

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA UDESC  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS CAV  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**VARIÁVEIS QUE AFETAM A ESTABILIDADE AO TESTE DO ÁLCOOL E  
ACIDEZ TITULÁVEL: UMA ABORDAGEM MULTIVARIADA**

**ANGELICA LETICIA SCHEID**

**LAGES, SC  
AGOSTO, 2024**

**ANGELICA LETICIA SCHEID**

**VARIÁVEIS QUE AFETAM A ESTABILIDADE AO TESTE DO ÁLCOOL E  
ACIDEZ TITULÁVEL: UMA ABORDAGEM MULTIVARIADA**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciência Animal no Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. André Thaler Neto

**LAGES, SC  
AGOSTO, 2024**

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da  
Biblioteca Universitária Udesc,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Scheid, Angelica Leticia

Variáveis que Afetam a Estabilidade ao Teste do Álcool e  
Acidez Titulável: Uma Abordagem Multivariada / Angelica  
Leticia Scheid. -- 2024.

97 p.

Orientador: André Thaler Neto

-- Seleccione -- (mestrado) -- Universidade do Estado de  
Santa Catarina, , Programa de Pós-Graduação -- Seleccione  
--, , 2024.

1. Qualidade do Leite. 2. Propriedades Físico-Químicas do  
Leite. 3. Leite Instável Não Ácido. 4. Estágio De Lactação. I.  
Thaler Neto, André. II. Universidade do Estado de Santa  
Catarina, , Programa de Pós-Graduação -- Seleccione --. III.  
Título.

**ANGELICA LETICIA SCHEID**

**VARIÁVEIS QUE AFETAM A ESTABILIDADE AO TESTE DO ÁLCOOL E  
ACIDEZ TITULÁVEL: UMA ABORDAGEM MULTIVARIADA**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós  
– Graduação em Ciência Animal na  
Universidade do Estado de Santa Catarina,  
como requisito parcial para obtenção do grau de  
Doutora em Ciência Animal.

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. André Thaler Neto  
CAV – UDESC, Lages, SC.

**Membros:**

---

Profa. Dra. Ana Luiza Bachmann Schogor  
CEO - UDESC, Chapecó, SC.

---

Profa. Dra. Daíse Wernicke  
UNIBAVE, Orleans, SC

---

Prof. Dr. Henrique M. N. Ribeiro Filho  
CAV – UDESC, Lages, SC.

---

Profa. Dra. Vivian Fischer  
UFRGS, Porto Alegre, RS

Lages 27 de agosto de 2024.

"Não há saber mais ou saber menos: há saberes diferentes."

(Paulo Freire)

"Acredite no poder da palavra "Desistir" tire o D coloque o R que você vai Resistir. Uma pequena mudança às vezes traz esperança e faz a gente seguir."

(Bráulio Bessa)

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, sabedoria e proteção ao longo desta jornada, e ainda pela intercessão recebida de Nossa Senhora de Aparecida. Sem a fé e a espiritualidade, não teria conseguido superar os desafios e alcançar esta importante conquista.

À minha família que é minha inspiração e meu alicerce, em especial aos meus pais, Nelson e Matilde, pelo amor, apoio incondicional e pelos tantos ensinamentos os quais sempre me guiaram, vocês são a razão de eu me manter firme em muitos momentos difíceis. Às minhas irmãs, Andreia, Marize e Marciani, aos cunhados Alexandre e Dimas, e as minhas sobrinhas Anna Clara e Ana Júlia, agradeço por estarem sempre ao meu lado, oferecendo carinho e encorajamento toda vez que necessitei. De forma muito especial, agradeço à Andreia, ao Alexandre e a Anna Clara, por me receberem em seu lar, me acolherem e por me ajudarem tanto. Vocês têm sido meu porto seguro, sou muito grata e jamais esquecerei tudo que fazem por mim.

Ao professor André Thaler Neto, agradeço e digo que foi uma honra tê-lo como meu orientador, você acreditou em mim quando nem eu mesma acreditava. Obrigada pela paciência, dedicação, confiança, ensinamentos e também pelos constantes incentivos, os quais foram cruciais para o desenvolvimento deste trabalho, assim como para o meu crescimento profissional e pessoal. Seu compromisso com a excelência acadêmica é um exemplo que levarei para a vida toda.

Aos colegas e amigos do grupo de pesquisa, agradeço pela parceria, troca de conhecimentos e momentos compartilhados, vocês tornaram esta trajetória mais leve e gratificante. Dayane, Gadriely, Roberto e Tiago, lhes agradeço por me auxiliarem e terem sido verdadeiros amigos nessa caminhada. Ana, Andreina, Beatriz, Bruna, Bruno, Carina, Cristian, Daniel, Deise, Ester, Eduardo, Helen, Isa, Laíz, Luiz, Mariana, Nataly, Pedro, Renata, Roberta, Ricardo, e Veridiana por toda a parceria, ajuda e suporte durante esse período. O meio acadêmico ainda me presenteou com alguns colegas que hoje sinto-me orgulhosa em chamá-los de amigos: Adriana, Edinara, Marciel, Mauricio e Raylana, vocês são meus irmãos de coração, se estou aqui hoje, é porque tive o incentivo e ajuda de vocês desde o começo, jamais esquecerei tudo que fizeram por mim, eu os admiro demais. Muito obrigada.

Agradeço profundamente ao professor Mário, que me apoiou e incentivou a chegar ao mestrado e ao doutorado, sou imensamente grata por nunca ter desistido de mim. Aos professores e colegas da pós-graduação, agradeço por todo o conhecimento compartilhado,

orientações valiosas e pelo apoio constante. Vocês desempenharam um papel crucial no meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

Ao programa de pós-graduação, agradeço pela estrutura e oportunidades oferecidas.

À CAPES à FAPESC e à FUMDES, agradeço pela concessão da bolsa que viabilizou a realização deste estudo. O apoio financeiro foi imprescindível para a concretização deste projeto.

Aos vários produtores que abriram as portas de suas propriedades e gentilmente permitiram as coletas de amostras de leite, possibilitando assim, a realização das pesquisas necessárias para o desenvolvimento deste trabalho. A colaboração e generosidade de vocês foram essenciais para o sucesso desta investigação.

Finalmente, à UDESC, agradeço por proporcionar um ambiente acadêmico de qualidade e por todo o suporte institucional.

A todos, o meu sincero e profundo agradecimento!!!

## RESUMO

SCHEID, ANGELICA LETICIA. **Variáveis que afetam a estabilidade ao teste do álcool e acidez titulável: uma abordagem multivariada.** 2024. 97p. Tese (Doutorado em Ciência Animal – Área: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2024.

A adequação do leite para beneficiamento industrial é afetada por características funcionais como a estabilidade ao teste do álcool e acidez titulável. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi identificar as principais variáveis relacionadas à estabilidade ao teste do álcool e acidez titulável do leite bovino. O trabalho foi conduzido em três diferentes estudos. O primeiro estudo analisou a composição e propriedades físico-químicas do leite durante as cinco primeiras semanas de lactação em 336 vacas em seis propriedades leiteiras comerciais. Os resultados mostraram que a produção de leite aumentou gradualmente, estabilizando-se na terceira semana, enquanto os níveis de gordura, proteína e caseína diminuíram, e a lactose aumentou gradualmente, especialmente em vacas primíparas. A acidez titulável diminuiu nas três primeiras semanas, estabilizando-se na quarta, e a estabilidade ao teste do álcool só atingiu os padrões de comercialização após a quarta semana, indicando que as primeiras semanas de lactação são críticas para a qualidade do leite e sugerindo a necessidade de ajustes na gestão das propriedades para garantir a conformidade com os padrões regulatórios. O segundo estudo, um levantamento retrospectivo de 1.760 amostras de tanques de resfriamento em propriedades leiteiras de Santa Catarina, enfatizou a estabilidade ao teste do álcool como um parâmetro crucial para avaliar a qualidade do leite, conforme a legislação brasileira, que exige uma estabilidade mínima de 72%. Este estudo identificou variações sazonais significativas, com menor estabilidade observada no outono e inverno, e uma relação positiva entre a estabilidade ao teste do álcool e a concentração de lactose, além de concluir que a instabilidade do leite não está necessariamente relacionada a alta acidez ou à saúde das glândulas mamárias. O terceiro estudo avaliou 70 amostras de leite de vacas Jersey, mestiças Holandês x Jersey e Holandês. Nós analisamos a relação entre a composição físico-química e a acidez titulada em um rebanho com histórico de elevada acidez. Os resultados mostraram que a acidez titulada média das amostras estava acima dos valores ideais e que os teores de fósforo estavam associados aos níveis de gordura e proteína, elevando a acidez titulada. Isso sugere que a acidez não deve ser avaliada isoladamente, mas em conjunto com outros parâmetros para uma análise mais completa da qualidade do leite. O estudo destaca a importância de entender as interações entre fatores genéticos, ambientais e dietéticos, recomendando novos estudos para elucidar a elevada acidez titulada em diferentes sistemas de produção de leite.

**Palavras-chaves:** Qualidade do Leite, Propriedades Físico-Químicas do Leite, Leite Instável Não Ácido, Estágio De Lactação.



## ABSTRACT

SCHEID, ANGELICA LETICIA. **Variables influencing alcohol test resistance and titratable acidity: a multivariate approach.** 2024. 128 p. Thesis (Doctoral Thesis in Animal Science - Area: Animal Production) - State University of Santa Catarina. Postgraduate Study in Animal Science, Lages, 2024.

