 44,18%, respectivamente (Tabela 13), embora não se tenha uma explicação pra esse fato. A α -caseína é uma mistura de duas proteínas, a α_{s1} -caseína e α_{s2} -caseína (Annan & Manson, 1969).

Tabela 13. Valores percentuais das frações protéicas no leite de vacas da raça Jersey sob dietas suplementadas com aditivos (bicarbonato e citrato) de acordo com a estabilidade do leite no teste do álcool 72% (v/v), experimento e interação estabilidade x experimento (ESTAB x EXP).

VARIÁVEL	ESTABILIDADE			PERÍODOS			ESTAB x PER ¹
	estável	instável	P>F	Exp1	Exp2	P>F	P>F
α -CN (s1+s2) ²	46,50	51,21	0,2856	46,80	50,91	0,2928	0,0447
β -CN ²	16,79	12,97	0,1442	16,34	13,42	0,1728	0,1112
κ -CN ²	3,27	3,77	0,8106	2,95	4,95	0,4242	0,6507
β -LG ³	13,52	11,89	0,2782	13,96	11,45	0,1044	0,1468
α -LA ⁴	3,15	3,70	0,4350	3,39	3,45	0,9276	0,7048
LF ⁵	0,92	1,47	0,1841	1,03	1,37	0,3745	0,9170
BSA ⁶	1,45	2,08	0,1928	1,30	2,23	0,0456	0,3498
IgM ⁷	1,36	1,83	0,4038	1,20	1,99	0,1548	0,6391
Prot total ⁸	90,24	90,48	0,7887	90,58	90,15	0,7737	0,7811
Cas ⁹	64,80	62,23	0,4140	64,51	62,52	0,4660	0,4576
Cas/prot ¹⁰	72,13	68,57	0,2136	71,49	69,21	0,3441	0,4412

Nota: ¹Interação Estabilidade x Período; ²caseína; ³ β -lactoglobulina; ⁴ α -lactoalbumina; ⁵lactoferrina; ⁶albumina sérica bovina; ⁷imunoglobulina (IgM); ⁸proteína total; ⁹caseína total; ¹⁰relação caseína:proteína total.

O modelo proposto por Horne (1998) para a α_{s1} -caseína consiste em uma curta seqüência hidrofóbica (1-23), seguida por uma volta hidrofílica (30-120), que contém fosfopeptídios, e uma região mais hidrofóbica (130-199). Uma combinação de estudos físicos, químicos e de modelagem molecular foi empregada para confirmar a possibilidade do fragmento 1-23 como um sítio inicial de associação (interações hidrofóbicas, interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio, ligações

dissulfeto e complexo coloidal de fosfato de cálcio - CCP) para a formação da micela de caseína (MALIN et al., 2001). Estudos de modelagem molecular subdividiu a seção C-terminal (136-199) em 3 possíveis regiões de interações proteína-proteína, uma centrada em Pro147 (Prolina 147), uma centrada em Pro168 (Prolina 168), e a terceira centralização em Pro185 (Prolina 185) (KUMOSINSKI et al., 1994 apud MARLIN et al., 2005). A α_{s1} -caseína tem sensibilidade à temperatura entre 10 e 70°C, no caso do fragmento N-terminal (f1-23) foi evidenciado menor sensibilidade às temperaturas altas e o fragmento C-terminal (136-196) uma moderada sensibilidade (MALIN et al. 2005). Os autores dizem que quando a temperatura é aumentada, a porção 1- 23 permanece estável e sugerem alterações na estrutura do peptídeo 136-196 referente às duas partes do C-terminal (Pro168 e Pro185, grande região que se contrai), permanecendo estável a região Pro147.

A montagem da micela de caseína dentro da glândula mamária ocorre em primeiro lugar no Retículo Endoplasmático com a interação proteína-proteína, levando agregados de proteína pré-formada ao Complexo de Golgi (FARREL et al, 1999 apud MALIN et al., 2005). Neste, ocorre a introdução de cálcio em complexos de proteína pré-formada pelas bombas mediadas por ATP, fornecendo novos sítios de interação para outras proteínas, assim inicia-se a formação da micela de caseína (MALIN et al. 2005). Como sugerido anteriormente, o N-terminal, f1-23, comporta-se como um provável sítio inicial de auto-associação de α_{s1} -caseína porque prontamente formam dímeros à baixa força iônica e tem uma estrutura secundária estável não susceptível de ser afetada por interações com outras caseínas das micelas (MALIN et al., 2001). No entanto, em temperatura e força iônica elevada a região Pro 147 pode formar reações de auto-associação estável. Se a força iônica inicial é baixa, não é provável que a F136-196 poderia fornecer uma nucleação local para os primeiros estágios de associação da α_{s1} -caseína, mas com maior grau de associação em força iônica aumentada, podendo efetivamente constituir um forte entrelaçamento das micelas de caseína. Além disso, teria um papel na estabilização da entrada de outras caseínas (por exemplo, β -, κ , e α_{s2} -caseínas) para a formação das micelas de caseína (MALIN et al. 2005).

No caso da α_{s2} -caseína é considerada a mais hidrofílica de todas as caseínas (Ordóñez et al, 2005) como resultado dos três agrupamentos de grupos

aniônicos (Swaisgood, 1993), e apresentando uma carga líquida de aproximadamente -21 no pH do leite (Farrell et al., 2004). Estes autores, dizem que a associação da sua estrutura é muito dependente da força iônica, parecendo ser mais forte em torno de uma força iônica de 0,2 M, com ocorrência de dissociação. O número de grupos aniônicos e a natureza hidrofílica se reflete nas propriedades de ligação do cálcio com a α_{s2} -caseína, onde esta proteína quase completa a sua precipitação em 2 mM Ca^{2+} (cálcio iônico) em pH 7, enquanto, a precipitação da α_{s1} -caseína requer 6mM Ca^{2+} (Aoki et al., 1985 apud Farrel et al., 2004). Outra característica marcante é que a α_{s2} -caseína parece ser facilmente suscetível à proteólise tal como avaliada pelas atividades de quimosina e plasmina com liberação de muitos tipos de peptídeos (Farrel et al., 2004).

Sugere-se que outros trabalhos devam ser realizados neste sentido, inclusive com análises mais detalhadas do perfil eletroforético das frações protéicas verificando se há ocorrência de novas bandas que podem corresponder com outros tipos de variantes genéticas oriundas de clivagem das principais proteínas encontrados em leite instável de vacas leiteiras. Inclusive, PARDO & NATALUCCI (2002) propuseram um novo método que se baseia na técnica de Tricina-SDS-PAGE (Técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida). Este novo método, a α_{s1} -, α_{s2} -, β -, κ -caseína e os peptídeos de baixo peso molecular (produtos de degradação da caseína com elevada mobilidade eletroforética) que não podem ser habitualmente detectados por outros sistemas eletroforéticos, são visualizados como bandas nítidas.

Diante do exposto, infere-se que o maior percentual de α s-caseína no leite instável, durante o período experimental 2, provavelmente, poderia ter influenciado a menor estabilidade do leite no teste do álcool. Pois, algum fator, ainda desconhecido, poderia estar desestabilizando a micela de caseína, com isso, proporcionando o contato da solução de álcool com a α_{s1} -caseína. O aumento da temperatura em função desta reação, provavelmente poderia estar alterando a estrutura do peptídeo 136-196 mais especificadamente às duas partes do C-terminal (Pro168 e Pro185), sensíveis à temperatura. Mas, de certa forma, requer mais estudos para o esclarecimento das possíveis causas, uma vez que, o Leite Instável (LINA) não estão com as mesmas ainda bem elucidadas.

Sabe-se que as quatro caseínas apresentam heterogeneidades decorrentes de diferenças no grau de fosforilação ou glicosilação, polimorfismo genético (FOX & BRODKORB, 2008), aptidão para associação (interações hidrofóbicas, interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio, ligações dissulfeto e complexo coloidal de fosfato de cálcio - CCP) e fixação de íons (CHEFTEL, 1989, SGARBIERI, 1996). As α_s -caseínas, assim como a β -caseína, representam 85% do total de caseína e precipitam na presença de cálcio iônico (Ca^{2+}), enquanto o restante dos 12-15% representada pela κ -caseína é solúvel na presença de Ca^{2+} . A κ -caseína, é que confere a estabilidade às caseínas sensíveis ao Ca^{2+} , podendo chegar até 10 vezes o seu peso através a formação de micelas (WAUGH & VON HIPPEL, 1956). A organização mais óbvia que permita isto é um núcleo de caseínas sensível ao cálcio iônico rodeado por uma camada de κ -caseína (FOX & BRODKORB, 2008).

Dentre muitas das propriedades tecnologicamente importantes do leite, por exemplo, a sua estabilidade ao calor ou etanol e de coagulação por coalho, são devido às propriedades das micelas de caseína. As micelas são desestabilizadas por uma série de outros fatores, alguns dos quais são industrialmente importantes como: acidificação; etanol (ou outro álcool); detergentes aniônicos, por exemplo, SDS e alta pressão. A κ -caseína é facilmente hidrolisadas pela quimosina e reage através da interação sulfidril dissulfeto com b-lactoglobulina em aquecimento do leite. Ambas as reações sugerir que a fração κ -caseína está exposta na superfície das micelas ou que as micelas são muito porosas, de modo que as grandes moléculas podem se difundir facilmente através delas (FOX & BRODKORB, 2008).

Entretanto no presente trabalho, a proporção de κ -caseína não diferiu entre o leite instável e o estável (Tabela 13), o que não é era o esperado, em função da relação positiva entre essa caseína e a estabilidade do leite, discordando com Barros et al. (2006) e Lopes (2008). Entretanto, Botaro et al. (2009) não encontraram associação dos genótipos (AA, AB, BB) da κ -caseína com a estabilidade do leite em vacas das raças Holandês e Girolando ($P = 0.388$).

Com relação às diferenças entre os períodos experimentais verifica-se que não houve influência sobre as frações protéicas (Tabela 13), com exceção da BSA, proteína do lactosoro. Marques et al. (2011) encontraram 2,52 e 2,42 % e Barros et al. (2002) 3,31% de BSA em amostras de leite de animais individuais, enquanto

Barros et al. (2001b) 3,3 % em amostras de leite de tanque. A soroalbumina bovina passa para o leite através do sistema vascular, possivelmente por vias similares às das imunoglobulinas do soro (SGARBIERI, 1996). Não se conhece exatamente sua função, mas assinalou-se que ela pode unir-se a ácidos graxos e estimular as atividades lipásicas (ORDÓÑEZ et al., 2005). Segundo Poutrel et al. (1982) as concentrações de albumina sérica bovina no leite aumentam no final da lactação (270 dias) e podem ser um critério de diagnóstico de infecções subclínica, pois os autores verificaram correlação positiva (0,53) da BSA com contagem de células somáticas, observando valores mais altos de BSA em animais que apresentavam CCS acima de 1.000.000 céls/mL. No presente estudo, os animais encontravam-se com média de 210 dias de lactação e com CCS de 446.688 cel/mL e 878.235 cél./mL no primeiro e segundo experimento e observou-se aumento significativo nos valores de BSA no segundo experimento comparado com o primeiro, estando em concordância com o descrito por Poutrel et al. (1982).

Farrell et al. (2004) afirmam que as caseínas α (α_{s1} , α_{s2}), β e κ constituem aproximadamente 50, 45 e 5% da fração de caseína no leite bovino, respectivamente. Neste trabalho, as porcentagens 69,87%; 23,37% e 6,76% das frações α_s ; β e κ -caseínas do total de caseína, respectivamente. Estes valores foram calculados a partir da média encontrada na Tabela 13 e constata-se que os valores da κ -caseína enquanto os da α -caseína e os β -caseína encontram-se, respectivamente, maiores e inferiores aos de outros estudos.

Diversos fatores podem influenciar para a ocorrência de discrepâncias nos valores das caseínas. Segundo Bevilacqua et al. (2006), aparentemente, o mensageiro RNA mensageiro (RNAm) das quatro caseínas não são traduzidos com a mesma eficiência. Uma comparação entre as eficiências específicas translacionais (% de proteína no leite / % do transcrito no tecido mamário), mostrou que as transcrições de α_{s1} e β -caseína são traduzidos 3 a 4 vezes mais eficientemente do que as transcrições de α_{s2} e κ -caseína, explicando a distribuição desequilibrada das caseínas (proporções aproximadas 4:1:4:1 para α_{s1} : α_{s2} : β : κ , respectivamente) relatadas para o leite de ruminantes. Mais estudos devem ser realizados para a verificação dos fatores que influenciam na discrepâncias dos valores das frações

protéicas, assim como o estudo de proteínas de baixo peso molecular e sua relação com a estabilidade do leite e o tipo de dieta fornecidas aos animais.

CONCLUSÃO

Os aditivos bicarbonato de sódio e citrato de sódio influenciaram apenas as frações protéicas β e κ -caseína. O leite instável no teste do álcool 72% v/v apresentou maiores quantidades da α_s -caseína do leite, no período experimental 2.

CAPÍTULO 3

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE INSTÁVEL NÃO ÁCIDO DE VACAS ALIMENTADAS COM DIETAS AJUSTADAS EM ENERGIA E PROTEÍNA

INTRODUÇÃO

Um dos entraves para que o país ascenda entre os grandes exportadores de leite é a qualidade do mesmo, em muitos casos, inadequada aos padrões exigidos pela Instrução Normativa 51 (BRASIL, 2002). Dentro desses padrões encontra-se a estabilidade do leite no teste do álcool como sendo a primeira avaliação qualitativa, realizada ainda na unidade de produção leiteira, a qual pode apresentar reações positivas (com precipitação do leite). Mas, nem todas, obrigatoriamente, são resultantes da acidez do leite, podendo tratar-se de Leite Instável Não Ácido (LINA).

O LINA caracteriza-se pela perda da estabilidade das caseínas, resultando em precipitação positiva ao teste do álcool, sem apresentar acidez elevada – acima de 18°D. Em 2004, Zanela et al. (2009) analisaram 2.396 amostras no noroeste do Rio Grande do Sul (RS) e verificaram uma ocorrência de LINA de 55,2% , enquanto Marques (2007), de 9.892 amostras avaliadas na região sul do RS, encontrou 58% de LINA. Além desses, outros autores relatam alterações na estabilidade do leite como: Barros et al. (1999), no Uruguai; Negri et al. (2002), na Argentina ; Ponce Ceballo & Hernández (2001), em Cuba.

Dentre as causas da instabilidade do leite citam-se as mudanças bruscas da dieta, pastos ricos em cálcio, deficiências ou desequilíbrios minerais - Ca, P, Mg, período de lactação, época do ano, teores altos de cálcio iônico no leite (BARROS, 2001); silagens com elevado teor de fibra e excesso de concentrados protéicos, com capacidade de alterar o equilíbrio cálcio-magnésio (VELLOSO, 1998); subnutrição (ZANELA et al., 2006a FRUSCALSO, 2006) e dietas desajustadas em energia e proteína (MARQUES et al., 2010b; PONCE & HERNANDEZ, 2005).

Diversos autores identificaram a ocorrência de variações sazonais na frequência do leite instável, contudo há variações de acordo com a região estudada. A maioria deles encontrou índices maiores durante o outono o que coincide com períodos de menor disponibilidade de alimentos; enquanto que os menores índices encontram-se durante a primavera (MARQUES et al., 2007; LOPES, 2008; MACHADO, 2010). Entretanto, Zanela et al. (2009) constataram que na região noroeste a incidência de LINA é maior nos meses de verão. A maioria dos produtores do Rio Grande do Sul não faz reserva de alimentos, volume e qualidade, principalmente nos meses de outono, os quais apresentam uma transição entre as pastagens de verão e inverno (BITENCOURT et al., 2000). Enquanto, na primavera ocorre maior disponibilidade de pastagens e condições de rebrote do campo nativo. Para MARQUES (2007) provavelmente, isso pode ter contribuído para menor ocorrência de LINA.

A redução dos níveis nutricionais com baixa oferta de pastagem (FRUSCALSO et al., 2007), a restrição alimentar (ZANELA et al., 2006a) em animais confinados, baixa suplementação em campo natural (MARQUES et al., 2010a); dieta desequilibrada em energia e proteína (MARQUES et al., 2010b), assim como, dieta equilibrada com adição de sais aniônicos (MARQUES et al., 2011) podem aumentar substancialmente os resultados positivos na prova do álcool.

Em experimentos de LINA com restrição alimentar, não houve nenhuma diferença nos componentes químicos do leite instável e estável (Zanela et al, 2006; Fruscalso, 2007; Abreu, 2008). Em dois outros experimentos, o leite instável mostrou níveis de lactose e proteína mais baixos e mais alto conteúdo de uréia do que leite estável (Marques et al., 2010ab). No experimento com dieta aniônica, o leite instável mostrou valores mais baixos de gordura, lactose e sólidos totais (MARQUES et al., 2011). Para Machado (2010), Abreu (2008), Viero et al. (2010) e Fruscalso (2007) não encontraram diferenças significativas entre leite instável e leite normal quanto à variação da composição do leite, discordando de Marques et al. (2007) e Zanela et. al. (2006a).

Com relação às frações protéicas foi verificado aumento das caseínas (α_{s1} , α_{s2} , β e κ) em vacas alimentadas com dieta com predominância de pastagem comparada aos grupos de animais alimentados predominantemente com silagem de

milho ou feno (DIAS, 2006). Lopes (2008) e Barros (2006) encontraram valores menores de κ -CN em leite instável, no entanto, Botaro et al. (2009) não encontraram associação dos genótipos (AA, AB, BB) da κ -caseína com a estabilidade do leite em vacas das raças Holandês e Girolando ($P = 0.388$).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade, características físico-químicas e as frações protéicas do leite de vacas submetidas a dietas ajustadas em energia e proteína.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Seleção dos animais

O experimento foi realizado no Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça – CAVG, em Pelotas/RS, no final do verão e início do outono (março a abril). Para distribuição dos animais nos tratamentos foi considerado a idade, raça, tempo de lactação, nível produtivo. Todos os animais apresentavam Leite Instável Não Ácido (LINA), para o diagnóstico do mesmo, o leite deveria apresentar instabilidade no teste álcool até 72% v/v, acidez titulável de 14-18°D, pH dentro da faixa normal (6,6 – 6,8) e negativo no teste da fervura.

Foi utilizado um rebanho misto, composto por 12 vacas em lactação, as quais apresentavam no início do experimento uma produção de leite média de $13,0 \pm 4,19$ L/vaca/dia e número médio de $99 \pm 53,15$ dias de lactação.

O monitoramento da mastite de cada animal foi realizado diariamente por meio do teste da caneca e quinzenalmente pelo *Califórnia Mastitis Test* - CMT para controle de mastite clínica e subclínica, respectivamente (TRONCO, 1997).

2. Alimentação

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três tratamentos: T1- controle, sem ajuste da dieta; T2- energia, com ajuste energético e T3- energia e proteína, ajuste energético/protéico segundo as exigências do NRC (2001), compatível com o potencial e o histórico produtivo do rebanho. Os animais de cada grupo receberam a mesma dieta durante os 30 dias de experimento. Durante o dia,

todos os animais permaneceram em piquete único de aproximadamente 10 ha, com pastagem mista de verão (contendo as principais espécies: 60% grama seda (*Cynodon dactylon*), 10% anonni (*Eragrostis plana*), 10% capim arroz (*Echinochloa cruzgalli*), 10% grama boiadeira (*Luziola peruviana* ou *Leersia*), 10% inços do tipo carqueja, caraguatá, maria mole, alecrim) e apresentavam aproximadamente 1000kg/ha de Matéria Seca de massa foliar durante o experimento, respectivamente.

A suplementação foi fornecida em cochos após as ordenhas da manhã e tarde, constando de alfafa e concentrado. A Tabela 14 mostra a quantidade dos alimentos (expressos como kg de matéria seca/animal/dia) utilizados na formulação da mesma.

A suplementação no tratamento controle era composta por 2 kg/dia/animal de ração comercial (Tabela 14). As suplementações dos tratamentos energia e energia/proteína foram feitas a fim de atender as necessidades energéticas e protéicas das vacas, considerando peso médio de 550kg, produção de leite 26 L/dia e 3,5% de gordura. O aporte das necessidades energéticas e protéicas das vacas de acordo com o NRC (2001), foi 68,27, 100 e 100% de energia líquida (Mcal/dia) e 50,79, 75,88 e 100% de proteína metabolizável (g/dia) para os tratamentos controle; energia e energia/proteína, respectivamente. Entretanto, o fornecimento da suplementação variou, aproximadamente, de 6 a 8 kg animal/dia em função da resposta efetiva em produção e visando minimizar os riscos de distúrbios metabólicos.

A coleta de amostras dos alimentos foi realizada, semanalmente, diretamente nos comedouros e as amostras de pastagem foram colhidas manualmente por meio de simulação de pastejo. Ao final do experimento, as amostras de cada alimento foram misturadas e formaram amostras compostas. Nessas amostras foram analisadas a matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e matéria mineral (MM) segundo metodologia descrita em Silva & Queiroz (2002); fibra em detergente neutro (FDN) (GOERING & VAN SOEST, 1970). Carboidratos não fibrosos (CNF), nutrientes digestíveis totais (NDT), cálcio (Ca) e fósforo (P) foram estimados com base no NRC (2001). Essas análises foram realizadas no Laboratório de Bromatologia e Nutrição Animal, da Embrapa Clima Temperado. A tabela 14 mostra a sua formulação e composição química.

Tabela 14. Quantidade dos alimentos (expressos como kg de matéria seca/animal/dia) utilizados na formulação dos suplementos e sua composição química.

ITEM	TRATAMENTO		
	Controle	Energia	Energia/ Proteína
Constituinte da dieta (kg/MS/animal/dia)			
Feno de Alfafa	.	.	2,00
Ração Comercial (Ração Bovinos 18% / Danby®) ¹	1,80	.	.
Milho grão moído	.	5,00	3,50
Farelo de Soja 45% PB	.	1,00	2,50
Farelo de trigo	.	2,00	1,60
Farelo de Arroz	.	2,30	1,60
Nucleus Maxximilk 95® ²	.	0,42	0,42
Fosfato Bicálcico	.	0,12	0,12
Calcário Calcítico	.	0,12	0,12
Sal comum	.	0,06	0,06
Composição química da dieta (%)³			
PB	10,0	11,5	16,2
NDT	58,0	66,0	65,0
FDN	55,8	39,0	38,1
FDNf	51,8	27,7	28,6
FDN/FDNf	0,92	0,71	0,75
CNF	25,9	39,5	35,9
Ca	0,6	1,2	1,3
P	0,2	0,8	0,8

Nota: ¹A composição da ração comercial (Ração Bovinos 18% / Danby®): Milho integral moído, sorgo integral moído, farelo de trigo, farelo de soja, calcário calcítico, cloreto de sódio, (sal comum), Premix, fosfato bicálcico; Umidade (Max.) 13%, Proteína Bruta (mín.) 18%, Mat. Mineral (Max.) 2%. ² Nucleus Maxximilk 95®: Cálcio (g): 220; Fósforo (g): 95; Vitamina A (UI): 120.000; Vitamina D3 (UI): 30.000; Vitamina E (mg): 750; Magnésio (g): 12; Enxofre (g): 12; Sódio: 60; Zinco (mg): 3.000; Cobre (mg): 680; Manganês (mg): 1.100; Ferro (mg): 170; Cobalto (mg): 20; Iodo (mg): 80; Selênio (mg): 20; Flúor (Máx.) mg: 950; Sol. do P em ác. Cítr. a 2% (mín.) %: 90. ³Composição química: proteína bruta (PB), nutrientes digestíveis totais (NDT), fibra em detergente neutro total e de forragem (FDN e FDNf), carboidratos não fibrosos (CNF), cálcio (Ca) e fósforo (P).

3. Análises físico-químicas do leite e avaliação de parâmetros produtivos

As amostras de leite foram coletadas duas vezes por semana, a cada 3-4 dias para análise de sua estabilidade no teste do álcool 68 a 80°GL (ZANELA et al., 2006a), pH, acidez titulável (°Dornic) e teste da fervura (adaptado de BRASIL, 1981). A composição química do leite (gordura, proteína, lactose e sólidos totais) foram determinadas por meio de espectrofotometria por radiação infravermelha no equipamento Bentley 2000® e a contagem de células somáticas por contagem eletrônica por citometria de fluxo no equipamento Somacount 300® (FONSECA & SANTOS, 2000), no Laboratório de Qualidade do Leite (Lableite), da Embrapa Clima Temperado – ETB, Pelotas/RS. A determinação de cálcio total no leite foi realizada em Laboratório de Análises Clínicas pelo método colorimétrico automatizado, em equipamento - modelo Dimension AR - Dade Behring®.

As amostras de leite para determinação do teor de cálcio iônico foram acondicionadas em frascos com tampa, exclusivo para esta análise (BARBOSA et al. 2009) e a medição foi realizada por potenciometria com eletrodo seletivo para cálcio, da marca Orion® (BARROS et al., 1999).

A produção de leite foi acompanhada diariamente e a condição corporal dos animais (escala de 1 a 5) (FERGUSON et al., 1994) foi avaliada no dia 0 e 30 do período experimental.

4. Análises eletroforéticas no leite

As amostras de leite, após a coleta, foram acondicionadas em gelo e mantidas em freezer à -20°C até o momento do uso. Na preparação das amostras o leite foi descongelado lentamente a 8°C e desnatado por centrifugação (2100 x g por 30 minutos a 32°C) , após realizou-se precipitação isoeletrica em pH 4,6, sendo o precipitado obtido pela centrifugação a 1500 x g por 20min, a 32°C, originando precipitado de caseína total e lactosoro. O precipitado foi lavado três vezes com água destilada contendo 0,05% (v/v) de tolueno, solubilizado ao pH 7,0 através da adição de 1M de NaOH. Esse ciclo de precipitação-lavagem-dissolução repetiu-se

duas vezes e o precipitado de caseína foi solubilizado a pH 7,0 com 1M de NaOH. No precipitado de caseína e no lactosoro foi realizado diálise com água deionizada, em presença de timol a 4°C, por 72h. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas e acondicionadas em freezer à -20°C até o momento da realização da eletroforese (Adaptação de EGITO et al., 2002, 2006).

Para a avaliação do perfil eletroforético das proteínas utilizaria uma Cuba para eletroforese vertical, da Amersham pharmacia Biotech, modelo Hoefer SE 600 Standard Dual Cooled Vertical, por meio do método de SDS-PAGE (SDS – eletroforese em gel de poliacrilamida). A SDS-PAGE seria realizada mediante géis com concentração de 4,9% em 125mM de tampão Tris-HCl, pH 6,8 e com géis de separação com 15,4% de poliacrilamida em 380mM de tampão Tris-HCl, pH 8,8, contendo 0,1% de SDS. As amostras (2mg/ml) seriam dissolvidas em tampão Tris-HCl, pH 6,8, na presença de 0,1% de SDS e 5% de β -mercaptoetanol. Em seguida seriam aquecidas a 100°C por 3min, e volumes de 20 μ l foram depositados nos géis (Adaptação de EGITO et al., 2002, 2006).

Após a corrida, as proteínas seriam fixadas no gel com 12% de ácido tricloroacético (TCA) durante 30min e, em seguida, coradas com 0,1% de azul de Coomassie R250, dissolvido em uma mistura de 50% de etanol e 2% de TCA, durante 120min. A descoloração seria realizada durante uma noite com uma solução a 30% de etanol e 7,5% de ácido acético.

Os dados referentes às frações protéicas não serão apresentados, em virtude de problemas técnicos de armazenagem das amostras.

5. Análises de minerais no sangue

As amostras de sangue dos animais foram coletadas na veia jugular, semanalmente, após a ordenha e antes do fornecimento do suplemento. As mesmas foram enviadas para laboratório de análises clínicas em até duas horas após a coleta para determinação de cálcio total pelo método colorimétrico automatizado, em equipamento - modelo Dimension AR - Dade Behring®.