The suitability of milk for industrial processing is influenced by functional characteristics such as stability in the alcohol test and titratable acidity. Therefore, the objective of this study was to identify the main variables related to alcohol test stability and titratable acidity in bovine milk. The study was conducted through three different experiments. The first experiment analyzed the composition and physicochemical parameters of milk during the first five weeks of lactation in 336 cows on six commercial dairy farms. The results showed that milk yield gradually increased, stabilizing by the third week, while fat, protein, and casein levels decreased. Lactose levels gradually increased, especially in primiparous cows. Titratable acidity decreased during the first three weeks, stabilizing in the fourth week. Milk stability in the alcohol test only met commercial standards after the fourth week, indicating that the early weeks of lactation are critical for milk quality and suggesting the need for adjustments in farm management to ensure compliance with regulatory standards. The second experiment, a retrospective survey of 1,760 samples from bulk tanks on dairy farms in Santa Catarina state, emphasized stability in the alcohol test as a crucial parameter for assessing milk quality, in accordance with Brazilian legislation, which requires a minimum stability of 72%. This study identified significant seasonal variations, with lower stability observed in the autumn and winter, and a positive relationship between milk stability in the alcohol test and lactose concentration. We concluded that unstable milk is not necessarily related to high acidity or mammary gland health issues. The third experiment evaluated 70 milk samples from Jersey, Holstein x Jersey crossbred, and Holstein cows. We assessed the relationship between physicochemical composition and titratable acidity in a herd with a history of high titratable acidity. The results showed that the average titratable acidity of the samples was above ideal values. Phosphorus levels were associated with fat and protein levels, contributing to increased titratable acidity. This suggests that acidity should not be assessed in isolation, but rather in conjunction with other parameters for a more comprehensive analysis of milk quality. The study underscores the importance of understanding the interactions between genetic, environmental, and dietary factors, and recommends further research to elucidate the causes of high titratable acidity in different milk production systems.

**Keywords:** Milk quality, physical-chemical properties of milk, unstable non-acid milk, lactation stage.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO II

Figura 1. Localização das propriedades leiteiras.....47

Figura 2. Interações entre ordem de parto e semana para proteína (kg/dia) (A), entre ordem de parto e semana para lactose (%) (B), entre ordem de parto e semana para caseína (%) (C) e ordem de parto e semana para sólidos não gordurosos (°D).....53

### CAPÍTULO III

Figura 1. Análise do Fator 1 e 2 para as variáveis gordura, proteína, lactose, estabilidade ao teste do álcool (álcool), acidez titulável (acidez), logaritmo de base 10 de contagem de células somáticas (CCS) e logaritmo de base 10 de contagem padrão em placa (CPP) relacionadas a qualidade de leite de tanque.....66

Figura 2. Análise do Fator 1 e 3 para as variáveis gordura, proteína, lactose, estabilidade ao teste do álcool (álcool), acidez titulável (acidez), logaritmo de base 10 de contagem de células somáticas (CCS) e logaritmo de base 10 de contagem padrão em placa (CPP) relacionadas a qualidade de leite de tanque.....67

### CAPÍTULO IV

Figura 01. Análise do Fator 1 e 2 para as variáveis dias em lactação (DEL) produção de leite (Produção), estabilidade ao teste do álcool (álcool), acidez titulável (acidez), escore de célula somática no logaritmo de base 2 (ESC\_Log2), fósforo, lactose, proteína e gordura.....81

Figura 02. Análise do Fator 1 e 3 para as variáveis dias em lactação (DEL) produção de leite (Produção), estabilidade ao teste do álcool (álcool), acidez titulável (acidez), escore de célula somática no logaritmo de base 2 (ESC\_Log2), fósforo, lactose, proteína e gordura.....81

Figura 03. Análise de regressão da acidez titulável em função do Fósforo Total do leite.....82

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

Tabela 1. Estatística descritiva das variáveis analisadas nas amostras individuais de leite por vaca.....49

Tabela 2. Média  $\pm$  erro padrão da média e valor de P para a produção, composição, propriedades físico-químicas do leite e escore de células somáticas nas primeiras 5 semanas de lactação.....51

### CAPÍTULO III

Tabela 1. Estatística descritiva do banco de dados das amostras de leite de tanques de resfriamento, com composição do leite, estabilidade ao teste do álcool, acidez titulável, CCS e CPP .....64

Tabela 2. Média dos quadrados mínimos e erro padrão da média para álcool em função de estação em amostras de tanque.....64

Tabela 3. Análise de Fator das variáveis relacionadas à qualidade de leite em amostras de tanque.....65

### CAPÍTULO IV

Tabela 1. Estatística descritiva do banco de dados das amostras individuais de vacas com dados zootécnicos (N = 70) .....79

Tabela 2. Análise de Fator das variáveis relacionadas à qualidade de leite.....80

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>± DP</b>	Estabilidade média
<b>°C</b>	Grau Centígrado
<b>°D</b>	Grau Dornic
<b>°GL</b>	Gay-Lussac
<b>AS</b>	Albumina sérica
<b>AT</b>	Acidez titulável
<b>Ca<sup>++</sup></b>	Íon de cálcio carregado positivamente
<b>CAV/Udesc</b>	Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina
<b>CBT</b>	Contagem bacteriana total
<b>CCS</b>	Contagem de células somáticas
<b>CCS_log10</b>	Logaritmo de base 10 de contagem de células somáticas
<b>CCSD</b>	Contagem diferencial de células somáticas
<b>células/ml</b>	células por mililitro
<b>CMS</b>	Consumo de matéria seca
<b>CPP</b>	Contagem padrão em placas
<b>CPP_log10</b>	Logaritmo de base 10 de contagem padrão em placa
<b>DEL</b>	Dias em lactação
<b>ECS</b>	Escore de células somáticas
<b>ECS_Log2</b>	Escore de células somáticas no logaritmo de base 2
<b>Epagri</b>	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
<b>g</b>	Grama
<b>IC</b>	Índice de crioscópico
<b>IgG</b>	Imunoglobulinas
<b>IN</b>	Instrução Normativa
<b>INs</b>	Instruções normativas
<b>ITU</b>	Índice de temperatura e umidade
<b>Kg</b>	Quilograma
<b>KMO</b>	Kaiser-Meyer-Olkin
<b>LINA</b>	Leite instável não ácido
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura e Pecuária
<b>MG</b>	Minas Gerais
<b>mg</b>	Miligrama
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mol</b>	Molaridade
<b>NADPH</b>	Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
<b>nm</b>	
<b>NUL</b>	Nitrogênio ureico do leite
<b>OP</b>	Ordem de parto
<b>P</b>	Proteína
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PR</b>	Paraná
<b>RIISPOA</b>	Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal
<b>RS</b>	Rio Grande do Sul
<b>SAS</b>	Statistical Analysis System
<b>SC</b>	Santa Catarina

<b>SNG</b>	Sólidos não gordurosos
<b>ST</b>	Sólidos totais
<b>TP</b>	Fósforo Total
<b>UFC</b>	Unidade formadora de colónias
<b>UFRGS</b>	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
<b>UHT</b>	Ultra-alta temperatura / Ultra hgh temperature
<b>UPLs</b>	Unidades produtoras de leite
<b><math>\alpha</math>-CN</b>	$\alpha$ -caseína / alfa-caseína
<b><math>\alpha</math>-LA</b>	$\alpha$ -lactalbumina / alfa-lactalbumina
<b><math>\alpha</math>s-CN</b>	$\alpha$ s-caseína
<b><math>\beta</math>-caseína</b>	Beta-caseína
<b><math>\beta</math>-CN</b>	$\beta$ -caseína / Beta-Caseína
<b><math>\beta</math>-CN</b>	$\beta$ -Caseína
<b><math>\beta</math>-LG</b>	$\beta$ -lactoglobulina / beta-lactoglobulina
<b><math>\gamma</math>-CN</b>	$\gamma$ -caseína
<b><math>\kappa</math>-CN</b>	kappa-caseína / $\kappa$ -caseína

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	14
CAPÍTULO I.....	17
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
1.1 COMPOSIÇÃO DO LEITE .....	17
1.1.1 Gordura.....	18
1.1.2 Proteína.....	19
1.1.2.1 Caseína .....	20
1.1.3 Lactose .....	21
1.1.4 Minerais.....	23
1.1.4.1 Cálcio .....	23
1.1.4.2 Fósforo .....	25
1.1.4.3 Cloretos .....	25
1.1.5 Citratos .....	26
1.2 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE .....	27
1.2.1 Acidez Titulável.....	27
1.2.2 Crioscopia do Leite .....	28
1.2.4 pH.....	33
1.3 CARACTERÍSTICAS HIGIÊNICO-SANITÁRIAS .....	34
1.3.1 Contagem de Células Somáticas.....	34
1.3.2 Contagem Padrão em Placas.....	37
1.3.3 Efeito do Estágio de Lactação na composição e propriedades físico-químicas do leite..	38
.....	38
1.3.4 Parição sazonal .....	41
CAPÍTULO II.....	43
2 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE AO TESTE DO ÁLCOOL E DA ACIDEZ TITULÁVEL DO LEITE E SUA RELAÇÃO COM CONDIÇÕES AMBIENTAIS E FISIOLÓGICAS DE VACAS LEITEIRAS NO INÍCIO DA LACTAÇÃO .....	43
2.1 RESUMO.....	43
2.2 ABSTRACT.....	44
2.3 INTRODUÇÃO .....	45
2.4 MATERIAL E MÉTODOS .....	46

2.4.1 Análise Estatística .....	48
2.5 RESULTADOS .....	49
2.6 DISCUSSÃO .....	53
2.7 CONCLUSÃO .....	57
CAPÍTULO III .....	58
3 ESTABILIDADE DO LEITE AO TESTE DO ÁLCOOL E SUA RELAÇÃO COM OS DEMAIS INDICADORES DE QUALIDADE DO LEITE EM AMOSTRAS DE TANQUES DE RESFRIAMENTO: ANÁLISE DE DADOS DE EXPERIMENTOS.....	58
3.1 RESUMO.....	58
3.2 ABSTRACT.....	59
3.3 INTRODUÇÃO .....	60
3.4 MATERIAL E MÉTODOS .....	61
3.4.1 Descrição do Banco de Dados.....	62
3.4.2 Análise de Dados.....	62
3.5 RESULTADOS .....	63
3.6 DISCUSSÃO .....	67
3.7 CONCLUSÃO .....	71
CAPÍTULO V .....	72
4 ACIDEZ TITULÁVEL ELEVADA EM LEITE .....	72
4.1 RESUMO.....	72
4.2 ABSTRACT.....	73
4.3 INTRODUÇÃO .....	75
4.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	76
4.4.1 Animais .....	76
4.4.2 Coleta e Análise de Amostra de Leite.....	76
4.4.3 Análise de Dados.....	77
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	78
4.7 CONCLUSÃO .....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	85

## INTRODUÇÃO

De acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) Brasil (2017), o leite é definido como o produto derivado da ordenha completa, ininterrupta e higiênica de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas. As propriedades físico-químicas do leite são determinantes não apenas para o seu valor nutritivo, mas também para o processamento industrial e a remuneração do produtor (Müller; Rempel, 2021).

O leite, além de ser um alimento essencial para a nutrição humana, tem grande relevância na estrutura agroindustrial do país, especialmente em estruturas de agricultura familiar, contribuindo para o abastecimento alimentar e a geração de renda. A garantia da qualidade do leite até o produto final é de interesse prioritário para a pesquisa e a indústria, exigindo a aplicação de controles higiênico-sanitários específicos, que garantam a saúde animal, a ausência de resíduos químicos e as condições específicas de obtenção e armazenamento, os quais estão regulamentados nas Instruções Normativas 76 e 77/2018 do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) (Brasil, 2018a). A pesquisa desempenha um papel crucial na análise dos dados de qualidade do leite, permitindo o desenvolvimento de práticas mais eficientes na produção e processamento do mesmo. Conhecer os fatores que influenciam a composição e as propriedades físico-químicas do leite, como genética, nutrição, ambiente e manejo de ordem, é fundamental para a obtenção de um leite que atenda aos requisitos de qualidade.

Dentre os parâmetros físico-químicos avaliados pela indústria para a obtenção do leite, está a estabilidade ao teste do álcool, sendo que o leite deve apresentar estabilidade em uma concentração mínima de 72% de álcool (Brasil, 2018b). Este parâmetro é fundamental para determinar a adequação do leite ao processamento industrial, especialmente em produtos que demandam alta resistência ao tratamento térmico, como o leite UHT (Ultra High Temperature). Leite instável ao álcool é frequentemente rejeitado pelos laticínios devido à instabilidade da caseína, que, quando submetida ao aumento de temperatura durante o processamento, precipita e forma uma película nos trocadores de calor (Silva *et al.*, 2012). Vários fatores afetam a estabilidade do leite, incluindo fatores nutricionais (Schmidt; 2014; Stumpf *et al.* (2013), estágio de lactação (Barbosa *et al.*, 2009) estresse térmico (Abreu *et al.*, 2020), grupamento genético (Schimitz *et al.*, 2024). Em amostras de leite com baixa estabilidade ao teste do álcool algumas alterações na composição do leite têm sido observadas, tais como aumento da



concentração de cálcio ionizado e diminuição no teor de lactose (Martins *et al.*, 2024; Stumpf *et al.*, 2013).

Denomina-se leite instável não ácido (LINA) a perda da estabilidade do leite ao teste do álcool sem apresentar acidez titulável acima de 18°D, e potencial hidrogeniônico (pH), acima de 6,6 (Zanela *et al.*, 2006). Essa síndrome tem causado perdas econômicas significativas para o produtor e para a indústria, gerando insegurança entre produtores e técnicos quanto às medidas necessárias para prevenir ou corrigir essas não conformidades. Estudos recentes descrevem a ocorrência de LINA em propriedades comerciais e os desafios enfrentados tanto no campo quanto na indústria (Fischer *et al.*, 2012a; Manske *et al.*, 2020; Zanela; Ribeiro, 2018).

Outro atributo físico-químico importante é a acidez titulável, sendo que no leite cru refrigerado deve estar dentro da faixa de 0,14 a 0,18 gramas de ácido lático por 100 ml para ser aceito e processado (Brasil, 2018b). Esta análise tem sido historicamente utilizada como um indicador de degradação da lactose por bactérias, resultante de condições inadequadas de higiene na obtenção do leite, armazenamento em temperaturas elevadas ou longos períodos de estocagem. No entanto, a acidez total do leite é resultante tanto da acidez natural, quanto da acidez adquirida, sendo a acidez natural predominantemente atribuída a seus componentes intrínsecos, tais como íons fosfato, caseína, íons citrato e dióxido de carbono (Vidal; Saran Netto, 2018). Diversos fatores podem influenciar essa acidez titulável, incluindo o estágio de lactação, o número de lactações, e condições como inflamações e infecções na glândula mamária, que alteram a composição do leite (Lai *et al.*, 2016). Além disso, o estresse térmico afeta significativamente a acidez titulável, interferindo no metabolismo do animal e na estabilidade do leite (Abreu *et al.*, 2020).

Durante a lactação, a composição e as propriedades físico-químicas do leite variam significativamente, refletindo a complexidade do processo produtivo. Inicialmente, há um aumento dos sólidos não gordurosos (SNG), que diminuem a partir do segundo mês, enquanto os níveis de lactose atingem seu pico na metade da lactação e reduzem posteriormente. Em contrapartida, os teores de gordura e proteína diminuem no início da lactação, até o pico de lactação, e aumentam progressivamente ao longo do período (Harris; Bachman, 2003; Noro *et al.*, 2006; Santos; Fonseca, 2019). Nas fases iniciais da lactação, tanto o pH, quanto a estabilidade ao teste do álcool são reduzidas, enquanto a acidez titulável é aumentada, atingindo níveis normais conforme a lactação progride (Tsioulpas; Lewis; Grandison, 2007).

A adoção de novos modelos de produção, como a parição estacional, visando sincronizar o pico de produção das vacas com a máxima disponibilidade de forragem, pode contribuir para

a sustentabilidade e aumento da rentabilidade na atividade leiteira. No entanto, essa concentração de partos pode resultar em problemas de não conformidade no leite do tanque, principalmente no início da lactação, devido a alterações nas propriedades físico-químicas do leite. Esse cenário evidencia a necessidade de identificar até que estágio da lactação ocorrem alterações fisiológicas em vacas primíparas e multíparas, bem como de compreender as variáveis fisiológicas relacionadas às propriedades físicas e químicas do leite. Estudos anteriores descrevem a estabilidade do leite e suas variações durante o estágio de lactação (Barbosa *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2012). Recentemente Schmitz *et al.* (2024) avaliaram a estabilidade ao longo da lactação das vacas, diferenciando os primeiros 60 dias dos demais períodos de lactação, porém estudos que permitam a comparação entre as primeiras semanas de lactação ainda não estão disponíveis.

Finalmente, destaca-se que a legislação vigente estabelece padrões uniformes de qualidade para todo o leite, independentemente de seu destino final. Assim sendo, é fundamental o desenvolvimento e aprimoramento de pesquisas que proporcionem a compreensão dos problemas, e que possam ser utilizadas para encontrar soluções viáveis e eficazes quanto a adequação da cadeia produtiva e ao melhoramento da qualidade do leite, de modo a minimizar os prejuízos decorrentes de possíveis não conformidades. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi identificar as principais variáveis relacionadas à estabilidade ao teste do álcool e acidez titulável do leite bovino. Com este objetivo foram conduzidos três estudos, sendo um deles a avaliação da resistência ao teste do álcool e a acidez titulável nas primeiras semanas de lactação, uma análise conjunta de experimentos com dados sobre a estabilidade ao teste do álcool e outros indicadores de qualidade do leite e um terceiro estudo sobre variáveis relacionadas a elevada acidez do leite em amostras de vacas individuais.

## CAPÍTULO I

### 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 1.1 COMPOSIÇÃO DO LEITE

As melhorias na cadeia produtiva do leite são essenciais, dadas à modernização tecnológica, à crescente complexidade das exigências legais, aos avanços nas pesquisas e à crescente preocupação dos consumidores com a qualidade dos alimentos. Esses elementos têm impulsionado progressos significativos no setor, algo crucial ao se considerar a relevância da produção de leite no cenário do agronegócio brasileiro (Oliveira Filho; *et al.*, 2014).

A qualidade do leite é determinada pelas suas propriedades físico-químicas (estabilidade ao alizarol, acidez titulável, densidade relativa, índice crioscópico), de composição (gordura, proteína, extrato seco desengordurado) e por padrões higiênico-sanitários (contagem padrão em placa, contagem de células somáticas, detecção de resíduos de antibióticos).

Os parâmetros higiênico-sanitários refletem a saúde dos animais, com ênfase na mastite, ausência de resíduos químicos e as condições de obtenção e armazenamento do leite, aspectos cruciais para a saúde humana. Por essa razão, o leite está sujeito a uma extensa gama de análises, visando cumprir as regulamentações vigentes, que incluem a avaliação de propriedades físico-químicas e sensoriais, como coloração branca e opaca, consistência homogênea, textura suave, ausência de grumos ou filamentos, odor suave e sabor levemente adocicado (Brito; Brito, 2000). Além disso, os produtores são obrigados a atender a critérios como contagem de células somáticas CCS inferior a 500 mil células por ml de leite e contagem padrão em placas (CPP) inferior a 300 mil unidades formadoras de colônias por ml de leite (Brasil, 2018b).

No ano de 2018, através das Instruções Normativas (INs) 76 e 77, o MAPA estabeleceu uma série de critérios a serem seguidos pelas unidades produtoras de leite (UPLs) e indústrias. Essas INs definiram valores máximos e mínimos para os componentes do leite (composição) e propriedades físico-químicas do leite, além de estabelecer normas visando atender esses valores (Brasil, 2002). Contudo, é importante observar que esses parâmetros, especialmente as propriedades físico-químicas do leite, são influenciados por diversos fatores, como condições ambientais, aspectos nutricionais e processos fisiológicos.

Os principais componentes do leite em termos quantitativos são a gordura, proteína e lactose. Atualmente, os programas de melhoramento genético têm priorizado o aumento da produção dos sólidos presentes no leite, especialmente a gordura e a proteína, observando-se

um aumento significativo desses componentes nas últimas décadas (Norman; Walton; Dürr, 2017).

### 1.1.1 Gordura

O teor mínimo de gordura, estipulado pela IN 76/2018 do MAPA, é de 3,0g/100g (Brasil, 2018b). Esse valor não representa um desafio significativo na maioria das propriedades leiteiras do país, dado que os rebanhos não apresentam uma produção de leite tão elevada, uma vez que a concentração de gordura apresenta correlação genética e fenotípica negativa com a produção individual por vaca (Linhares; Landin; Ribeiro, 2021). Segundo o Observatório Brasileiro de Qualidade do Leite do MAPA (Brasil, 2024), os teores de gordura do leite no Brasil têm se mantido extremamente estáveis na última década, com média de aproximadamente 3,70%. No entanto, é importante destacar que o teor de gordura é amplamente influenciado pela genética, nutrição e pelo manejo alimentar dos animais, dentre outros fatores (Thaler Neto *et al.*, 2017), os quais fazem com que a gordura seja o componente que mais sofre variação na sua concentração, sendo que a produção de leite com teor adequado de gordura possa ser um desafio em determinadas situações, tais como em propriedades leiteiras com vacas de alta produção, com dietas que utilizam elevada quantidade de carboidratos altamente fermentáveis.