6. Análise estatística

O delineamento adotado foi o completamente casualizado em parcelas subdivididas no tempo, onde cada animal representou uma repetição dentro de cada tratamento. Foram atribuídos a variável tratamento (três níveis) às parcelas e dia (nove níveis) às sub-parcelas, com quatro repetições cada. Para a variável cálcio iônico foram excluídos o dia 0 e 7 em função de valores discrepantes. A Contagem de Células Somáticas (CCS) sofreu transformação logarítmica antes da análise estatística. Porém, para melhor compreensão, os valores originais são apresentados na tabela 16. Os dados foram analisados com auxílio do programa Statistical Analysis System – SAS (2001) para realização da análise de variância, a comparação de médias pelo DMS de Fischer ($\alpha=0,05$) e a associação entre as variáveis pela correlação linear coeficiente de Pearson pelo procedimento CORR. O modelo estatístico é representado simbolicamente por:

$$Y = m + T_i + V(T)_{j(i)} + D_k + TD_{ik} + E_{ijkl}, \text{ onde :}$$

m = média geral do experimento

T_i = efeito do tratamento (GL=2);

$V(T)_{j(i)}$ = efeito da vaca dentro do tratamento (GL=9) ou erro tipo A

D_k = efeito do dia de análise (GL=8);

TD_{ik} = efeito da interação entre tratamento e dia de análise (GL=16);

E_{ijkl} = erro aleatório.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O leite dos animais que receberam a dieta controle apresentou menor estabilidade no teste do álcool do que o leite produzido pelos animais que receberam as dietas ajustadas, sem diferença entre essas últimas (Tabela 15). Embora o mecanismo pelo qual a restrição nutricional afete a estabilidade do leite no teste do álcool não esteja esclarecido, esses resultados estão em concordância com os de outros autores (Marques et al., 2010b; Zanela et al., 2006. Fruscalso, 2007).

Segundo Fruscalso et al. (2006) verificaram precipitação no teste do álcool 69º GL no leite das vacas com restrição alimentar comparada a precipitação no álcool 75,9º GL do grupo com ajuste de dieta. Em estudos sobre o LINA, Zanela et al. (2006a), constataram que a instabilidade ao álcool e o LINA apresentaram-se superiores quando os animais sofreram restrição alimentar comparados à dieta equilibrada. Constataram, ainda, uma relação etiológica entre o desequilíbrio nutricional e a ocorrência do quadro de LINA.

Em trabalhos realizados por Marques et al. (2010b) com animais da raça Jersey, encontraram 69,23; 70,81 e 74,97% na precipitação do leite na prova do álcool, respectivamente, para os tratamentos BB (baixo de energia e proteína), BA (baixa de energia e alta de proteína) e AA (alta de energia e proteína). Ponce Ceballo & Hernández (2001) citam que, nos quadros de síndrome do leite anormal (SILA), as limitações de energia disponível no tecido epitelial mamário afetam a síntese e secreção dos componentes lácteos, levando à instabilidade.

Tabela 15. Valores médios das características físico-químicas do leite em rebanho misto com dietas ajustadas: controle, sem ajuste; dieta energética; dieta energética e protéica, em Pelotas/RS.

VARIÁVEL	DIETA			P>F
	Controle	Energia	Energia /Proteína	
Álcool ¹	69,2 b	74,9 a	74,6 a	<0,0001
pH - leite	6,73 b	6,76 a	6,77 a	0,0120
Acidez titulável (°D)	16,64 b	18,32 a	17,82 a	<0,0001
Teste da Fervura	0	0	0	-
Gordura (%)	3,36 a	3,91 a	3,84 a	0,1986
Proteína (%)	2,99 b	3,27 a	3,41 a	<0,0001
Lactose (%)	4,57a	4,58 a	4,54 a	0,0770
Sólidos Totais (%)	11,90 b	13,08 a	12,52 a	0,0531

NOTA: Médias seguidas da mesma letra, nas linhas, não diferiram significativamente (DMS Fischer $\alpha = 0,05$). ¹Precipitação ao teste do álcool (68 a 80° GL).

Houve diferença entre os tratamentos para acidez titulável e pH (Tabela 15), entretanto, os valores encontram-se de acordo com os exigidos pela IN51, com exceção do tratamento controle, que se caracteriza como LINA, estando em concordância com Fruscalso et al. (2006), Marques et. al (2010b). Os resultados do trabalho indicam que as dietas ajustadas atenderam as necessidades nutricionais dos animais, que produziram leite mais estável. Comprovando que a efetividade da suplementação protéica está associada ao suprimento da demanda energética do animal. Caso contrário, a proteína da dieta acaba sendo usada como fonte energética pelo animal, visto que esta é maior e prioritária para o organismo.

Não foi verificada precipitação no teste da fervura (Tabela 15), mesmo nos casos de LINA, mostrando que não houve influência na estabilidade térmica, ratificado por Molina et al. (2001), Negri (2002), Chávez et al. (2004), Fruscalso (2007), Abreu (2008) e Machado (2010) que encontraram moderada ou nenhuma correlação entre os testes do álcool e outros testes de estabilidade térmica como o da fervura e do teste do tempo de coagulação.

O ajuste nutricional das dietas modificou teor de proteína, mas não alterou os teores de lactose e gordura do leite (Tabela 15). A modificação da composição do leite devido à manipulação do aporte nutricional está relacionada à magnitude de

dois processos parcialmente antagônicos: aumento da produção de leite, que às vezes dilui os teores dos componentes lácteos e o aumento diferencial da síntese dos próprios componentes, modulado pelo estágio lactacional e pelo efeito deletério da deficiência nutricional sobre a apoptose (CAPUCO et al., 2001). Marques et al. (2010b) verificaram que o ajuste em energia promoveu o aumento do teor de lactose, enquanto Zanela et al. (2006a) e Fruscalso (2007) não constataram alteração dos componentes lácteos de vacas recebendo dietas ajustadas ou não.

Deficiência de energia e proteína na dieta pode diminuir o teor de proteína do leite em até 0,1 a 0,3 pontos percentuais (CHASE & OVERTON, 2006). No presente trabalho verificou-se uma redução de até 0,42 pontos percentuais, ratificado por Hernández & Ponce (2005), que em experimento com vacas da raça holandesa com restrição de 50 e 80% da dieta controle, encontraram redução em torno de 0,26 pontos percentuais do teor de proteína. Em virtude disso, os autores dizem que há comprometimento no teor de sólidos totais, assim como, a produção de leite. Os resultados indicam que a dieta é um fator importantíssimo como subsídio para que se possa explorar todo potencial genético dos animais, devendo, a mesma, apresentar todos os constituintes de forma equilibrada.

Quanto à CCS, no presente trabalho não houve diferença entre tratamentos (Tabela 16). A média da CCS foi de 261.000 céls/mL e constatou-se relação negativa da CCS com o teor de lactose ($R^2 = -0,38$, $P = 0,0227$), possivelmente, relacionada à menor síntese de lactose, uso da mesma pelos microrganismos e passagem para o sangue devido à maior permeabilidade das membranas alveolares e passagem paracelular. Schäellibaum (2000) diz que há uma relação inversamente proporcional entre CCS e gordura, lactose e proteína (caseína).

Tabela 16. Valores médios das características químicas e Contagem de Células Somáticas (CCS) do leite em rebanho misto com dietas ajustadas: controle, sem ajuste; dieta energética; dieta energética e protéica, em Pelotas/RS.

VARIÁVEL	DIETA			P>F
	Controle	Energia	Energia /Proteína	
CCS (x 1.000 céls./ mL)	376 a	184 a	224 a	0,3166

NOTA: Médias seguidas da mesma letra, nas linhas, não diferiram significativamente (DMS Fischer $\alpha = 0,05$). ¹Contagem de Células Somáticas corrigida.

O teor de cálcio iônico do leite foi menor na dieta ajustada em energia em relação às demais (Tabela 17) e correlacionou-se negativamente com a concentração de etanol do teste do álcool necessária para coagular o leite ($r = -0,49$, $P = 0,0025$, $n = 36$), confirmando os resultados de Horne & Muir (1990), Lin et al. (2006).

O tipo de dieta alterou a concentração de cálcio total no sangue e no leite. O cálcio do leite, ele procede do plasma sanguíneo, que tem por sua vez origem nos alimentos e no esqueleto. O cálcio se encontra física ou quimicamente combinados com caseinatos, citrato ou fosfato, assim o leite tem um mecanismo que lhe permite acumular uma concentração elevada de cálcio ao tempo em que mantém o equilíbrio osmótico com o sangue. Em virtude disso, em geral é difícil aumentar o conteúdo de cálcio do leite, através da dieta (GONZÁLEZ et al., 2001).

Tabela 17. Valores médios do cálcio iônico no leite, cálcio total no sangue e no leite em rebanho misto com dietas ajustadas: controle, sem ajuste; dieta energética; dieta energética e protéica, em Pelotas/RS.

VARIÁVEL	DIETA			P>F
	Controle	Energia	Energia /Proteína	
Cálcio iônico - leite	0,0927 a	0,0737 b	0,0931 a	0,0032
Ca total – sangue (mg/dL) ⁴	9,38 a	9,07 b	9,36 a	0,0335
Ca total – leite (mg/dL) ⁵	112,57 a	121,82 a	115,63 b	0,0059

NOTA: Médias seguidas da mesma letra, nas linhas, não diferiram significativamente (DMS Fischer $\alpha = 0,05$). ¹Cálcio total no sangue; ²Cálcio total no leite.

A produção de leite diferiu significativamente entre as dietas. A dieta controle promoveu uma menor produção leiteira (11,35 L/dia) comparado as dietas energia (14,07 L/dia) e energia e proteína (14,76 L/dia), provavelmente, pelo menor aporte de nutrientes ofertado aos animais, concordando com Zanela et al. (2006a), Fruscalso (2007) e Hernández & Ponce (2005), em trabalhos, onde o objeto de estudo foi a restrição alimentar e Marques et al. (2010a e b). As dietas ajustadas não proporcionaram grande aumento da produção de leite, provavelmente, em virtude de que muitos animais estavam no final do primeiro período e no segundo período de lactação (100 a 200 dias de lactação) em que a produção de leite começa a diminuir lentamente após o pico de produção em torno de 45 dias de lactação (STUMPF JR. et al., 2000). Os autores complementam dizendo que geralmente após os primeiros 100 dias de lactação, a ingestão de matéria seca é suficiente para alcançar as necessidades nutricionais das vacas, os animais ganham peso recuperando suas reservas corporais, enquanto que a produção de leite começa a diminuir lentamente.

A variação dos escores de condição corporal (ECC), durante o período experimental, seguiu a tendência esperada em função das dietas oferecidas e dentro dos níveis referenciados pela literatura. Segundo Fergusson et al. (1994), a condição corporal (CC) deve oscilar entre 2,5 e 3,0 pontos na metade da lactação da vaca leiteira. No presente estudo, verificou-se que as dietas ajustadas não foram suficientes para proporcionar um efeito significativo na condição corporal dos animais, provavelmente, em virtude do curto período experimental para este tipo de resposta e a partição dos nutrientes ocorrer de forma prioritária para as necessidades básicas do animal.

CONCLUSÃO

As dietas ajustadas foram suficientes para reverter o quadro de LINA, assim como, causar influência na produção do leite, proteína, sólidos totais e teor de cálcio no leite e sangue.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O teste do álcool não diferencia o leite instável não ácido (LINA) do leite ácido por ação de bactérias. Então, pesquisadores, instituições de ensino e órgãos governamentais competentes deveriam se unir na criação de um aparelho ou equipamento aferidor da qualidade do leite que substitua o teste do álcool, mas que seja prático, rápido e baixo custo. A fim de se ter maior confiabilidade nos resultados verificados a campo, diferenciação do leite normal e instável, melhor qualidade do produto final, aproveitamento do Leite Instável Não Ácido pelas indústrias e diminuição dos prejuízos do produtor por diagnóstico de resultados errôneos no campo.

A alimentação inadequada é um dos fatores causadores da ocorrência do Leite Instável e é claro que merece muita atenção devido à grande importância que exerce sobre o potencial produtivo dos animais. Entretanto, não se deve deixar de considerar o fator individual de cada animal, uma vez que cada indivíduo é único e cada um responde de forma diferente às variações que lhe é imposta. Sugere-se que devem ser realizados trabalhos que verifiquem a influência genética na ocorrência do LINA a fim de contribuir para sucesso de toda a cadeia produtiva do leite.

Outro fator que merece destaque é o estudo das frações protéicas e de peptídeos de baixo peso molecular que podem ser interessantes para determinar as diferenças entre o leite estável e instável no teste do álcool. Assim como, a utilização de outros métodos e técnicas da área de Biologia Molecular como: Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), fornecendo resultados comparáveis à eletroforese e sequenciamento de aminoácidos de proteínas (verificação da estrutura primária).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A. S. **Leite instável não ácido e propriedades físico-químicas do leite de vacas Jersey**. 2008. 108 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ANEMA, S. G. On heating milk, the dissociation of kappa-casein from the casein micelles can precede interactions with the denatured whey proteins. **Journal of Dairy Research**. Vol. 75, n.4, p. 415-21, 2008.

ANNAN, W. D., & MANSON, W. Fractionation of the α -casein complex of bovine milk. **Journal of Dairy Research**, Vol. 36, p. 259–268, 1969.

BARBOSA, R. S., VON HAUSEN, L. J. O.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M. E. R.; STUMPF JR., W.; BARBOSA SILVEIRA, I. D.; BONO, G.; Barros, L. Método de armazenamento de leite para determinação de cálcio iônico. **Revista Archivos em Zootecnia**. Vol. 58, Supl. 1, p. 621-624, 2009.

BARROS, L.; DENIS, N., GONZÁLEZ, O.; GALAIN, C. Prueba del alcohol en leche y relación con calcio iónico. **Prácticas Veterinarias**. Publicación del Centro Veterinario de Florida-Uruguay, n.9, ano 2º, p.13-15, 1999.

BARROS, L. Transtornos metabólicos que afetam a qualidade do leite. In: _____ **USO do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas**. Porto Alegre – RS: Gráfica UFRGS, p. 44-57, 2001a.

BARROS L, CERETTA M. E, GONZÁLEZ P. Determinación de fracciones proteicas de leche de tambo por electroforesis. In: 7º Congreso Nacional de Veterinaria, Montivideo, Uruguay. **Anais...** Noviembre, 2001b.

BARROS L.; CERETTA M. E.; DENIS N. Variation in protein fractions of milk of individual cows. In: XXII World Buiatrics Congress, Hannover, Germany. **Anais...** August 18 – 23, 2002.

BARROS, L. Ionized calcium as responsible of stability of milk. Calcio iónico como responsável na estabilidade do leite. In: 9º Congresso Panamericano do Leite, Porto Alegre/RS. **Anais...** Montividéo: Fepale, Juiz de Fora/MG: Embrapa Gado de Leite, Porto Alegre/RS: Associação Gaúcha de Laticinistas, 2006.

BARROS, L. Milk composition: Its relation with milk quality and metabolic and nutritional status in dairy herds. In: XI Congress International society of animal clinical biochemistry, Chile. **Anais...**Valdivia-Chile, 2004, p. 23-29.

BEHMER, M. L. A. Causas das variações da quantidade e qualidade do leite de um animal. In: _____ **Tecnologia do Leite**. 13ª Ed. São Paulo: Nobel. 1984. p. 17-19.

BEVILACQUA, C.; HELBLING, JC.; MIRANDA, G.; MARTIN, P. Translational efficiency of casein transcripts in the mammary tissue of lactating ruminants. **Reproduction Nutrition Development**. vol. 46, n. 5, p.567-578, 2006.

BITTENCOURT, D., XAVIER, S., TERRA, V. S. S. et al. A organização da cadeia produtiva do leite e seu impacto sobre a formação de preços. In: PRATES, E.R. et al. Encontro Anual da UFRGS sobre Nutricao de Ruminantes, 2., **Novos desafios para a produção leiteira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre. 178p. 2000.

BOMFIM, M. A. D.; RODRIGUES, M. T.; MAGALHÃES, A. C. M. de; EGITO, A. S. do; SOUZA, G. N. de; BRITO, J. R. F.; PEREIRA, L. P. da S.; GOMES, G. M. F. Manipulação do conteúdo de proteína e das frações de caseína do leite de cabra através da nutrição animal. In: 9º CONGRESSO PAN-AMERICANO DE LEITE, Porto Alegre. **Anais...** Coronel Pacheco: Embrapa Gado de Leite, 2006.

BOTARO, B. G.; LIMA, Y. V. R. de; AQUINO, A. A.; FERNANDES, R. H. R.; GARCIA, J. F.; SANTOS, M. V. dos. Polimorfismo da beta-lactoglobulina não afeta as características físico-químicas e a estabilidade do leite bovino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.5, p.747-753, 2007.

BOTARO, B. G.; LIMA, Y. V. R. de; CORTINHAS, C. S.; PRADA E SILVA, L. F.; RENNO, F. P.; SANTOS, M. V. dos. Effect of the kappa-casein gene polymorphism, breed and seasonality on physicochemical characteristics, composition and stability of bovine milk. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.12, p.2447-2454, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa N.51, de 18 de setembro de 2002. Regulamento técnico de identidade e qualidade do leite cru refrigerado. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, n. 183, p. 13-22, 20 set. 2002. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Leite fluido. In: _____. MÉTODOS analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: métodos físicos e químicos. Brasília, DF, 1981. v. II, cap. 14.

CAPUCO, A. V.; WOOD, D. L.; BALDWIN, R. et al. Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during a bovine lactation: relation to milk production and effect of bST. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 84, n. 10, p. 2177-2187, 2001.

CAROLI, A. M.; CHESSA, S.; ERHARDT, G. J. *Invited review*: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. **Journal of Dairy Science**, vol. 92, n. 11, p.5335–5352, 2009.

CHAN, P. S.; WEST, J. W.; BERNARD, J. K.; FERNANDEZ, J. M. Effects of Dietary Cation-Anion Difference on Intake, Milk Yield, and Blood Components of the Early Lactation Cow. **Journal of Dairy Science**, vol. 88, p. 4384–4392, 2005.

CHASE, L. E.; OVERTON, T. R. Feeding strategies to optimize milk protein. Disponível em: <www.Ansci.cornell.edu/tmplobs/doc138.pdf>. Acesso em 24 out. 2010.

CHAVEZ, M. S. et al. Bovine milk composition parameters affecting the ethanol stability. **Journal of Dairy Research**, v.71, p.2001-2006, 2004. Disponível em: <<http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=217529>>. Acesso em: 17 maio, 2010. doi:10.1017/S0022029904000172.

CHEFTEL, J. C., CUQ, J. L., LORIENT, D. **Proteínas alimentarias**. Bioquímica – Propiedades funcionales – valor nutricional – Modificaciones químicas. Traducido del original francés por el Dr. Francisco López Capont. Zaragoza – Espanha: Editorial ACRIBIA SA, 1989.

CHEN, W. L.; HWANG, M. T.; LIAU, C. Y.; HO, J. C.; HONG, K. C.; MAO, S. J. T. β -Lactoglobulin is a Thermal Marker in Processed Milk as Studied by Electrophoresis and Circular Dichroic Spectra. **Journal of Dairy Science**, Vol. 88, n.5, p. 1618-1630, 2005.

CREAMER, L. K.; PLOWMAN, J. E.; LIDDEL, M. J.; SMITH, M. H.; HILL, J. P. micelle stability: k-casein structure and function. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 81, p. 3004-3012, 1998.

DIAS, S. D. F. **Efeito de diferentes regimes alimentares sobre a qualidade do leite produzido**. 2006, 67p. Dissertação (Mestrado Produção Animal) - Universidade dos Açores colaboração com a Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco, Açores.

DONATELE, D. M.; FOLLY, M. M.; VIEIRA, L. F. P.; TEIXEIRA, G. N. Estudo da relação da prova do álcool 72% (v/v) com pH, grau Dornic e contagem de células somáticas do leite de vacas do município de campos do Goytacazes, RJ In: XXVIII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária – CONBRAVET. **Anais...**, Brasília – DF, 2001.

EGITO, A. S.; MICLO, L.; LOPEZ, C.; ADAM, A.; GIRARDET, J. M.; GAILLARD, J. L. Separation and Characterization of Mares' Milk α s1-, β -, κ -Caseins, γ -Casein-Like, and Proteose Peptone Component 5-Like Peptides. **Journal of Dairy Science**, vol. 85, p. 697–706, 2002.

EGITO, A. S.; ROSINHA, G. M. S.; LAGUNA, L. E. ; MICLO, L.; GIRARDET, J. M.; GAILLARD, J. L. Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.58, n.5, 2006.

FARREL JR, H. M.; JIMENEZ-FLORES, R.; BLECK, G. T.; BROWN, E. M.; BUTLER, J. E.; CREAMER, L. K.; HICKS, C. L.; HOLLAR, C. M.; NG-KWAI-HANG, K. F.; SWAISGOOD, H. E. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. **Journal of Dairy Science**, vol. 87, p.1641–1674, 2004.

FERGUSON, J. D.; GALLIGAN, D. T.; THOMSEN, N. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, vol. 77, p. 2695-2703, 1994.

FISCHER, V. et al. Chemical composition of unstable non-acid milk. **Revista de Ciências Veterinárias**. vol. 4, n.4, s.1, p.52, 2006a.

FISCHER, V. et al. Chemical composition of unstable non-acid milk. **Revista de Ciências Veterinárias**. vol. 4, n.4, s.1, p.52, 2006b.

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

FOX, P. F.; BRODKORB, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**, vol. 18, p. 677–684, 2008.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. Production and utilization of milk. _____ In: **Dairy Chemistry and Biochemistry**. New York: Blackie Academic & Professional, 1998, p. 1-20.

FRUSCALSO, V.; FISCHER, V.; ZANELA, M. B. Influência da oferta de pasto sobre as propriedades físico-químicas do leite e a ocorrência de Leite Instável Não Ácido (LINA). In: 9º CONGRESSO PANAMERICANO DE LEITE, Porto Alegre/RS. **Anais...** Montividéo: Fepale, Juiz de Fora/MG: Embrapa Gado de Leite, Porto Alegre/RS: Associação Gaúcha de Laticinistas, p.197-200, 2006.

FRUSCALSO, V. **Influência da oferta da dieta, ordem e estágio de lactação sobre as propriedades físico-químicas e microbiológicas do leite bovino e a ocorrência do leite instável não ácido**. 2007, 132 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia - Produção Animal) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

GIANNONI, M. A.; GIANNONI, M. L. Fatores que afetam a produção e a composição do leite. In: _____ **Gado de Leite: Genética e Melhoramento**. Jaboticabal: Livraria Nobel AS – Editora – Distribuidora, 1987. p. 59-71.

GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). Washington, DC.: **Agricultural Research Service**. US. Dep Agric, 1970. 79p.

GONZÁLEZ, F. H. D. Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. In: _____ **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. pp. 5-21. 2001.

GONZÁLEZ, F. H. D. ; SILVA, S.G. **Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2006. 364 p.

HEEGARD, C. W., CHRISTENSEN, T., RASMUSSEN, M. D., BENFELDT, C., JENSEN, N. E., SEJRSEN, K., PETERSEN, T. E. & ANDREASEN, P. A. Plasminogen activators in bovine milk during mastitis, an inflammatory disease. **Fibrinolysis**, vol.8, p. 22-30, 1994.

HERNÁNDEZ, R. & PONCE, P. Efecto de tres tipos de dieta sobre la aparición de trastornos metabólicos y su relación con alteraciones en la composición de la leche en vacas Holstein Friesian. **Revista Salud Animal**, vol.28, n.1, p. 13-20, 2006.

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

HORNE, D. S. & PARKER, T. G. Factors affecting the ethanol stability of bovine milk. I. Effect of serum phase components. **Journal of Dairy Research**. Vol. 48, p. 273-284, 1981.

HORNE, D. S. Steric stabilization and casein micelle stability. **Journal of Colloid and Interface Science**, vol. 111, p.250-260, 1986.

HORNE, D. S. & DAVIDSON, C. M.. The effect of environmental conditions on the steric stabilization of casein micelles. **Colloid & Polymer Science**, vol. 264, n. 8, p.727-734, 1986.

HORNE, D. Casein interactions: Casting light on the black boxes, the structure in dairy products. **International Dairy Journal**, Vol. 8, p. 171–177, 1998.

HORNE, D. S.; MUIR, D. D. Alcohol and Heat Stability of Milk Protein. **Journal Dairy Science**, vol. 73, p. 3613-3626, 1990.

HU, W; MURPHY, M. R. Dietary cation-anion difference effects on performance and acid-base status of lactating dairy cows: a meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, vol. 87, p. 2222–2229, 2004.

IMAFIDON, G. I.; NG-KWAI-HANG, K. F.; HARWALKAR, V. R.; MA, C. Y. Effect of genetic polymorphism on the thermal stability of beta-lactoglobulin and kappa-casein mixture. **Journal of Dairy Science**, vol.74, p.1791-1802, 1991.

JOLIVET, P.; MACEDO, I. Q.; WU, M.; MEUNIER, J. C. Plasmin digestion of bovine β -casein dephosphorylated with one protein phosphatase type 2A purified from *Yarrowia lipolytica*. **Lait** 80, 2000, p.517–526.

KAMOUN, P. Proteínas. In: _____. **Bioquímica e Biologia Molecular**. Rio de Janeiro/RJ: Guanabara Koogan, 2006. p. 14-40.

KELLY, A. L.; O'FLAHERTY, F.; FOX, P. F. Indigenous proteolytic enzymes in milk: A brief overview of the present state of knowledge. **International Dairy Journal**, vol. 16, p. 563–572, 2006.

KINSELLA, J. E. Milk protein: physicochemical and functional properties. **Critical Review Food Science and Nutrition**, vol.21, n.3, p.197-287, 1984.

KROLOW, A. C. R.; RIBEIRO, M. E. R.; BARBOSA, R. S.; FONSECA, L. X. Aproveitamento do Leite Instável Não Ácido para produção de queijo tipo minas padrão. In: 8º SLACA - SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 2009, Campinas. 8º SLACA-"Ciência de Alimentos no mundo globalizado: Novos desafios, Novas perspectivas" **Anais...** 2009.

LANONI, L. A.; NÄÄS, I. A.; MACARI, M.; PEREIRA, D. F.; PINHEIRO, M. G. Índice de previsão de produção de leite para vacas Jersey. **Revista de Engenharia Agrícola** vol. 24, n. 2, 2004.

LEITNER, G., MERIN, U., LAVI, Y., EGBER, A., & SILANIKOVE, N. A etiology of intramammary infection and its effect on milk composition in goat flocks. **Journal of Dairy Research**, vol. 74 p.186-193, 2007,.

LEITNER, G.; MERIN, U.; SILANIKOVE, N. Effects of glandular bacterial infection and stage of lactation on milk clotting parameters: Comparison among cows, goats and sheep. **International Dairy Journal**, vol. 21, p. 279-285, 2011.

LIN, M. J., LEWIS, M. J.; GRANDISON, A. G. Measurement of ionic calcium in milk. **International Journal Dairy Technol.**, vol. 59, p.192-199, 2006.

LOPES, L. C. **Composição e características físico-químicas do leite instável não ácido (LINA) na região de Casa Branca, estado de São Paulo**. 2008, 63p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Pirassunga.

LUCEY, J. A., & FOX, P. F. Rennet coagulation properties of late-lactation milk: effect of pH adjustment, addition of CaCl, variation in rennet level and blending with mid-lactation milk. **Irish Journal of Agriculture and Food Research**, vol. 31, p. 173-184, 1992.

LUQUET, F. M. **Leche y productos lacteos**. Traduzido por: REBOLLAR, M.C. Zaragoza (Espanha): Editorial Acribia SA, 1991, 3-173 p.

MACHADO, S. C. **Fatores que afetam a estabilidade térmica do leite bovino**. 2010. Tese (Doutorado em Produção Animal). Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MALIN, E. L.; ALAIMO, M. H.; BROWN, E. M.; ARAMINI, J. M.; GERMANN, M. W.; FARRELL, JR., H. M.; MCSWEENEY, P. L. H.; FOX, P. F. Solution structures of casein peptides: NMR, FTIR, CD, and molecular modeling studies of α s1-casein, 1-23. **Journal of Protein Chemical**, Vol. 20, p. 391–404, 2001.

MALIN, E. L.; BROWN, E. M.; WICKHAM, E. D.; FARRELL, JR.; H. M. Contributions of Terminal Peptides to the Associative Behavior of α s1-Casein. **Journal of Dairy Science**, Vol. 88, p.2318–2328, 2005.