O estresse causado pelo calor é um fator adicional que leva à redução nos teores de gordura. De acordo com Bertocchi *et al.* (2014), vacas expostas a um Índice de Temperatura e Umidade (ITU) de 71 a 72 começaram a apresentar reduções significativas nos teores de gordura. Em um estudo realizado por Bertocchi *et al.* (2014), que analisou 508.613 amostras de leite e conjuntos de tanques provenientes de 3.328 propriedades no norte da Itália durante o período de 2003 a 2009, foi observada uma redução média de 0,3% no teor de gordura do leite no verão em comparação com o inverno ( $P=0,001$ ). Além disso, Bernabucci *et al.* (2015) observaram teores de gordura de 3,2% durante o verão e 3,8% durante o inverno, evidenciando uma redução de 15,8% no teor de gordura no leite de vacas Holandesas que estavam no meio da lactação ( $\pm 125$  dias) submetidas a um ITU médio diário  $<75$  para cerca de 50% dos dias de verão investigados, e  $<72$  para apenas 2 a 3 dias.

O teor de gordura exhibe uma variação natural ao longo da lactação, estando fortemente correlacionados aos teores de proteína. Vacas em estágios avançados de lactação apresentam maiores concentrações de gordura e proteína, o que está associado a uma menor produção de leite nessa fase, concentrando assim os teores desses componentes (Kappes *et al.*, 2020). No

pico da lactação, os teores de gordura e proteína são mais baixos em comparação com o início e o final da lactação (Yoon *et al.*, 2004). Essa variação pode ser uma preocupação em propriedades que concentram um maior número de partos em um período específico.

### 1.1.2 Proteína

As proteínas do leite são classificadas em três grandes grupos: caseína,  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactoalbumina. No leite bovino, as caseínas ( $\alpha$ S1,  $\alpha$ S2,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseína) constituem aproximadamente 80% do conteúdo total de proteína, enquanto as proteínas do soro de leite, principalmente  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -LA),  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG) e albumina sérica, representam a parcela restante (Tacoma *et al.*, 2016).

As raças que apresentam maior teor de proteína no leite incluem Jersey, Suíço Leiteiro, Guernsey e Ayrshire, enquanto a raça Holandesa tende a exibir menores teores em comparação com as outras (Diaz González; Dûrr; Fontaneli, 2001). No entanto, em termos de volume de leite produzido, a raça Holandesa se destaca, gerando uma quantidade superior (em g/dia ou kg/lactação) em comparação com as demais raças, uma vez que essa relação está diretamente ligada ao volume total de leite produzido (Thaler Neto *et al.*, 2017). Além da genética, Franzoi *et al.* (2019) observam que as frações de proteína são influenciadas principalmente pelos dias em lactação (DEL), nutrição, saúde, ordem de parto (OP), ambiente e práticas de manejo.

Assim como ocorre com o teor de gordura, vacas em estágios mais avançados de lactação geralmente apresentam maiores teores de proteína, essa variação ao longo da lactação pode ser atribuída à concentração desses componentes quando a produção de leite é menor (Kappes *et al.*, 2020). O oposto pode ser observado no pico de produção, quando os teores de gordura e proteína tendem a diminuir (Noro *et al.*, 2006). Outro fator crucial que influencia o teor de proteína do leite é a dieta. Vacas alimentadas com dietas ricas em carboidratos não fibrosos tendem a produzir leite com maiores teores de proteína (Negrão *et al.*, 2024). Schmidt (2014) observou que a composição química e a quantidade de proteínas são influenciadas pela dieta do animal, e a síntese da produção de proteína na glândula mamária é afetada por variações no fornecimento de aminoácidos e de nutrientes produtores de energia que são absorvidos pelo trato gastrointestinal. Em resumo, a produção de proteína do leite é determinada pelo fornecimento dietético de energia, constituintes e proteínas.

A CCS, embora possa influenciar o perfil de proteínas no leite, geralmente não resulta em reduções significativas no teor total de proteína. Alguns estudos não observaram uma relação clara entre CCS elevada e os teores de proteína (Kappes *et al.*, 2020; Regina *et al.*,

2016; Tomazi *et al.*, 2015), enquanto que outros relataram um aumento (Noro *et al.*, 2006). Parte dessa manutenção nos teores totais de proteína, ou até mesmo aumento da mesma, pode ser atribuída à passagem de proteínas plasmáticas séricas para o leite devido ao aumento da permeabilidade vascular (Urech; Puhán; Schällibaum, 1999).

O estresse térmico está associado à redução nos teores de proteína do leite, em parte devido à diminuição no consumo de matéria seca (CMS) e ao aumento do catabolismo muscular, resultando em concentrações elevadas de nitrogênio ureico plasmático. Isso favorece uma maior redistribuição do nitrogênio proteico para ureia (Wheelock *et al.*, 2010), diminuindo a capacidade de síntese proteica nas células mamárias e, conseqüentemente, reduzindo os teores de caseína (Bernabucci *et al.*, 2002).

Bertocchi *et al.* (2014) analisando 508.613 amostras de leite de tanques, coletadas em 3.328 propriedades no norte da Itália, observaram um teor menor de proteína ( $P=0,0003$ ) durante o verão (3,32%) em comparação com a primavera (3,38%), inverno (3,46%) e outono (3,47%). Bertocchi *et al.* (2014), também observaram reduções nos teores de proteína variando de -0,02% a -0,10% quando o ITU ultrapassou 65 a 71, bem como reduções na produção de proteína de -0,01 kg/dia a -0,07 kg/dia quando o ITU ultrapassou 72 a 73. Hauser *et al.* (2023) utilizaram dois tratamentos: no primeiro, as vacas tiveram acesso a sistemas de aspersão e ventilação, visando mitigar os efeitos do estresse térmico; no segundo, esses recursos não foram disponibilizados. Os autores observaram uma maior concentração de proteína no tratamento que incorporou a aspersão e ventilação.

### 1.1.2.1 Caseína

As caseínas constituem as principais proteínas do leite, representando aproximadamente 80% das proteínas totais. Elas são divididas em quatro grupos principais:  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ - e  $\kappa$ -caseína. Essas caseínas, em sua grande maioria, estão presentes no leite na forma de partículas coloidais conhecidas como micelas. As  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -, e beta-caseína ( $\beta$ -caseína) estão localizadas na parte interna da micela de caseína, junto com nanopartículas de fosfato de cálcio coloidal, enquanto a kappa-caseína ( $\kappa$ -CN) está predominantemente na superfície da micela, desempenhando um papel crucial na estabilidade micelar (Brasil; Nicolau; da Silva, 2015).

As caseínas desempenham um papel fundamental no processo de fabricação de queijo, sendo os únicos constituintes do leite que reagem ao coalho. Elas são as principais responsáveis pelas propriedades de coagulação e rendimento do leite, retendo também outros componentes

e água no complexo de caseinato (Visentin *et al.*, 2017). As frações de caseína exercem influência nas propriedades de coagulação do leite, e em particular, as proporções de  $\kappa$ -CN e  $\alpha$ -caseína ( $\alpha$ -CN) têm efeitos positivos na formação da coalhada, no tempo de endurecimento e na firmeza da mesma (Jõudu *et al.*, 2008).

As micelas de caseína conferem estabilidade térmica ao leite, permitindo que a indústria realize tratamentos térmicos. No entanto, a estrutura e a estabilidade das micelas de caseína podem ser afetadas por diversos fatores, incluindo temperatura, tratamento térmico, pH, hidrólise enzimática da  $\kappa$ -CN, excesso de íon de cálcio carregado positivamente, secagem, forças de filtração, redução da atividade de água, absorção em superfícies, e adição de álcool, outros solventes pobres, ou polifenóis (Brasil; Nicolau; Da Silva, 2015; Holt, 2016).

A estabilidade das micelas de caseína é um processo dinâmico, influenciado por fatores como temperatura e força iônica, os quais afetam o tamanho, o arranjo e a estrutura tridimensional das micelas. A refrigeração lenta do leite provoca a desestabilização das micelas de caseína, resultando inicialmente na formação de flocos. Esse fenômeno ocorre devido a um leve aumento no pH e ao incremento nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  no soro (Töpel, 2015)

### 1.1.3 Lactose

Outro componente crucial do leite é a lactose, com um teor mínimo exigido no Brasil de 4,3g/100g, conforme estabelecido pela IN 76/2018 do MAPA (Brasil, 2018b). A lactose desempenha um papel determinante na osmolaridade do leite, sendo responsável por cerca de 50% da pressão osmótica do leite (Jamali *et al.*, 2018) Além disso, desempenha um papel importante em outras propriedades coligativas do leite, como o abaixamento do ponto crioscópico e a elevação do ponto de ebulição (Thaler Neto *et al.*, 2017).

Embora a lactose seja frequentemente considerada um componente do leite com pouca variação, trabalhos recentes têm destacado variações significativas nos teores de lactose. Um dos fatores que contribui para a redução nos teores de lactose é o nível de ingestão energética da dieta, que representa a principal fonte para a síntese de lactose no leite. Em um estudo realizado no Estado de Santa Catarina, Alessio *et al.* (2016) observaram que no outono, os teores de lactose foram menores em comparação com a primavera. Os autores atribuíram essa descoberta a deficiências nutricionais causadas pelo vazio forrageiro no outono, resultando em um déficit qualitativo e quantitativo de forrageiras. Por outro lado, durante a primavera, há uma maior disponibilidade de pastagens de alta qualidade, especialmente aveia (*Avena spp.*) e azevém (*Lolium multiflorum*). Arruda Junior *et al.* (2019) analisaram um grande banco de dados

e também durante o outono observaram que níveis baixos de extrato seco desengordurado estão associados à redução do teor de lactose.

Em um estudo realizado no Rio Grande do Sul, Noro *et al.* (2006) que avaliou 259 rebanhos leiteiros, também observaram teores mais altos de lactose no mês de agosto (4,6%) e menores no mês de março (4,46%), resultado semelhante aos encontrados por Alessio *et al.* (2016) e Arruda Junior *et al.* (2019). Essas variações nos teores de lactose estão associadas às condições nutricionais e à disponibilidade sazonal de forragens de qualidade.

Wheelock *et al.* (2010) observaram reduções nos teores de lactose em situações de estresse térmico (4,71%), em comparação com o mesmo animal em condições de termoneutralidade (4,90%,  $P < 0,05$ ). Kappes *et al.* (2022) também observaram reduções nos teores de lactose conforme aumentava a intensidade do ITU. Na classe considerada segura, ou seja, ausência de estresse térmico, o teor médio observado foi de 4,69%, enquanto na classe de perigo foi de 4,59% ( $P < 0,05$ ). Em parte, essa diminuição nos teores de lactose pode ser explicada pela redução no CMS que ocorre durante períodos de estresse térmico. Por outro lado, Bernabucci *et al.* (2010); Hauser *et al.* (2023) observaram redução no CMS e redução na produção de leite em vacas submetidas a estresse térmico, porém sem redução significativa no teor de lactose. Bernabucci *et al.* (2015) também não observaram redução no teor de lactose nas estações mais quentes do ano. Essa variabilidade pode ser atribuída a diferentes condições ambientais, sistemas de manejo e resposta individual dos animais ao estresse térmico.

A CCS é outro fator de grande impacto nos teores de lactose. Alessio *et al.* (2016) observaram uma relação negativa na análise fatorial entre os teores de lactose e a CCS, indicando que quanto maior a CCS, menores são os teores de lactose. Nesse contexto, a maior paridade das vacas ( $> 2,5$ ) foi associada a menores teores de lactose (4,19%), mesmo em animais saudáveis ( $< 200.000$  células/ml). Esse efeito foi relacionado à disponibilidade de glicose endógena, uma vez que as vacas primíparas ainda não atingiram seu pleno potencial produtivo, demandando uma menor proporção de glicose corporal em comparação com vacas múltíparas de alta produção. Nessas, a glicose disponível atua como substrato principal para a síntese de lactose (Qiao *et al.*, 2005a).

Em um estudo realizado em uma propriedade com confinamento em sistema *compost barn*, Kappes *et al.* (2020) encontraram uma relação semelhante, onde vacas com maior paridade apresentaram teores de lactose mais baixos. Em um estudo com 154.78 amostras de tanque de leite no Estado de Santa Catarina, Alessio *et al.* (2021) observaram a redução do teor de lactose tanto nos casos de aumento na CCS, quanto da CPP. A redução nos teores de lactose no leite associada à elevada CCS ocorre devido à diminuição na quantidade de células epiteliais



secretoras de lactose e também à passagem desta para a corrente sanguínea pelo aumento da permeabilidade vascular (Stelwagen *et al.*, 1998)

Noro *et al.* (2006) também observaram reduções nos teores de lactose conforme aumentava o escore de células somáticas (ECS). Além disso, conforme a lactação avança, ocorrem reduções nos teores de lactose, sendo que os maiores teores são observados até os 60 dias. Amostras de leite de tanque em Santa Catarina, Alessio *et al.* (2021) também demonstraram que uma elevada CCS, assim como a CPP, contribuem significativamente para a redução dos teores de lactose.

#### **1.1.4 Minerais**

O leite é composto por aproximadamente 30 minerais distintos, embora apenas alguns estejam presentes em concentrações relativamente altas, sendo o cálcio e o fósforo os minerais mais predominantes. As micelas de caseína desempenham um papel crucial, sendo as principais transportadoras de cálcio e fósforo no leite. Outros minerais significativos presentes no leite incluem sódio, cloro e potássio (Kindstedt, 2005)

Os minerais são componentes fundamentais na composição do leite e estão presentes em duas formas principais: solúvel e coloidal. Os minerais solúveis encontram-se em um equilíbrio altamente dinâmico entre formas iônicas e associadas, principalmente representadas por sais de citrato, fosfato, sulfato e cloreto (Fox *et al.*, 2015)

O equilíbrio dos íons desempenha um papel crucial na estabilidade do leite, sendo os principais íons influenciadores: o cálcio, fosfatos e citratos, presentes tanto na fase solúvel quanto na coloidal. O cálcio, por exemplo, pode existir na forma solúvel (em sua forma iônica) e coloidal, ligado ao citrato, fósforo ou proteínas, como discutido por (Santos, 2004)

##### **1.1.4.1 Cálcio**

No leite bovino, o cálcio iônico existe em três formas: solúvel, iônica e coloidal. Cerca de 70% do cálcio está presente na fase coloidal, onde se liga às micelas de caseína como fosfato de cálcio, enquanto os 30% restantes estão na forma de íons livres e solúveis, predominantemente associados a citratos e fosfatos (Lewis, 2011).

O cálcio é um dos minerais mais importantes no leite. Na fase aquosa, o cálcio está presente na forma iônica, e está associado com citrato e fosfato inorgânico para formar citrato de cálcio e fosfato de cálcio, respectivamente. Na fase micelar, o cálcio liga-se a moléculas de

caseína e fosfato inorgânico (isto é, fosfato de cálcio coloidal). A presença de aglomerados de fosfato de cálcio nas micelas é essencial para a estrutura das partículas de proteína e à sua funcionalidade tecnológica (Stocco *et al.*, 2021)

O cálcio constitui aproximadamente 30% do total de minerais presentes no leite. Cerca de 30% do cálcio total é solúvel, sendo que 20% desse cálcio solúvel está ligado ao citrato e 10% está associado a outros íons. Os dois terços restantes do cálcio estão associados às micelas de caseína na forma de fosfato de cálcio coloidal (Kindstedt, 2005)

As micelas de caseína servem como principal transportador de cálcio. O teor de cálcio iônico é um dos principais componentes que influenciam na estabilidade do leite, afetando tanto a estabilidade térmica quanto o resultado do teste do álcool, pois impacta na capacidade de manter a estrutura micelar da caseína (Hebishy *et al.*, 2019). De acordo com Martins *et al.* (2024) cada incremento unitário na concentração de cálcio iônico eleva em 1.014 vezes a probabilidade de ocorrência de LINA em teste com álcool a 72%, enquanto cada incremento unitário na concentração de lactose reduz essa probabilidade em 0,002 vezes ( $P < 0,05$ ). Os autores sugerem que fatores relacionados ao manejo nutricional e ambiental podem influenciar o aumento dos níveis de cálcio iônico. Outros fatores podem afetar o teor de cálcio iônico, incluindo a temperatura do leite, adição ou remoção de cálcio e o tempo de armazenamento. O pH do leite é talvez o fator que mais influencia a concentração de cálcio iônico, pois os dois são inversamente proporcionais (Tsioulpas *et al.*, 2010). Barbosa *et al.* (2009) relatam que a estabilidade ao álcool afetou os valores de cálcio iônico e o pH do leite, mas não influenciou os valores de acidez titulável, gordura, proteína, sólidos totais (ST) e sólidos totais desengordurados. No que diz respeito à LINA, este apresentou maior valor de cálcio iônico, porém menor valor de pH que o leite estável.

Nos estudos realizados por Barros *et al.* (1999); Chavez *et al.* (2004) e Tsioulpas; Lewis; Grandison (2007) que compararam amostras de leite positivas ou negativas no teste do álcool a 76°GL, foram encontrados valores médios de cálcio iônico mais elevados nas amostras positivas. Esses resultados indicam que teores mais altos de cálcio iônico no leite estão associados a uma menor estabilidade.

Normalmente as caseínas se encontram com cargas negativas e essas cargas são parcialmente neutralizadas pelo cálcio. Porém quando ocorre um aumento nos íons de cálcio solúvel aumenta o cálcio coloidal, reduzindo a carga negativa da caseína, aumentando o risco de coagulação do leite (Horne; Parker, 1981). O aumento dos sais de cálcio no leite diminui a solubilidade das proteínas em água (Oliveira; Timm, 2007)

#### 1.1.4.2 Fósforo

O cálcio e o fósforo são constituintes essenciais para as micelas de caseína (Holt; Dalglish; Jenness, 1981). O fósforo compõe aproximadamente 15% do total de minerais no leite, sendo que cerca de 50% desse fósforo está associado às micelas de caseína (Kindstedt, 2005). Mariani *et al.* (2022) relataram que o teor médio de fósforo para vacas da raça Holandesa no período de 3 e 7 meses em lactação foi de 0,896 g/L. Tsioulpas; Lewis; Grandison (2007) reportou um teor de fósforo de 84 mg/100g, enquanto que (Formaggioni *et al.*, 2001a) reportaram teores variando de 85,0 a 90,8 mg/100g. O elevado teor de proteínas e minerais pode tornar o leite inadequado para certas operações de processamento de alimentos, como o tratamento UHT ou a produção de leite em pó, e pode ser incompatível com os regulamentos relativos à composição do leite para processamento (Tsioulpas; Lewis; Grandison, 2007)

O fósforo tem o efeito básico de manter a estrutura micelar da caseína, sua concentração é afetada pelo pH, em ambientes mais ácidos o fósforo passa à fase solúvel gerando uma desestabilidade no leite (Holt *et al.*, 2013). O teor de fósforo do leite apresenta correlação positiva com a estabilidade do leite ao teste do álcool, porém o teor de fósforo é inversamente proporcional ao cálcio iônico no leite, ou seja, quando aumenta o fósforo diminui o cálcio iônico aumentando a estabilidade do leite (Mc Sweeney; O Mahony, 2016; Santos, 2004). O fósforo também se liga ao cálcio podendo melhorar a estabilidade do leite, porém em tratamentos térmicos o aquecimento do leite leva ao deslocamento do cálcio solúvel para a fase coloidal, o que leva à precipitação do fósforo por sua baixa solubilidade a altas temperaturas. Formaggioni *et al.* (2001) descrevem que o leite “hipoácido” apresentou menos caseína e menos fósforo em comparação com o leite caracterizado por acidez titulável normal. O leite com acidez média-alta foi o mais rico em fósforo.

#### 1.1.4.3 Cloretos

A análise do teor de cloretos no leite é amplamente utilizada para detectar fraudes associadas à sua adição. Entretanto, é fundamental considerar que variações fisiológicas na concentração de cloretos podem ocorrer em função de fatores individuais dos animais, como nutrição, OP, estágio de lactação e sazonalidade. Esses fatores devem ser levados em consideração para evitar falsos positivos (Raimondo *et al.*, 2009). Além disso, como observado por Arruda Junior (2018), um resultado positivo para cloretos nem sempre é indicativo de

fraude. Em muitos casos, pode apenas refletir uma concentração de cloretos acima do normal, que, em animais saudáveis, varia entre 0,08% e 0,1%.