MARQUES, L. T.; FISCHER, V.; ZANELA, M. B.; STUMPF JR., W.; RIBEIRO, M. E. R.; BARROS VIDAL, L. E.; RODRIGUES, C. M.; PETER, M. D. Suplementação de vacas holandesas em estágio avançado de lactação. **Revista Ciência Rural**, vol. 40, n.6, jun, 2010a.

MARQUES, L. T.; FISCHER, V.; ZANELA, M. B. 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**. vol. 39, n.12, p.2724-2730, 2010b.

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

MARQUES, L. T.; ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R.; STUMPF Jr, W.; FISCHER. Ocorrência do Leite Instável ao álcool 76% e Não Ácido (LINA) e efeito sobre os aspectos físico-químicos do leite. **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas, vol.13, n.1, p.91-97, 2007.

MOLINA L. H.; GONZÁLEZ R.; BRITO C. et al. Correlación entre la termoestabilidad y prueba de alcohol de la leche a nivel de un centro de acopio lechero. **Archivos de Medicina Veterinária**, vol.33, n.2, p.233-240, 2001.

MÜHLBACH, R. F. Nutrição da vaca em lactação e a qualidade do leite. Disponível em: http://www.nucleovet.com.br/materias_arquivos/06.doc, acesso em: 10 fev 2011.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). Nutrient requirements of dairy cattle, 7 ed. National Academy Press, Whashington, D.C.; 2001. 381p.

NÄÄS, I. A. Biometeorologia e construções rurais em ambiente tropical. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOMETEOROLOGIA, 2., 1998, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Sociedade de Biometeorologia, 1998. p.63- 73.

NEGRI, L. M. R. **Estudio de los factores fisicoquímicos de la leche cruda que inciden sobre la estabilidad térmica.** 2002, 180f. Dissertação (Mestrado e Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fé – Argentina.

O'BRIEN, B.; DILLON, P.; MURPHY, J. J.; MEHRA, R. K.; GUINEE, T. P.; CONNOLLY, J. F.; KELLY, A.; JOYCE, P. Effects of stocking density and concentrate supplementation of grazing dairy cows on milk production, composition and processing characteristics. **Journal of Dairy Research**, vol. 66, p.165-176, 1999.

ONER, Y.; ELMACI, C. Milk protein polymorphisms in Holstein cattle. **International Journal of Dairy Technology**, vol.59, p.180-182, 2006.

ORDOÑEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; Sanz, M. L. G.; MINGUILLÓN, F. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. Características gerais do leite e componentes fundamentais. In: _____ **Tecnologia de alimentos.** Tradução: Maria Murad. Porto Alegre/RS/Brasil: Artmed, V. 2, p. 13-40, 2005.

PARDO, M. F. & NATALUCCI, C. L. Electrophoretic Analysis (Tricine-SDS-PAGE) of Bovine Caseins. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.1, n. 21, p.57-60, 2002.

PATERSON, G. R.; MACGIBBON, A. K. H.; HILL, J. P. Influence of kappa-casein and beta-lactoglobulin phenotype on the heat stability of milk. **International Dairy Journal**, vol. 9, n.3, p.375-376, 1999.

PERES, J. R. O leite como ferramenta no monitoramento nutricional. In: _____ **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras.** Porto Alegre – RS: Gráfica UFRGS, p. 30-45, 2001.

PINHEIRO, M. G.; NOGUEIRA, J. R.; LIMA, M. L. P.; LEME, P. R.; MACARI, M.; NÄÄS, A.; LALONI, I. A.; ROMA, L. C.; TITTO, E. A.; PEREIRA, A. F. Efeito do

ambiente pré-ordenha (sala de espera) sobre a temperatura da pele, a temperatura retal e a produção de leite de bovinos da raça Jersey. **Revista Portuguesa de Zootecnia**, vol. XII, n. 2, p.37-43, 2005.

POLITIS, I., BLOCK, E. & TURNER, J. D. 1990 Effect of somatotropin on the plasminogen and plasmin system in the mammary gland: proposed mechanism of action for somatotropin on the mammary gland. **Journal of Dairy Science**, vol. 73, p.1494-1499, 1990.

POLITIS, I., NG-KWAI-HANG, K.-F. & GIROUX, R. N. Environmental factors affecting plasmin activity in milk. **Journal of Dairy Science**, vol. 72, p. 1713-1718, 1989.

PONCE, P.; HERNÁNDEZ, R. Propriedades físico-químicas do leite e sua associação com transtornos metabólicos e alterações na glândula mamária. In: _____ **USO do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre – RS: Gráfica UFRGS, 2001. p. 58-68.

RIBAS, N. P. Palestra: Instrução Normativa 51 - passado, presente e futuro: O que falta e o que cada setor pode fazer pela qualidade do leite. In: IV Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite. **Anais...** Florianópolis/SC, 2010.

RIBEIRO, M. E. R.; ZANELA, M. B.; PETRINI, L. A. Manejo de ordenha e limpeza de equipamentos. In: _____ **Noções sobre produção de leite**. Pelotas/RS: Editora e Gráfica Universitária – UFPEL, 2006, p. 131-138.

ROBITAILLE, G.; BRITTEN, M.; PETITCLERC, D. Effect of a differential allelic expression of kappa-casein gene on ethanol stability of bovine milk. **Journal of Dairy Research**, vol.68, p.145-149, 2001.

ROMA JUNIOR, L. C.; ZAGO, C. A.; RODRIGUES, A. C. D. et al. Estudo da proteína do leite em termos de quantidade e qualidade. II CBQL, 2007.

SAS. SAS/STAT User's guide, version 6 (8th ed.) SAS Institute Cary, NC, 2001. 750p.

SCHÄELLIBAUM, M. Efeitos de altas contagens de células somáticas sobre a produção e qualidade de queijos. In: Simpósio Internacional sobre Qualidade do Leite, 2, 2000, Curitiba. **Anais...** Curitiba: CIETEP/FIEP, 2000. p.21-26.

SCHAFHÄUSER JR, J. O balanço de cátions e ânions em dietas para vacas leiteiras no período de transição. **Revista da FZVA**, vol.13, n.1, p. 112-127. 2006.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos**: propriedades, degradações, modificações. São Paulo – SP: Livraria Varela, 1996.

SILANIKOVE, N., MERIN, U., & LEITNER, G. Physiological role of indigenous Milk enzymes: an over view of an evolving picture. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 535-545, 2006.

SILANIKOVE, N.; SHAMAY, A.; SHINDER, D.; MORAN, A. Stress down regulates milk yield in cows by plasmin Induced β -casein product that blocks K^+ channels on the apical membranes. **Life Sciences**, vol. 67, p.2201-2212, 2000.

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. **BioMed Central Physiology**, vol. 9, n. 13, 2009.

SILVA, D. J. e QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002. 235p.

STUMPF JR., W.; BITENCOURT, D.; GOMES, J. F. et al. Sistema de Produção de leite. In: _____ **Sistemas de pecuária de leite: uma visão na região de clima temperado**. 1 ed. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2000. p. 30-60.

TEIXEIRA, N. M.; FREITAS, A. F.; BARRA, R. B. Influência de fatores de meio ambiente na variação mensal da composição e contagem de células somáticas do leite em rebanhos no Estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol. 55, n. 4, 2003.

THOMPSON, A.; BOLAND, M.; SINGH, H. **Milk Proteins: from Expression to Food**. Massey University, New Zealand: Elsevier Inc., 2009. 561 p.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: UFSM, 1997. 166p.

VAN DER STRATE, B. W. A., L. BELJAARS, G. MOLEMA, M. C. HARMSEN, AND D. K. F. MEIJER. Antiviral activities of lactoferrin. (Review) **Antiviral Research**, vol. 52, p.225–239, 2001.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. Ithaca, New York: Cornell University, 1994, 476 p.

VELLOSO, C. R. V. Noções básicas da acidez. In: BRITO, J.R.F.; DIAS, J.C. (Ed.). **A qualidade do leite**. Juiz de Fora: Embrapa-CNPGL; São Paulo: Tortuga, 1998. p.37-45.

VIERO, V.; FISCHER, V.; MACHADO, S. C.; ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R.; BARBOSA, R. S.; STUMPF JR, W.; COBUCI, J. A. Efeito da suplementação com diferentes níveis de selênio orgânico e inorgânico na produção e na composição do leite e no sangue de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol.62, n.2, 2010.

WAUGH, D. F., & von HIPPEL, P. H. k-Casein and the stabilisation of casein micelles. **Journal of the American Chemical Society**, Vol. 78, p. 4576–4582, 1956.

WIT, J. N.; KLARENBECK, G. Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. **Journal of Dairy Science**. vol.7, n.11, p.2701-2710, 1984.

YOSHIDA, S.; WEI, Z.; SHINMURA, Y.; FUKUNAGA, N. Separation of Lactoferrin-a and -b from Bovine Colostrum. **Journal of Dairy Science**, vol. 83, p.2211–2215, 2000.

ZANELA, M. B. **Caracterização do leite produzido no Rio Grande do Sul, ocorrência e indução experimental do Leite Instável Não Ácido (LINA)**. 2004. Tese (Doutorado em Zootecnia - Produção Animal) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.

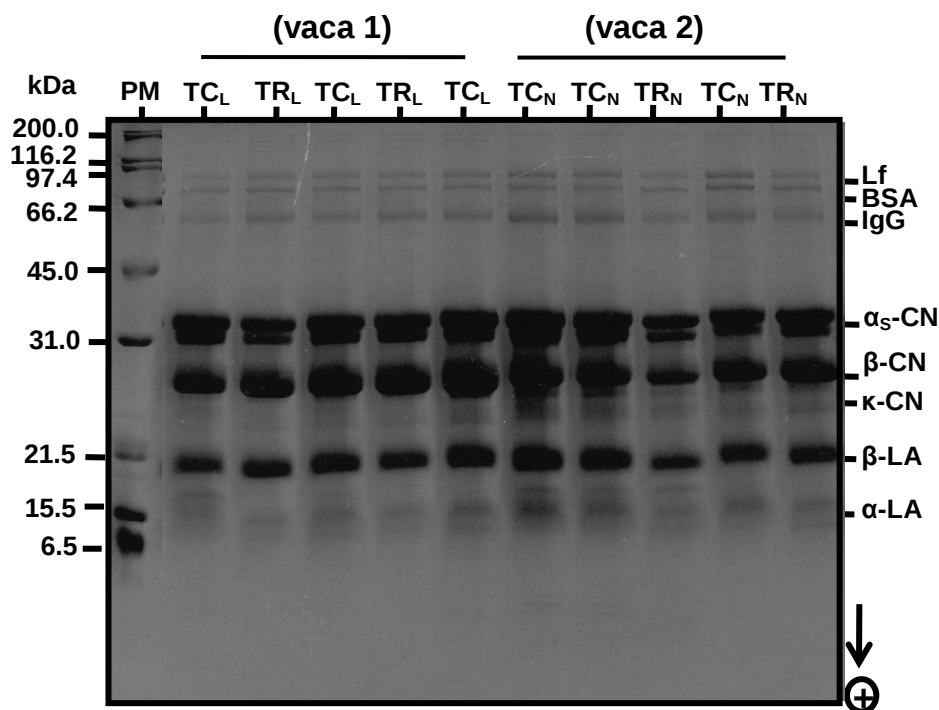
ZANELA, M. B.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M. E. R.; BARBOSA, R. S.; MARQUES, L. T.; STUMPF JR, W.; ZANELA, C. Leite instável não-ácido e composição do leite de vacas Jersey sob restrição alimentar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, vol. 41, n. 5, p.835-840, 2006a.

ZANELA, M. B.; MARQUES, L.T.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M. E. R.; STUMPF JR, W. Indução e reversão do leite Instável Não Ácido (LINA). In: 9º CONGRESSO PANAMERICANO DE LEITE, Porto Alegre/RS. **Anais...** Montividéo: Fepale, Juiz de Fora/MG: Embrapa Gado de Leite, Porto Alegre/RS: Associação Gaúcha de Laticinistas, p.439-442, 2006c.

ZANELA, M. B.; MARTINS, P. R. G.; RIBEIRO, M. E. R.; FISCHER, V.; GOMES, J. F.; BARROS, L. Indução experimental do Leite Instável Não Ácido (LINA) em vacas Jersey com sistema de produção a pasto. In: II Congresso de Qualidade do Leite, 2006, Goiânia. **Anais...** Goiânia, 2006b.

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

APÊNDICES A -



Eletoforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS das proteínas do leite das vacas 1 e 2, submetidas as dietas restrição e controle. Depositaram-se 20 μ l (2mg de leite liofilizado/ml) em cada poço, revelado com azul de Coomassie. PM: Marcador de peso molecular; **TOL**: Tratamento sem controle de alimentação, com LINA, **TCL** : Tratamento com dieta controle, com LINA; **TRL**: Tratamento com dieta restrição, com LINA, **TON**: Tratamento sem controle de alimentação, leite normal, **TCN** : Tratamento dieta controle, leite normal; **TRN**: Tratamento com dieta restrição, leite normal, Lf: Lactoferina; BSA: soroalbumina bovina; IgG: Imunoglobulina; α_S-CN: α_S- caseína; β-CN: β-caseína; κ-CN: κ-caseína; α-LA: α-lactalbumina; β-LG: β-Lactoglobulina.