O aumento no teor de cloreto no leite, está positivamente correlacionado com a inflamação do úbere e a CCS. Em outras palavras, o leite de vacas com mastite clínica ou subclínica pode apresentar um aumento na concentração de cloretos. Portanto, o teor de cloretos no leite pode ser utilizado como um indicativo para auxiliar no diagnóstico de mastite subclínica (Ferrero; Valledor; Campo, 2014). A elevação na concentração de cloretos entre 30% e 100% pode ser observada em vacas expostas a temperaturas de 29 a 32°C. Nessas condições, o aumento dos níveis de cloretos ocorre como uma compensação para a redução na concentração de lactose. Essa variação na proporção entre cloretos e lactose atua como um mecanismo fisiológico essencial para manter a pressão osmótica na glândula mamária (Ferrero; Valledor; Campo, 2014). Danieli (2024) também encontrou um aumento de cloretos (g/L) em amostras de animais com CCS elevada sendo  $0,922 \pm 0,02$  para alta CCS e  $0,855 \pm 0,02$  para baixa CCS ( $P = 0,0121$ ).

Estudo realizado por (Raimondo *et al.*, 2009) identificou variações na concentração de cloretos durante diferentes estágios da lactação em vacas Jersey. A pesquisa demonstrou que os níveis de cloretos atingem seu pico no período colostrar, com valores de  $1,54 \pm 0,29$  g/L a partir de 12 horas após o parto, seguidos por uma diminuição significativa que persiste até 30 dias de lactação.

### 1.1.5 Citratos

O citrato é um intermediário do ciclo de Krebs, participando do metabolismo energético celular. Entretanto, o epitélio mamário é impermeável ao citrato, de forma que a concentração de citrato no leite reflete mais a atividade mamária, do que o metabolismo geral. O citrato desempenha função indireta na síntese de gordura do leite, provendo equivalentes redutores na forma de Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina (NADPH), que são requeridos para a síntese de novo de ácidos graxos. A concentração de citrato no leite é inversamente proporcional à relação entre a concentração de ácidos graxos de síntese de novo (C4-14) e ácidos graxos pré-formados (C18-20) (Garnsworthy *et al.*, 2006; Corrêa *et al.*, 2010).

Garnsworthy *et al.* (2006) observaram níveis mais altos de citrato no início da lactação em comparação com a lactação média e final, o que foi considerado independente da produção de leite ou dieta. O fator determinante tanto para a cetogênese, quanto para a formação do citrato

é o oxalacetato, de modo que quanto menor a produção de leite, maior a disponibilidade de oxalacetato para a produção de citrato (Corrêa *et al.*, 2010).

Do nível de citrato no leite cerca de 89% estão presentes na forma de citrato solúvel, enquanto o restante está ligado às micelas de caseína (Holt; Dalgleish; Jenness, 1981). O citrato solúvel tem a capacidade de formar complexos, principalmente com o cálcio, que atua como um dos principais sais tamponantes no leite (Faulkner; Peaker, 1982).

A alimentação dos animais é um dos principais fatores que afetam o teor de citrato, sendo os volumosos as principais fontes desse componente. Portanto, vacas que consomem dietas com baixa quantidade de volumoso podem apresentar menor produção de citrato (Fox *et al.*, 2015). O citrato contribui para aumentar a estabilidade do leite, o que pode ser observado tanto através do teste do álcool quanto pelo tempo de coagulação. Sua característica principal é a capacidade de sequestrar o cálcio livre, reduzindo seu efeito sobre a micela de caseína (Gaur; Schalk; Anema, 2018) e consequentemente podendo influenciar a estabilidade térmica do leite.

Os citratos presentes no leite são cruciais para a estabilidade térmica, particularmente durante a pasteurização e o tratamento UHT. A estabilidade térmica do leite, que se refere à resistência das proteínas à coagulação sob condições de aquecimento, é significativamente influenciada pelos citratos. Esses sais do ácido cítrico desempenham um papel vital ao complexar íons de cálcio e atuar como agentes tamponantes, contribuindo assim para a manutenção da integridade proteica durante o processamento térmico (Akkerman *et al.*, 2019).

A adição de citrato e fosforo até um ponto aumenta a estabilidade do leite pela possibilidade desses íons virem a sequestrar o cálcio iônico, por isso existe a adição de citrato e fósforo no leite evaporado e UHT, conferindo maior estabilidade térmica ao leite e permitindo que este atinja elevadas temperaturas de processamento (Silva, 2011).

## 1.2 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE

### 1.2.1 Acidez Titulável

A acidez titulável é uma medida utilizada para avaliar a qualidade do leite e é expressa em graus Dornic (°D) ou em porcentagem (%) de ácido láctico. No Brasil, segundo a IN 76/2018 do MAPA, estão estabelecidos limites de 14 a 18°D para o leite cru refrigerado (Brasil, 2018d). A acidez titulável mensura componentes que exercem alguma capacidade tamponante, além do ácido láctico, incluindo proteínas, fosfatos, citratos e dióxido de carbono (Tsioulpas; Lewis; Grandison, 2007). Valores de acidez titulável acima de 18°D indicam elevadas concentrações

de ácido láctico no leite, sugerindo contaminação bacteriana devido à má higienização dos equipamentos ou conservação inadequada do leite (De Vargas *et al.*, 2019). Por outro lado, uma baixa acidez titulável pode ser considerada uma fraude, indicando possivelmente adição de água para aumentar o rendimento do leite. Santos *et al.* (2011) ou ainda relacionar-se a elevadas contagens de células somáticas e baixa concentração de lactose Arruda Junior (2018). Diversos fatores podem influenciar a acidez titulável, incluindo estágio de lactação, número de lactação, processos inflamatórios e infecciosos da glândula mamária, bem como estresse térmico (Lai *et al.*, 2016).

No início da lactação, é comum observar maior acidez titulável do leite devido às concentrações mais elevadas de proteínas ricas em grupos de fosfatos, citratos, caseínas e albuminas, conferindo maior acidez ao leite. Tsioulpas; Lewis; Grandison (2007), ao avaliarem o leite de vacas no estágio inicial da lactação, determinaram uma acidez titulável, expressa em teor de ácido láctico, de 0,202% e 0,142% (equivalente a 20,2 e 14,2°D), aos 5 e 30 dias pós-parto, respectivamente.

O estresse térmico também pode afetar significativamente a acidez titulável, como observado por Abreu *et al.* (2020), que identificaram um aumento na acidez titulável do leite em vacas sem acesso à sombra em comparação com vacas que tinham acesso à sombra. Essa relação foi observada em relação ao período anterior, quando as vacas tinham acesso à sombra. Por outro lado Arruda Junior (2018), observou que o aumento do ITU estava associado a uma maior porcentagem de tanques isotérmicos com acidez titulável abaixo de 14°D, sendo as maiores ocorrências de baixa acidez titulável registradas no verão. Além disso, o autor observou uma associação da baixa acidez titulável com maior índice crioscópico, menor teor de lactose e menor CMS. No contexto de dados mais amplos, o autor constatou que a baixa acidez titulável estava associada a uma elevada CCS, tanto no leite individual de vacas quanto no leite conjunto de tanques. Esses achados destacam a complexidade da acidez titulável como indicador de qualidade do leite, sendo influenciada por diversos fatores, desde condições ambientais até características individuais dos animais.

### **1.2.2 Crioscopia do Leite**

Outra análise crucial para garantir a qualidade do leite é a depressão do ponto de congelamento, também chamado de índice de crioscópico (IC), que corresponde ao ponto de congelamento do leite e é relativamente constante como consequência do equilíbrio osmótico no leite e no sangue (Henno *et al.*, 2008)

O IC é determinado principalmente pelas substâncias que estão em solução no leite. A lactose e íons dissolvidos respondem por cerca de 80% da diminuição do IC e o nitrogênio não proteico, principalmente ureia, ácidos graxos de cadeia curta e gás carbônico são responsáveis por cerca de 20% (Thaler Neto *et al.*, 2017).

A legislação vigente determina que o valor do IC do leite deve variar entre  $-0,530^{\circ}\text{C}$  a  $-0,555^{\circ}\text{C}$  (Brasil, 2018). Este parâmetro fornece uma maneira de testar adulterações de leite. A fraude do leite é comum, e na maioria dos casos está relacionada à adição de água, o que altera o índice de crioscopia (Giombelli *et al.*, 2011). IC mais negativos que o limite estabelecido pode indicar a presença de leite ácido ou fraude pela adição de solutos. A acidez é uma causa comum de redução do ponto de congelamento, resultante da produção de ácido lático pela degradação da lactose por ação dos microrganismos (Beloti, 2015).

Kedzierska-Matysek *et al.* (2011) em um experimento de três anos com 3.618 observações, relataram que o IC foi influenciado por fatores como raça, ordem de parto, estágio de lactação e região geográfica. Henno *et al.* (2008) ao avaliarem 1.794 amostras individuais de leite bovino, encontraram um IC médio de  $-0,5257^{\circ}\text{C}$  (mínimo =  $-0,550^{\circ}\text{C}$  e máximo =  $-0,497^{\circ}\text{C}$ ) e encontraram também, efeito de estágio da lactação com aumento no IC do leite do primeiro até o terceiro mês de lactação e diminuição posterior. Esses mesmos autores ao agruparem os resultados das análises do teor de proteína e concentração de ureia do leite, observaram que a menor ingestão de energia e proteína pelas vacas do experimento e menor eficiência na utilização da proteína da ração, reduziu a síntese de proteína do leite e aumentou o IC do leite.

O aumento do IC do leite também pode estar associado ao estresse por calor. (Hauser *et al.*, 2023) determinaram valores de IC de  $-0,5422^{\circ}\text{H}$  em animais com acesso a ventilação e aspersão, em comparação com  $-0,5365^{\circ}\text{H}$  em animais que não receberam esses tratamentos ( $P = 0,007$ ).

### **1.2.3 Estabilidade térmica do leite, teste do álcool e leite instável não ácido (LINA)**

No Brasil, a estabilidade do leite bovino cru é um atributo essencial, pois está diretamente relacionada à capacidade do leite de ser submetido a tratamentos térmicos, sendo avaliada pela indústria de laticínios e considerada para determinar sua aceitação, conforme estabelecido pela IN 76 do MAPA (Brasil, 2018). A estabilidade do leite pode ser avaliada por meio de vários métodos, incluindo o teste da fervura, o teste do álcool e o teste da estabilidade térmica (Chavez *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2017). No Brasil, a estabilidade do leite é avaliada

pelo teste do álcool ou alizarol, realizado em duas etapas até a recepção do leite cru na indústria. Inicialmente, o teste é realizado na propriedade pelo transportador e, posteriormente, na plataforma de recebimento, antes que o produto entre na linha de processamento industrial.

De acordo com a legislação vigente, o leite que formar coágulos durante o teste do álcool ou alizarol, com uma concentração mínima de 72% não deve ser transportado para a indústria ou aceito na plataforma de recepção (Brasil, 2018). O resultado positivo desse teste (coagulação) tem sido muitas vezes, erroneamente interpretado como resultado de acidez excessiva (Fischer *et al.*, 2012a; Machado *et al.*, 2017; Marques *et al.*, 2007).

De acordo com a IN 76/2018, é estabelecido que o leite deve ser estável no teste do alizarol na concentração mínima de 72% (Brasil, 2018). No entanto, é importante notar que algumas indústrias têm adotado concentrações de álcool mais elevadas, como 76%, 78% e até 80% no teste do alizarol, para com isso selecionar leite de melhor qualidade. Entretanto, caso o leite seja positivo para essas concentrações, ele é descartado, resultando em consideráveis prejuízos para o produtor de leite (Fischer *et al.*, 2012).

Embora o leite possa ter sua estabilidade reduzida pelo excesso de acidez, devendo ser rejeitado tanto por falta de estabilidade quanto por acidez excessiva resultantes de contaminação bacteriana e problemas de resfriamento, a estabilidade do leite também pode ser comprometida por fatores não relacionados à acidez elevada (Fischer *et al.*, 2012). O fenômeno conhecido como LINA ocorre devido à perda da estabilidade da caseína no teste do álcool, resultando em precipitação positiva, sem que haja acidez elevada acima de 18°D. Essa condição pode impactar negativamente a cadeia produtiva, ocasionando prejuízos econômicos tanto para produtores, quanto para indústrias de laticínios (Zanela; Ribeiro; Fischer, 2015).

Entre os fatores que influenciam a estabilidade do leite estão as variações nas concentrações de sais minerais, que podem ser decorrentes de desequilíbrios fisiológicos, metabólicos e nutricionais (Horne; Muir, 1990; Júnior *et al.*, 2009; Zanela *et al.*, 2009). As micelas de caseína garantem a estabilidade térmica do leite, possibilitando o tratamento térmico pela indústria. No entanto, a estrutura e a estabilidade da caseína podem ser alteradas por diversos fatores, incluindo temperatura, tratamento térmico, pH, hidrólise enzimática da  $\kappa$ -CN, excesso de cálcio iônico, redução da atividade de água, absorção em uma superfície e adição de álcool ou outro solvente polar, bem como a adição de polifenóis (Brasil; Nicolau; Da Silva, 2015; Holt, 2016).

Outros fatores relacionados às características fisiológicas, à saúde do animal e ao clima também afetam a estabilidade térmica do leite. Entre eles estão o estágio de lactação, o número de lactações e a CCS (Brasil; Nicolau; Silva, 2015). Parte dessas alterações ocorre devido ao



aumento da permeabilidade vascular na glândula mamária, permitindo a passagem de proteínas plasmáticas do sangue para o leite. Entre essas proteínas estão a albumina sérica e enzimas proteolíticas como a plasmina (Hinz *et al.*, 2012). A plasmina é uma enzima proteolítica que quebra as proteínas, principalmente a  $\kappa$ -CN, reduzindo seus teores (Hinz *et al.*, 2012; Santos; Fonceca, 2019). Além disso, ocorre uma alteração no equilíbrio das diferentes formas de cálcio, resultando na aglutinação das micelas de caseína (González *et al.*, 2011).

Bernabucci *et al.*, (2015) identificaram diferenças significativas nas características do leite entre as estações do ano. No verão, observou-se uma redução na concentração total de caseína em comparação com o inverno e a primavera, juntamente com alterações nas proporções específicas de diferentes tipos de caseína. Durante o verão notaram uma diminuição na proporção de  $\alpha$ S-Caseína ( $\alpha$ S-CN) e  $\beta$ -Caseína ( $\beta$ -CN), ao passo que houve um aumento na proporção de  $\kappa$ -CN e  $\gamma$ -caseína ( $\gamma$ -CN). Essas mudanças foram associadas pelos autores, a uma menor concentração de matéria seca no leite. Além disso, os pesquisadores destacaram que, durante o verão, o tempo de coagulação do leite foi reduzido, sendo atribuído à dinâmica diferenciada das proteínas e à maior atividade proteolítica.

A introdução de álcool no leite provoca alterações nas micelas de caseína, incluindo o colapso da camada de  $\kappa$ -CN, a redução na carga micelar e a precipitação do fosfato de cálcio. Esses efeitos contribuem para a diminuição da estabilidade micelar da  $\kappa$ -CN, conforme observado por Brasil, Nicolau e Silva, (2015) e Silva *et al.* (2012).

Entre os fatores que influenciam a estabilidade do leite, destacam-se as alterações nas concentrações de sais minerais, as quais podem resultar de desequilíbrios fisiológicos, metabólicos e nutricionais (Horne; Muir, 1990; Júnior *et al.*, 2009; Zanela *et al.*, 2009). Schmitz *et al.* (2024) relata que a estabilidade no teste do álcool apresentou um aumento com o incremento do valor de pH, mas foi reduzida à medida que o valor de cálcio iônico aumentou. Essa relação mostrou variação conforme o estágio da lactação, destacando-se o efeito negativo do cálcio iônico sobre a estabilidade.

Contudo, é importante salientar que o teste de estabilidade alcoólica, embora seja comumente utilizado, nem sempre é um indicador confiável na previsão da acidez titulável e da estabilidade térmica do leite, conforme reportado por Fagnani *et al.* (2016). Uma situação que destaca essa limitação é quando o leite reage positivamente ao teste do álcool em concentrações alcoólicas de 72% ou menos, mas apresenta uma acidez titulável considerada normal (14-18°D). Esse fenômeno é conhecido como LINA, de acordo com Fischer *et al.* (2012).

A manifestação do fenômeno LINA ou a mera diminuição da estabilidade do leite são eventos multifatoriais e complexos (Fischer *et al.*, 2012). Dentre os fatores relevantes, destacam-se o estresse térmico (Abreu, 2015) restrição alimentar (Stumpf *et al.*, 2013; Zanela *et al.*, 2006; Schmidt *et al.*, 2024), acidose ruminal (Werncke, 2017), alcalose metabólica (Fagnani *et al.*, 2016), níveis de cálcio iônico e dias em lactação (González *et al.*, 2011; Schmitz, 2023).

Abreu *et al.* (2020) constataram que vacas privadas de acesso à sombra apresentaram uma redução na estabilidade do leite, atingindo 71,9%, quando comparadas às vacas que tinham acesso à sombra (76,5%). Essa diminuição ocorreu durante o período de estresse, imediatamente após o período em que as vacas não tiveram acesso à sombra. Os pesquisadores também notaram que, ao permitir o acesso à sombra novamente, o valor da estabilidade do leite se restabeleceu. Da mesma forma, Kappes *et al.* (2022) identificaram reduções na estabilidade do leite conforme a classe de ITU aumentava. O valor mais baixo foi observado na classe de perigo (75,1%), enquanto o valor mais alto foi registrado na classe segura, sem estresse térmico (78,6%). Vale ressaltar que, embora este valor não seja LINA pela definição, indicou uma correlação entre estabilidade do leite e condições de estresse térmico.

A restrição alimentar emerge como um fator crucial associado à redução da estabilidade do leite ou à ocorrência de LINA. Fruscalso *et al.* (2013) destacaram que ao reduzir em 50% a quantidade da dieta anterior às avaliações, as vacas apresentaram uma diminuição na estabilidade do leite, registrando 71,76%, em comparação ao grupo que não sofreu restrição alimentar (74,22%). Os autores atribuíram essa redução na estabilidade ao aumento da permeabilidade vascular. A permeabilidade das junções celulares na glândula mamária desempenha um papel fundamental nessa instabilidade, sendo que o estresse alimentar aumenta essa permeabilidade, permitindo a passagem de minerais e proteínas do sangue para o leite (Kul *et al.*, 2019).

Em um estudo conduzido em Lages/SC, Schmidt *et al.* (2024) induziram um quadro de LINA por meio de uma restrição alimentar de 50% das exigências de energia e proteína. Para a recuperação do quadro, as vacas foram divididas em três grupos, de modo que, o grupo 1 recebeu 100% das exigências em energia e proteína, o grupo 2 recebeu 100% de energia e 50% de proteína, e o grupo 3 recebeu 50% de energia e 100% de proteína. Os autores observaram que o grupo 1 apresentou uma recuperação rápida da estabilidade, recuperando também a produção de leite e o teor de lactose. O grupo 2 mostrou uma recuperação mais lenta do quadro de LINA, sem atingir os valores de estabilidade apresentados no período de preparação (100%

das exigências nutricionais). Por fim, o grupo 3 apresentou um agravamento no quadro de LINA, com uma redução severa na produção de leite e na condição corporal.

Diversas características fisiológicas podem influenciar a estabilidade do leite, sendo notáveis a OP e o estágio de lactação. Vacas com uma OP mais elevada tendem a apresentar uma menor estabilidade do leite, conforme observado por González *et al.* (2011).

Em um estudo comparativo entre vacas mestiças Holandesas x Jersey com relação às vacas puras Holandesas, nas primeiras oito semanas de lactação, Pelizza (2015) não identificou diferenças significativas entre os grupos genéticos, mas observou uma diferença significativa em relação à OP (0,0081) sendo que vacas primíparas apresentaram resistência a concentrações maiores de álcool ( $76,05 \pm 1,11\%$ ) em relação às múltíparas ( $71,98 \pm 1,04\%$ ). As características funcionais do leite cru bovino, incluindo estabilidade ao álcool, cálcio iônico e acidez, apresentaram variações distintas conforme os estágios da lactação e os grupos genéticos. Durante os estágios iniciais e finais da lactação, observou-se uma menor estabilidade, especialmente em vacas da raça Jersey e em mestiços (Schmitz *et al.*, 2024). A concentração média de álcool para vacas primíparas foi de 76,05%, enquanto as vacas múltíparas apresentaram uma concentração média de 71,98%.