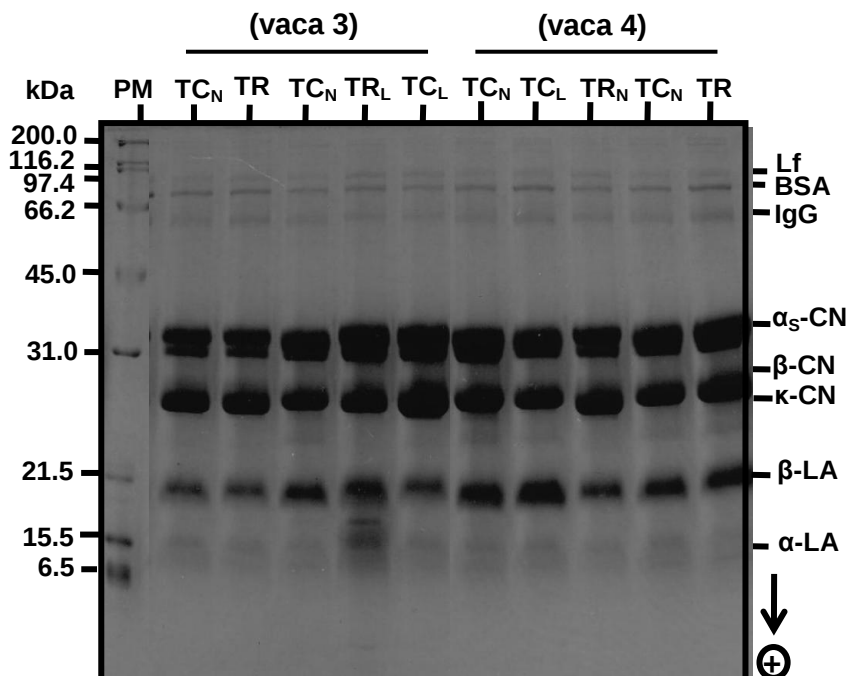
APÊNDICES B -

Valores percentuais das frações protéicas das vacas 1 e 2, submetidas a dieta controle e restrição. (LF: Lactoferina; BSA: soroalbumina bovina; IgG: Imunoglobulina; α_{S1} , α_{S2} , β , κ -CN: α_{S1} , α_{S2} , β , κ -caseína; α -LA: α -lactalbumina; β -LG: β -Lactoglobulina; CN total: caseína total; CAS:PROT: relação caseína proteína total).

VACA	1					2				
PERÍODO	PRÉ	1	2	3	4	PRÉ	1	2	3	4
FP ¹	TC _L	TR _L	TC _L	TR _L	TC _L	TC _N	TC _N	TR _N	TC _N	TR _N
LF	0,26	0,54	0,32	0,42	0,38	0,41	0,45	0,53	0,90	0,41
BSA	0,40	0,63	0,52	0,56	0,50	0,49	0,49	0,69	0,98	0,65
IgM	0,67	1,40	0,80	1,49	0,98	1,58	1,82	1,22	1,60	1,29
α -CN ($s1+s2$)	34,87	30,27	31,11	33,24	31,28	29,32	31,14	34,52	29,74	30,72
β -CN	28,44	33,71	32,61	34,81	34,03	29,68	28,88	21,80	30,18	31,81
κ -CN	1,85	1,27	1,65	1,26	2,63	6,73	4,52	2,78	2,78	2,72
β -LG	16,61	20,42	19,08	17,08	18,79	18,04	18,52	18,04	18,81	18,14
α -LA	1,36	1,52	2,71	1,38	3,08	5,38	4,39	3,29	3,75	2,51
CN total	65,15	65,25	65,36	69,30	67,94	65,74	64,54	59,09	62,69	65,24
CAS:PROT	74,73	72,02	72,70	76,46	73,21	70,15	70,28	67,12	70,51	73,05

Nota: ¹Fração protéica; **T0_L**: Tratamento sem controle de alimentação, com LINA, **TC_L**: Tratamento com dieta controle, com LINA; **TR_L**: Tratamento com dieta restrição, com LINA, **T0_N**: Tratamento sem controle de alimentação, leite normal, **TC_N**: Tratamento dieta controle, leite normal; **TR_N**: Tratamento com dieta restrição, leite normal.

APÊNDICES C -



Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS das proteínas do leite das vacas 3 e 4, submetidas as dietas restrição e controle. Depositaram-se 20 μ l (2mg de leite liofilizado/ml) em cada poço, revelado com azul de Coomassie. PM: Marcador de peso molecular; **TOL**: Tratamento sem controle de alimentação, com LINA; **TCL** : Tratamento com dieta controle, com LINA; **TRL**: Tratamento com dieta restrição, com LINA; **TON**: Tratamento sem controle de alimentação, leite normal; **TCN** : Tratamento dieta controle, leite normal; **TRN**: Tratamento com dieta restrição, leite normal, Lf: Lactoferina; BSA: soroalbumina bovina; IgG: Imunoglobulina; α_S-CN: α_S- caseína; β-CN: β-caseína; κ-CN: κ-caseína; α-LA: α-lactalbumina; β-LG: β-Lactoglobulina.

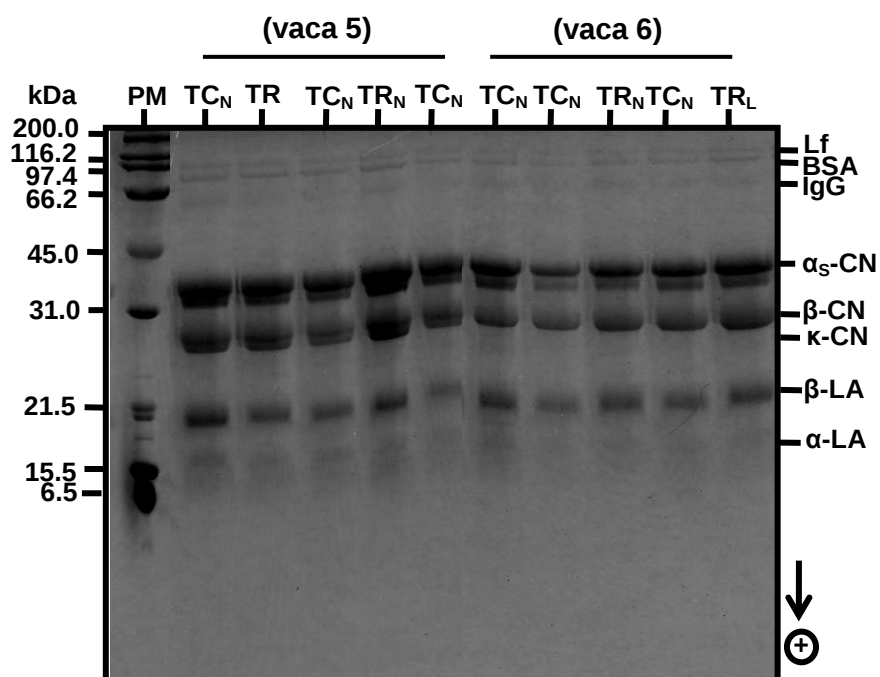
APÊNDICES D -

Valores percentuais das frações protéicas das vacas 3 e 4, submetidas a dieta controle e restrição. (LF: Lactoferina; BSA: soroalbumina bovina; IgG: Imunoglobulina; α_{S1} , α_{S2} , β , κ -CN: α_{S1} , α_{S2} , β , κ -caseína; α -LA: α -lactalbumina; β -LG: β -Lactoglobulina; CN total: caseína total; CAS:PROT: relação caseína proteína total).

VACA	3					4				
PERÍODO	PRÉ	1	2	3	4	PRÉ	1	2	3	4
FP ¹	TC _N	TR _L	TC _N	TR _L	TC _L	TC _N	TC _N	TR _N	TC _N	TR _N
LF	1,12	0,46	0,30	0,31	0,29	0,18	0,36	0,51	0,30	0,30
BSA	1,27	1,21	0,54	0,60	0,47	0,65	0,82	0,94	0,74	0,89
IgM	2,62	1,35	0,74	0,63	0,79	0,73	1,01	1,15	0,89	1,05
α -CN (s_{1+} s_{2})	32,45	36,72	36,98	36,60	38,25	37,33	32,91	35,67	36,59	29,94
β -CN	32,78	34,74	28,23	24,88	36,16	28,74	26,19	33,75	28,73	26,75
κ -CN	1,97	1,39	2,24	.	1,30	2,78	1,53	1,62	1,79	3,51
β -LG	10,89	11,45	17,69	16,19	10,92	18,31	23,85	13,60	17,97	17,19
α -LA	2,13	1,65	1,31	2,70	3,40	1,49	1,65	1,77	1,57	4,97
CN total	67,19	72,85	67,45	61,48	75,70	68,85	60,63	71,03	67,10	60,20
CAS:PROT	75,94	81,23	75,95	69,42	82,67	75,78	68,31	79,82	74,74	70,67

Nota: ¹Fração protéica; **T0_L**: Tratamento sem controle de alimentação, com LINA, **TC_L**: Tratamento com dieta controle, com LINA; **TR_L**: Tratamento com dieta restrição, com LINA, **T0_N**: Tratamento sem controle de alimentação, leite normal, **TC_N**: Tratamento dieta controle, leite normal; **TR_N**: Tratamento com dieta restrição, leite normal.

APÊNDICES E -



Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS das proteínas do leite das vacas 5 e 6, submetidas as dietas restrição e controle. Depositaram-se 20µl (2mg de leite liofilizado/ml) em cada poço, revelado com azul de Coomassie. PM: Marcador de peso molecular; **TOL**: Tratamento sem controle de alimentação, com LINA, **TCL** : Tratamento com dieta controle, com LINA; **TRL**: Tratamento com dieta restrição, com LINA, **TON**: Tratamento sem controle de alimentação, leite normal, **TCN** : Tratamento dieta controle, leite normal; **TRN**: Tratamento com dieta restrição, leite normal, Lf: Lactoferina; BSA: soroalbumina bovina; IgG: Imunoglobulina; α_S-CN: α_S- caseína; β-CN: β-caseína; κ-CN: κ-caseína; α-LA: α-lactalbumina; β-LG: β-Lactoglobulina.

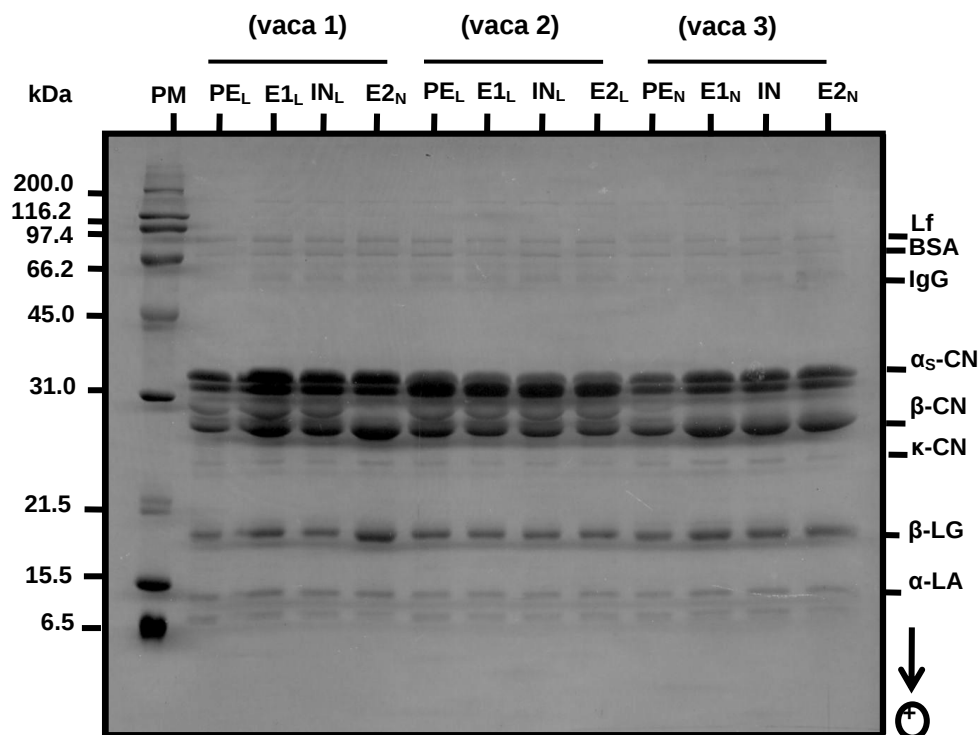
APÊNDICES F-

Valores percentuais das frações protéicas das vacas 5 e 6, submetidas a dieta controle e restrição. (LF: Lactoferina; BSA: soroalbumina bovina; IgG: Imunoglobulina; α_{S1} , α_{S2} , β , κ -CN: α_{S1} , α_{S2} , β , κ -caseína; α -LA: α -lactalbumina; β -LG: β -Lactoglobulina; CN total: caseína total; CAS:PROT: relação caseína proteína total).

VACA	5					6				
PERÍODO	PRÉ	1	2	3	4	PRÉ	1	2	3	4
FP ¹	TC _N	TR _L	TC _N	TR _N	TC _N	TC _N	TC _N	TR _N	TC _N	TR _L
LF	1,21	1,11	1,00	0,79	0,84	0,75	1,33	1,25	0,85	1,13
BSA	1,28	1,42	1,48	0,96	0,99	1,04	1,44	1,14	0,83	1,33
IgM	1,23	0,98	0,88	0,76	0,83	1,16	2,08	1,75	0,81	1,04
α -CN (s1+s2)	34,70	37,37	35,90	37,61	37,97	39,18	32,12	34,29	39,14	39,47
β -CN	24,75	27,33	22,58	30,16	24,54	19,21	22,00	24,76	22,62	24,94
κ -CN	.	1,34	2,18	.	2,61	2,51	2,85	1,44	1,18	2,36
β -LG	17,98	12,57	14,67	12,70	10,90	18,17	17,98	18,35	15,24	14,65
α -LA	5,61	7,28	4,73	3,24	4,60	5,51	3,95	3,21	3,70	2,73
CN total	59,45	66,04	60,66	67,76	65,12	60,90	56,98	60,49	62,94	66,76
CAS:PROT	67,11	72,66	72,33	77,51	76,96	69,29	67,45	68,45	73,03	74,90

Nota: ¹Fração protéica; **T0_L**: Tratamento sem controle de alimentação, com LINA, **TC_L**: Tratamento com dieta controle, com LINA; **TR_L**: Tratamento com dieta restrição, com LINA, **T0_N**: Tratamento sem controle de alimentação, leite normal, **TC_N**: Tratamento dieta controle, leite normal; **TR_N**: Tratamento com dieta restrição, leite normal.

APÊNDICES G -



Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS das proteínas do leite das vacas 1, 2 e 3, submetidas ao tratamento com citrato. Depositaram-se 20 μ l (2mg de leite liofilizado/ml) em cada poço, revelado com azul de Coomassie. PM: Marcador de peso molecular; **PE_L**: pré-experimental com LINA; **PE_N**: pré-experimental com leite normal; **E1_L**: experimento 1 com LINA; **E1_N**: experimento 1 com leite normal; **IN_L**: experimento intermediário com LINA; **IN_N**: experimento intermediário com leite normal; **E2_L**: experimento 2 com LINA; **E2_N**: experimento 2 com leite normal; Lf: Lactoferrina; BSA: soroalbumina bovina; IgG: Imunoglobulina; α S-CN: α S-caseína; β -CN: β -caseína; κ -CN: κ -caseína; α -LA: α -lactalbumina; β -LG: β -Lactoglobulina.

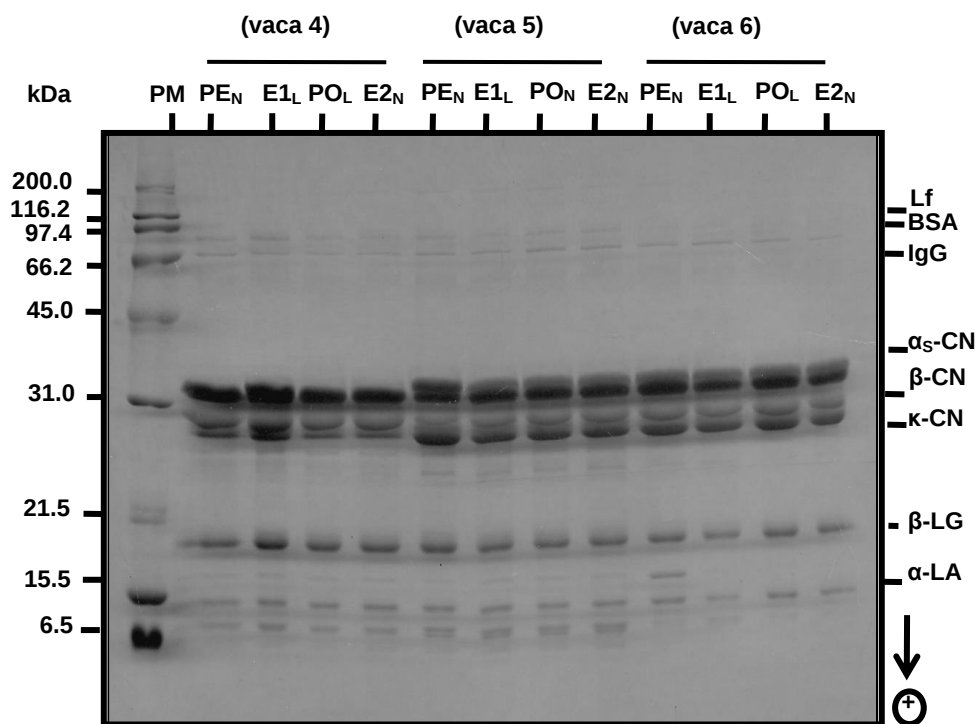
APÊNDICES H -

Valores absolutos das frações protéicas das vacas 1, 2, e 3 submetidas a dieta citrato. (LF: Lactoferina; BSA: soroalbumina bovina; IgG: Imunoglobulina; α_{S1} , α_{S2} , β , κ -CN: α_{S1} , α_{S2} , β , κ -caseína; α -LA: α -lactalbumina; β -LG: β -Lactoglobulina; CN total: caseína total; CAS:PROT: relação caseína proteína total).

VACA	1				2				3			
PERÍODO	PE	E1	IN	E2	PE	E1	IN	E2	PE	E1	IN	E2
LF	1,086	0,410	0,416	0,375	0,408	0,430	0,526	0,700	0,388	0,627	0,688	0,335
BSA	1,641	0,978	0,997	1,507	1,683	1,510	1,553	1,098	1,694	1,050	1,017	1,360
IgM	3,743	1,104	1,513	1,672	1,211	1,085	1,240	1,618	1,419	1,237	1,190	1,100
α_{S1} -CN	14,852	18,844	18,609	17,823	38,259	41,538	40,398	37,643	13,385	16,618	13,569	16,253
α_{S2} -CN	12,028	17,512	18,964	15,112	2,215	.	.	.	15,590	14,434	19,233	13,924
β -CN	13,057	21,708	24,066	29,911	27,704	23,255	21,577	15,694	28,030	28,892	29,310	28,742
κ -CN	1,071	0,864	0,912	1,711	2,422	1,499	1,192	1,032	1,740	1,189	1,275	0,931
β -LG	10,744	8,554	8,657	12,704	8,697	8,897	8,509	9,400	13,159	13,109	12,228	11,515
α -LA	5,902	2,250	1,964	2,448	2,378	1,664	2,000	2,600	2,410	1,960	1,963	2,504
CN total	41,010	58,930	62,550	64,560	70,600	66,290	63,170	54,370	58,740	61,130	63,390	59,850
CAS:PROT	45,590	67,120	69,350	71,320	81,860	74,410	74,430	65,820	67,320	70,440	76,630	70,14

Nota: **PE_L**: pré-experimental com LINA; **PE_N**: pré-experimental com leite normal; **E1_L**: experimento 1 com LINA; **E1_N**: experimento 1 com leite normal; **IN_L**: experimento intermediário com LINA; **IN_N**: experimento intermediário com leite normal; **E2_L**: experimento 2 com LINA; **E2_N**: experimento 2 com leite normal.

APÊNDICES I -



Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS das proteínas do leite das vacas 4, 5 e 6, submetidas ao tratamento com citrato. Depositaram-se 20 μ l (2mg de leite liofilizado/ml) em cada poço, revelado com azul de Coomassie. PM: Marcador de peso molecular; PE_L : pré-experimental com LINA; PE_N : pré-experimental com leite normal; $E1_L$: experimento 1 com LINA; $E1_N$: experimento 1 com leite normal; IN_L : experimento intermediário com LINA; IN_N : experimento intermediário com leite normal; $E2_L$: experimento 2 com LINA; $E2_N$: experimento 2 com leite normal; Lf: Lactoferrina; BSA: soroalbumina bovina; IgG: Imunoglobulina; α_S -CN: α_S -caseína; β -CN: β -caseína; κ -CN: κ -caseína; α -LA: α -lactalbumina; β -LG: β -Lactoglobulina.

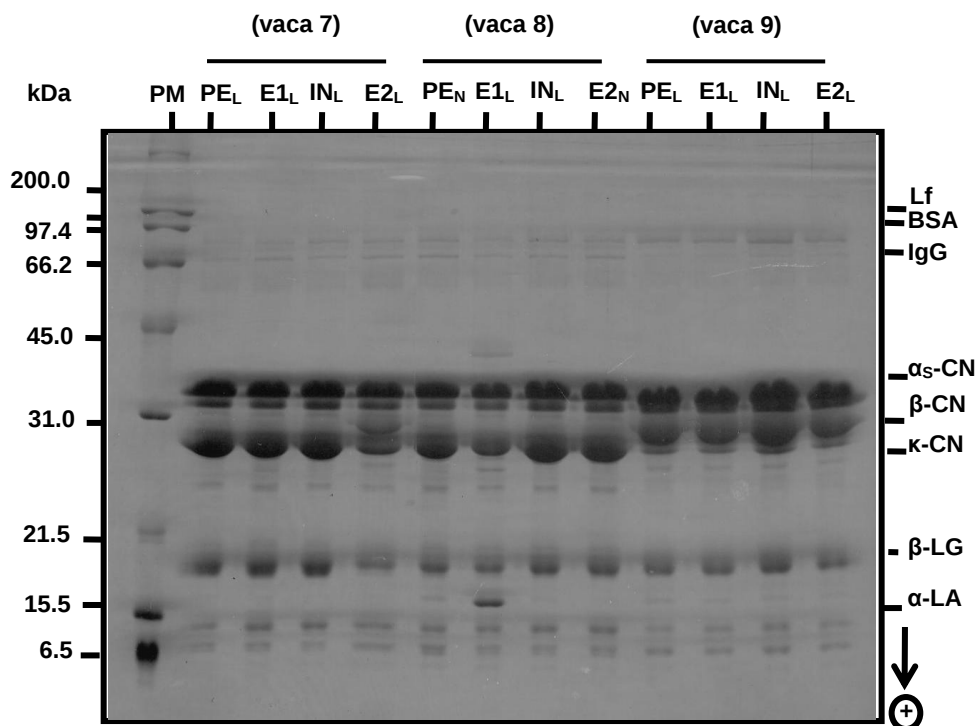
APÊNDICES J -

Valores absolutos das frações protéicas das vacas 4, 5 e 6 submetidas a dieta citrato. (LF: Lactoferina; BSA: soroalbumina bovina; IgG: Imunoglobulina; α_{S1} , α_{S2} , β , κ -CN: α_{S1} , α_{S2} , β , κ -caseína; α -LA: α -lactalbumina; β -LG: β -Lactoglobulina; CN total: caseína total; CAS:PROT: relação caseína proteína total).

VACA	4				5				6			
PERÍODO	PE	E1	IN	E2	PE	E1	IN	E2	PE	E1	IN	E2
LF	0,972	1,155	0,912	0,968	0,881	0,790	0,594	1,096	0,670	2,334	1,335	0,806
BSA	1,686	1,230	0,948	0,943	0,889	1,487	1,227	1,385	0,486	1,027	1,130	2,800
IgM	0,779	1,204	1,692	0,896	0,771	1,004	0,836	0,838	1,237	1,852	1,517	5,611
α_{S1} -CN	38,555	39,733	43,600	43,504	14,829	40,139	41,808	39,494	44,529	43,009	41,812	39,829
α_{S2} -CN	11,564	14,015	11,004	12,130	19,026	7,631	8,676	7,906	8,915	8,907	10,316	8,017
β -CN	11,447	13,083	11,291	11,825	31,991	21,678	21,992	21,961	20,313	22,692	20,209	19,049
κ -CN	2,324	2,061	1,101	2,257	1,223	2,980	1,779	3,044	0,708	0,917	0,430	0,575
β -LG	10,861	11,863	13,138	13,026	10,862	10,196	9,473	10,186	8,254	7,761	8,622	9,213
α -LA	3,940	2,556	2,329	3,048	1,874	2,388	1,736	3,671	1,445	3,342	2,794	5,830
CN total	63,890	68,890	67,000	69,720	67,070	72,430	74,250	72,400	74,470	75,520	72,770	67,470
CAS:PROT	73,440	77,560	76,420	77,150	73,640	79,210	81,580	76,660	84,040	80,610	82,540	73,55

Nota: **PE_L**: pré-experimental com LINA; **PE_N**: pré-experimental com leite normal; **E1_L**: experimento 1 com LINA; **E1_N**: experimento 1 com leite normal; **IN_L**: experimento intermediário com LINA; **IN_N**: experimento intermediário com leite normal; **E2_L**: experimento 2 com LINA; **E2_N**: experimento 2 com leite normal.

APÊNDICES K -



Eletoforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS das proteínas do leite das vacas 7, 8 e 9, submetidas ao tratamento com bicarbonato. Depositaram-se 20 μ l (2mg de leite liofilizado/ml) em cada poço, revelado com azul de Coomassie. PM: Marcador de peso molecular; **PE_L**: pré-experimental com LINA; **PE_N**: pré-experimental com leite normal; **E1_L**: experimento 1 com LINA; **E1_N**: experimento 1 com leite normal; **IN_L**: experimento intermediário com LINA; **IN_N**: experimento intermediário com leite normal; **E2_L**: experimento 2 com LINA; **E2_N**: experimento 2 com leite normal; BSA: soroalbumina bovina; IgG: Imunoglobulina; α S-CN: α S-caseína; β -CN: β -caseína; κ -CN: κ -caseína; α -LA: α -lactalbumina; β -LG: β -Lactoglobulina.

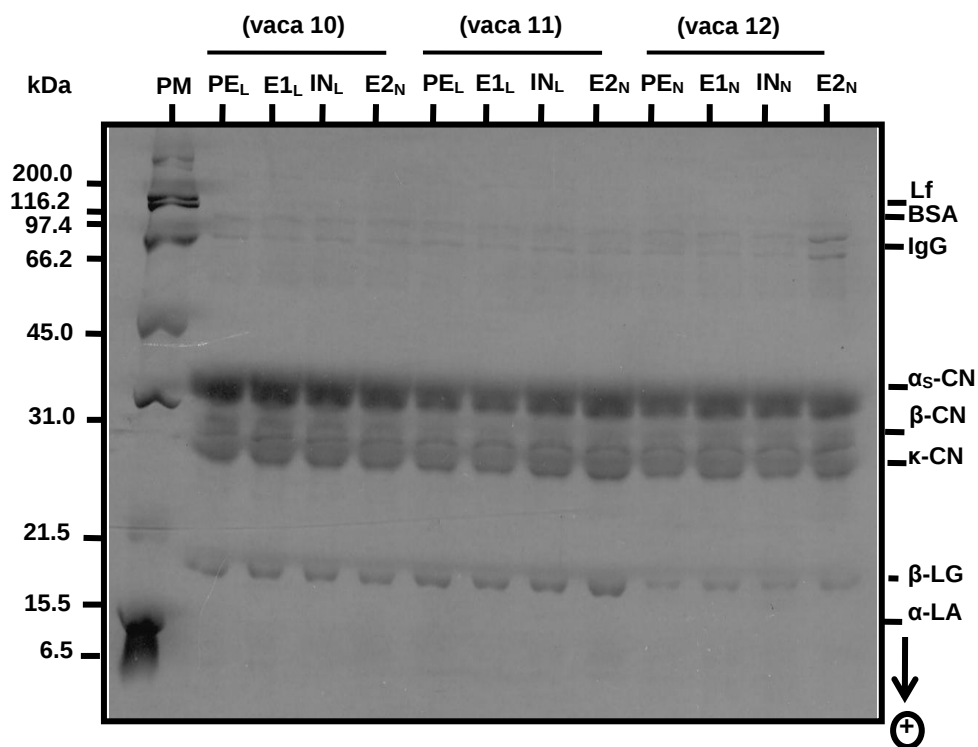
APÊNDICES L -

Valores absolutos das frações protéicas das vacas 7, 8 e 9 submetidas a dieta bicarbonato. (LF: Lactoferina; BSA: soroalbumina bovina; IgG: Imunoglobulina; α_{S1} , α_{S2} , β , κ -CN: α_{S1} , α_{S2} , β , κ -caseína; α -LA: α -lactalbumina; β -LG: β -Lactoglobulina; CN total: caseína total; CAS:PROT: relação caseína proteína total).

VACA	7				8				9			
PERÍODO	PE	E1	IN	E2	PE	E1	IN	E2	PE	E1	IN	E2
LF	0,252	1,094	0,788	1,597	0,543	0,702	1,475	0,749	2,015	1,290	0,544	0,833
BSA	0,582	0,662	0,454	1,101	1,391	2,553	1,505	2,596	2,067	1,653	1,287	3,947
IgM	1,401	1,262	0,676	0,663	0,702	0,554	0,545	0,814	3,716	0,995	1,562	0,761
α_{S1} -CN	27,968	27,899	29,054	29,003	26,712	25,138	27,186	26,737	35,108	37,937	33,582	40,995
α_{S2} -CN	7,477	6,912	8,779	21,667	6,668	7,502	8,915	8,051	.	.	.	.
β -CN	33,363	31,845	33,220	17,181	31,374	21,886	32,253	30,387	27,626	27,934	26,324	25,693
κ -CN	1,127	1,252	0,782	2,039	1,563	3,419	0,777	1,250	2,008	1,010	1,263	0,836
β -LG	11,310	13,949	13,331	10,183	10,904	10,646	11,668	11,793	9,942	10,979	11,050	10,669
α -LA	1,844	4,225	3,776	5,468	4,470	6,714	4,328	4,806	3,412	1,745	2,319	2,848
CN total	69,940	67,910	71,830	69,890	66,320	57,950	69,130	66,420	64,740	66,880	61,170	67,520
CAS:PROT	79,380	75,230	78,320	73,700	75,400	63,430	74,370	72,740	72,420	75,810	75,2	75,58

Nota: **PE_L**: pré-experimental com LINA; **PE_N**: pré-experimental com leite normal; **E1_L**: experimento 1 com LINA; **E1_N**: experimento 1 com leite normal; **IN_L**: experimento intermediário com LINA; **IN_N**: experimento intermediário com leite normal; **E2_L**: experimento 2 com LINA; **E2_N**: experimento 2 com leite normal.

APÊNDICES M -



Eletoforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS das proteínas do leite das vacas 10, 11 e 12, submetidas ao tratamento com bicarbonato. Depositaram-se 20 μ l (2mg de leite liofilizado/ml) em cada poço, revelado com azul de Coomassie. PM: Marcador de peso molecular; **PE_L**: pré-experimental com LINA; **PE_N**: pré-experimental com leite normal; **E1_L**: experimento 1 com LINA; **E1_N**: experimento 1 com leite normal; **IN_L**: experimento intermediário com LINA; **IN_N**: experimento intermediário com leite normal; **E2_L**: experimento 2 com LINA; **E2_N**: experimento 2 com leite normal; Lf: Lactoferrina; BSA: soroalbumina bovina; IgG: imunoglobulina; α S-CN: α S-caseína; β -CN: β -caseína; κ -CN: κ -caseína; α -LA: α -lactalbumina; β -LG: β -Lactoglobulina.

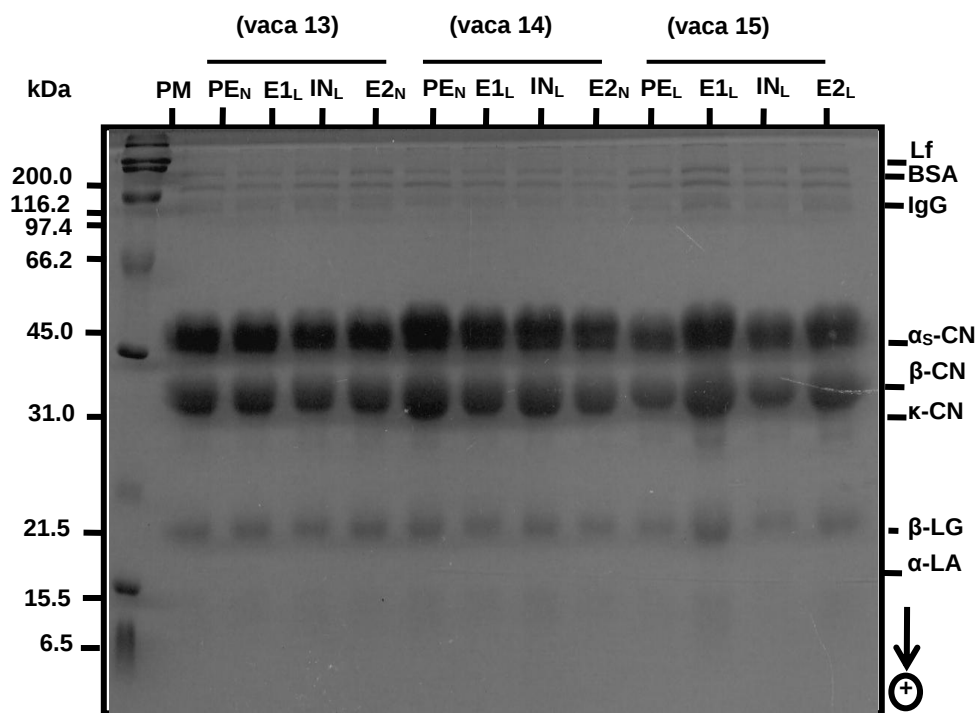
APÊNDICES N -

Valores absolutos das frações protéicas das vacas 10, 11 e 12 submetidas à dieta controle. (LF: Lactoferina; BSA: soroalbumina bovina; IgG: Imunoglobulina; α_{S1} , α_{S2} , β , κ -CN: α_{S1} , α_{S2} , β , κ -caseína; α -LA: α -lactalbumina; β -LG: β -Lactoglobulina; CN total: caseína total; CAS:PROT: relação caseína proteína total).

VACA	10				11				12			
PERÍODO	PE	E1	IN	E2	PE	E1	IN	E2	PE	E1	IN	E2
LF	3,776	0,392	0,807	2,022	1,040	2,435	0,789	0,415	1,089	1,022	1,095	2,141
BSA	1,877	2,004	1,466	1,695	1,674	1,400	2,615	1,282	2,425	1,908	1,434	4,610
IgM	.	1,163	1,263	1,165	1,565	1,303	1,323	1,083	1,569	1,003	1,195	3,277
α_{S1} -CN	44,567	48,886	46,605	46,409	43,460	38,963	40,755	42,363	42,160	43,978	44,090	35,518
α_{S2} -CN	12,319	7,017	7,947	7,301	6,172	6,466	12,640	12,900	5,901	7,456	5,980	4,769
β -CN	.	6,907	5,700	7,321	7,913	8,465	7,855	8,304	8,603	8,355	7,774	10,361
κ -CN	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
β -LG	13,545	15,224	9,577	11,132	17,951	17,263	11,355	10,418	17,689	18,659	8,878	16,573
α -LA	0,345	3,268	2,525	2,497	4,141	4,183	4,058	2,786	4,491	3,964	3,856	1,248
CN total	56,800	62,810	60,250	61,030	57,540	53,890	61,250	63,570	56,660	59,790	57,840	50,650
CAS:PROT	67,460	69,410	68,430	72,400	62,590	61,060	68,460	69,790	60,910	64,450	72,650	58,48

Nota: **PE_L**: pré-experimental com LINA; **PE_N**: pré-experimental com leite normal; **E1_L**: experimento 1 com LINA; **E1_N**: experimento 1 com leite normal; **IN_L**: experimento intermediário com LINA; **IN_N**: experimento intermediário com leite normal; **E2_L**: experimento 2 com LINA; **E2_N**: experimento 2 com leite normal.

APÊNDICES O -



Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS das proteínas do leite das vacas 13, 14 e 15, submetidas ao tratamento com controle. Depositaram-se 20 μ l (2mg de leite liofilizado/ml) em cada poço, revelado com azul de Coomassie. PM: Marcador de peso molecular; **PE_L**: pré-experimental com LINA; **PE_N**: pré-experimental com leite normal; **E1_L**: experimento 1 com LINA; **E1_N**: experimento 1 com leite normal; **IN_L**: experimento intermediário com LINA; **IN_N**: experimento intermediário com leite normal; **E2_L**: experimento 2 com LINA; **E2_N**: experimento 2 com leite normal; Lf: Lactoferrina; BSA: soroalbumina bovina; IgG: imunoglobulina; α_S-CN: α_S-caseína; β-CN: β-caseína; κ-CN: κ-caseína; α-LA: α-lactalbumina; β-LG: β-Lactoglobulina.

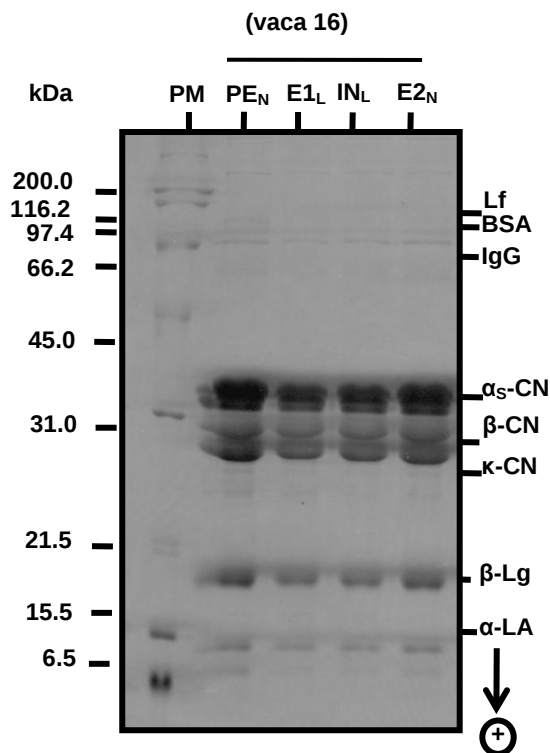
APÊNDICES P -

Valores absolutos das frações protéicas das vacas 13, 14 e 15 submetidas à dieta controle. (LF: Lactoferina; BSA: soroalbumina bovina; IgG: Imunoglobulina; α_{S1} , α_{S2} , β , κ -CN: α_{S1} , α_{S2} , β , κ -caseína; α -LA: α -lactalbumina; β -LG: β -Lactoglobulina; CN total: caseína total; CAS:PROT: relação caseína proteína total).

VACA	13				14				15			
PERÍODO	PE	E1	IN	E2	PE	E1	IN	E2	PE	E1	IN	E2
LF	3,085	2,899	0,733	1,700	1,046	2,491	2,695	2,373	2,434	1,031	1,618	3,158
BSA	1,262	1,189	1,633	1,733	1,692	1,383	1,333	1,042	1,566	1,951	2,557	4,972
IgM	1,166	3,214	1,194	1,052	1,604	1,570	2,180	2,770	1,110	1,014	1,760	5,987
α_{S1} -CN	45,227	49,817	47,813	46,407	26,051	25,323	40,474	42,505	42,482	44,224	42,408	35,878
α_{S2} -CN	.	.	.	7,676	17,811	13,843	.	.	.	.	.	.
β -CN	7,760	7,718	7,943	6,059	5,553	6,595	5,756	2,827	5,932	7,440	5,986	3,259
κ -CN	5,093	6,525	5,740	6,338	8,327	8,422	7,944	10,687	9,142	8,388	8,921	12,020
β -LG	14,064	15,148	13,683	9,205	18,854	17,049	17,991	9,960	16,842	9,269	8,258	16,721
α -LA	2,584	4,275	2,860	3,057	4,158	4,545	4,220	2,708	3,823	3,513	4,031	.
CN total	58,080	64,060	61,500	66,480	57,740	54,180	54,170	56,020	57,560	60,050	57,320	51,160
CAS:PROT	68,630	67,470	70,620	75,770	61,900	60,490	60,440	59,010	62,780	63,110	63,320	54,86

Nota: **PE_L**: pré-experimental com LINA; **PE_N**: pré-experimental com leite normal; **E1_L**: experimento 1 com LINA; **E1_N**: experimento 1 com leite normal; **IN_L**: experimento intermediário com LINA; **IN_N**: experimento intermediário com leite normal; **E2_L**: experimento 2 com LINA; **E2_N**: experimento 2 com leite normal.

APÊNDICES Q



Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS das proteínas do leite da vaca 16, submetida ao tratamento com controle. Depositaram-se 20 μ l (2mg de leite liofilizado/ml) em cada poço, revelado com azul de Coomassie. PM: Marcador de peso molecular; **PE_L**: pré-experimental com LINA; **PE_N**: pré-experimental com leite normal; **E1_L**: experimento 1 com LINA; **E1_N**: experimento 1 com leite normal; **IN_L**: experimento intermediário com LINA; **IN_N**: experimento intermediário com leite normal; **E2_L**: experimento 2 com LINA; **E2_N**: experimento 2 com leite normal; Lf: Lactoferrina; BSA: soroalbumina bovina; IgG: Imunoglobulina; α_S-CN: αS-caseína; β-CN: β-caseína; κ-CN: κ-caseína; α-LA: α-lactalbumina; β-LG: β-Lactoglobulina.

APÊNDICES R-

Valores absolutos das frações protéicas da vaca 16 submetida à dieta controle. (LF: Lactoferina; BSA: soroalbumina bovina; IgG: Imunoglobulina; α_{S1} , α_{S2} , β , κ -CN: α_{S1} , α_{S2} , β , κ -caseína; α -LA: α -lactalbumina; β -LG: β -Lactoglobulina; CN total: caseína total; CAS:PROT: relação caseína proteína total).

VACA		16		
PERÍODO	PE	E1	PO	E2
LF	0,426	0,525	0,233	0,476
BSA	0,611	0,422	0,514	0,502
IgM	0,492	0,925	0,684	0,673
α_{S1} -CN	44,319	44,304	36,922	37,133
α_{S2} -CN	11,867	13,062	7,661	8,267
β -CN	17,684	8,056	12,991	13,635
κ -CN	1,457	8,219	8,460	7,649
β -LG	10,954	11,691	10,392	10,518
α -LA	3,465	5,147	5,312	1,355
CN total	75,330	73,640	66,030	66,680
CAS:PROT	80,370	78,270	70,850	73,270

Nota: **PE_L**: pré-experimental com LINA; **PE_N**: pré-experimental com leite normal; **E1_L**: experimento 1 com LINA; **E1_N**: experimento 1 com leite normal; **IN_L**: experimento intermediário com LINA; **IN_N**: experimento intermediário com leite normal; **E2_L**: experimento 2 com LINA; **E2_N**: experimento 2 com leite normal.