A estabilidade do leite é negativamente correlacionada à acidez titulável, uma vez que há redução do pH e elevação de acidez titulável resulta na diminuição dos níveis de fosfato e no aumento da concentração de cálcio iônico levando a uma redução da estabilidade. Esse aumento de cálcio iônico reduz as forças de repulsão entre as micelas de caseína, promovendo a coagulação do leite (Horne, 2016). Além disso, é observada uma redução na estabilidade do leite nas fases iniciais e finais da lactação, conforme destacado (González *et al.*, 2011). Essa menor estabilidade pode estar associada ao aumento da permeabilidade das "tight junctions", conforme discutido por (Stumpf *et al.*, 2020)

#### 1.2.4 pH

O leite normal de vaca apresenta pH entre 6,6 e 6,8 (Brasil, 2018b). Esse parâmetro é crucial, pois modifica a carga de proteína e afeta a estrutura micelar do leite. Valores de pH abaixo de 6,5 podem indicar a presença de colostro, embora valores baixos de pH também possam ocorrer devido ao acúmulo de ácido láctico, produzido pela ação bacteriana, tornando essa análise importante para auxiliar na avaliação da qualidade do leite (Oliveira, 2022).

Por outro lado, pH do leite acima do normal pode estar relacionado à adição fraudulenta de substâncias alcalinas visando à neutralização de ácidos formados, resultante da hidrólise da

lactose (Vidal; Saran Netto, 2018). A literatura indica de forma consistente que o aumento da CCS está associado à alcalinização do leite, comprovada pela elevação do pH (Arruda Junior *et al.*, 2019). No entanto, Moslehishad; Ezzatpanah; Aminafshar (2010) observaram uma relação inversa, em que o aumento da CCS resultou em uma diminuição do pH do leite.

### 1.3 CARACTERÍSTICAS HIGIÊNICO-SANITÁRIAS

#### 1.3.1 Contagem de Células Somáticas

As células somáticas do leite constituem a composição combinada entre as células epiteliais da glândula mamária e células do sistema imune (Alhussien; Dang, 2018). Estas células desempenham um papel crucial na defesa da glândula mamária contra patógenos e infecções intramamárias. Os principais tipos celulares que compõem as células somáticas do leite incluem linfócitos, macrófagos, neutrófilos e células epiteliais da glândula mamária. Em bovinos saudáveis, a CCS geralmente é inferior a 200.000 células por mililitro de leite, com os macrófagos sendo as células predominantes (35-79%), seguidas pelos linfócitos (16-28%), neutrófilos (3-26%) e células epiteliais mamárias (2-15% (Li *et al.*, 2014).

A CCS é um parâmetro utilizado mundialmente para a detecção da mastite subclínica, caracterizada pela ausência de alterações visíveis no leite e no úbere, a CCS consiste em uma importante ferramenta para revelar o aumento na contagem de células somáticas e possíveis alterações na composição do leite (Alhussien; Dang, 2018).

A CCS do leite é influenciada pela produção da vaca, sua saúde, paridade, estágio de lactação e raça (Alhussien; Dang, 2018). Logo após o parto, a CCS pode alcançar valores superiores a 1.000.000 células por mililitro (células/ml) de leite, porém em vacas saudáveis, a CCS retorna a níveis inferiores a 100.000 células/ml, dentro de 7 a 10 dias após o parto (Ruegg; Pantoja, 2013a). De acordo com Santos; Fonceca, (2019) à medida que a lactação avança, observa-se um aumento na CCS, acima de 100.000 células/ml de leite, devido ao maior risco de novas infecções. No entanto, em vacas saudáveis a concentração de CCS não se altera em função do estágio da lactação, assim como com o avanço da idade.

O aumento na CCS do leite leva à diminuição na produção de leite, devido aos danos físicos nas células epiteliais produtoras de leite (Alhussien; Dang, 2018). Como resultado, a capacidade sintética e secretora da glândula mamária é significativamente reduzida. De acordo com (Gonçalves *et al.*, 2018), as perdas de produção de leite variam com base no estágio e no número de lactações. Em vacas de primeira lactação, para cada aumento no logaritmo natural

da CCS, as perdas diárias de leite são de aproximadamente 0,68 kg (início), 0,55 kg (meio) e 0,97 kg (final) da lactação. Em comparação, vacas de segunda e terceira lactação apresentam perdas maiores: 1,47 kg e 2,22 kg (início), 1,09 kg e 1,13 kg (meio), e 2,45 kg e 2,65 kg (final) da lactação, respectivamente.

A mastite pode reduzir o teor total de gordura do leite em razão da redução da capacidade de síntese da glândula mamária (Santos; Fonseca, 2019). Stocco *et al.* (2020) investigaram os efeitos de diferentes níveis de contagem diferencial de células somáticas (CCSD) na composição do leite. Os resultados indicaram que um aumento nos níveis de CCSD resultou em uma redução no teor de gordura do leite, atribuída ao aumento na população de neutrófilos polimorfonucleares, que elevam a taxa de lipólise devido à liberação de enzimas lipolíticas. Por outro lado, observou-se um aumento nos ácidos graxos do leite conforme os níveis de CCSD aumentaram.

Em relação à proteína, o leite com alta CCS apresenta aumento no teor de proteínas do soro e redução do teor de caseína, bem como na relação caseína: proteína verdadeira (Maréchal *et al.*, 2011). Noro *et al.* (2006) observaram aumento nos teores de proteínas à medida que o escore de células somáticas aumentou. Esse aumento é atribuído principalmente ao aporte de proteínas plasmáticas para a glândula mamária devido a mudança na permeabilidade da membrana alveolar mamária (Pereira *et al.*, 1999) e da resposta imune contra os patógenos causadores de mastite (Santos, Fonseca, 2019).

Estudos conduzidos por Bisutti *et al.* (2023) constataram que o aumento da CCS resultou na redução de 8% na alfa-s1-caseína e beta-caseína, possivelmente devido ao aumento das proteases endógenas do leite, incluindo plasmina, enzimas produzidas pelos leucócitos e aquelas derivadas da alteração na barreira sangue-leite. Mattiello *et al.* (2018), investigaram o impacto da CCS no rendimento industrial e na eficiência da produção de queijo colonial. O leite cru com baixa CCS (<500.000 células/ml) apresentou um rendimento simples de 8,49 litros de leite por quilograma de queijo, enquanto o leite com alta CCS ( $\geq 500.000$  células/ml) teve um rendimento de 8,94 litros de leite por quilograma de queijo, o que representa uma redução de aproximadamente 5,3% no rendimento, evidenciando que a elevada CCS tem um impacto negativo no rendimento simples e seco do queijo colonial em escala industrial.

Danieli (2024) também observou um aumento na concentração de cloretos em amostras de leite de animais com alta CCS, registrando valores de  $0,922 \pm 0,02$  para alta CCS e  $0,855 \pm 0,02$  para baixa CCS, com diferença estatisticamente significativa ( $P = 0,0121$ ). Danieli (2024) identificaram por meio de uma análise fatorial, uma relação negativa entre CCS e teor de lactose em amostras de leite de vacas Jersey e Holandesas. Da mesma forma, Alessio *et al.* (2021)

identificaram redução nos conteúdos de lactose do leite associados ao aumento da CCS e CPP. Resultado similar foi observado por Danieli (2024) com teor de lactose foi mais alto em grupo com baixa CCS ( $4,46 \pm 0,01$ ) quando comparado com o grupo com alta CCS ( $4,38 \pm 0,02$ ) ( $P = 0,0002$ ).

De acordo com Costa *et al.* (2019), a redução do percentual de lactose no leite durante a mastite pode ser atribuída a três principais causas: (1) danos das células secretoras devido à inflamação e infecção, (2) ruptura das “*tight junctions*” e alterações na permeabilidade da membrana basal das células mamárias que separam o sangue e o leite, (3) ação dos patógenos da mastite, que utilizam a lactose disponível como substrato, resultando na redução do percentual de lactose e aumento do ácido lático no leite.

Durante a mastite, há um aumento nas concentrações de cloreto e sódio no leite devido à alteração na permeabilidade da barreira entre o sangue e o leite (Fox; Shook; Schultz, 1985). O teor de cloretos é relatado como relacionado positivamente com a CCS. De acordo com as classificações de CCS, o conteúdo de cloretos é  $< 1,10$ , entre  $1,10$  e  $1,21$  e  $> 1,21$  g/L para úberes saudáveis, mastíticos subclínicos e clínicos, respectivamente. Neste mesmo estudo, o conteúdo mineral também foi relacionado com a CCS, sendo  $< 0,50\%$ , entre  $0,50$  e  $0,60\%$  e  $> 0,60\%$  para vacas saudáveis, rebanhos com provável mastite subclínica, e rebanhos com provável mastite clínica, respectivamente (Gargouri *et al.*, 2014). O potássio e o cálcio apresentam teores reduzidos devido à sua passagem do leite para a linfa entre as células secretoras danificadas. Estas alterações no conteúdo mineral afetam o pH e a condutividade do leite (Schroeder, 1997).

A literatura ainda não alcançou um consenso claro se a mastite subclínica contribui significativamente para a instabilidade do leite. Alguns autores relataram que o aumento de CCS não interfere na perda de estabilidade (Gargouri *et al.*, 2014; Li; Ye; Singh, 2019), outros observaram relações significativas (Machado *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2013) e até mesmo relações contrárias, em que a baixa CCS causa perda de estabilidade (Chavez *et al.*, 2004).

Estudos conduzidos a partir de amostras de leite de tanque de resfriamento relataram correlação entre CCS elevada e perda de estabilidade ao teste do álcool (Machado *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2013). Conforme (Zanela; Ribeiro, 2018) a mistura de leite de animais saudáveis com o de animais com mastite, ou de quartos saudáveis com mastíticos, pode comprometer os resultados das análises. Danieli (2024) não encontrou diferença significativa entre os grupos de alta e baixa CCS para estabilidade ao teste do álcool.

Koling (2012) avaliou a relação entre a CCS do leite oriundo de diferentes quartos mamários de vacas com mastite subclínica, com amostras sendo coletadas dos quartos

mamários de forma individual. Não houve diferença significativa da instabilidade do leite dos quartos mamários saudáveis e dos mastíticos. Martins *et al.* (2019) investigou o impacto da infecção intramamária subclínica na estabilidade do leite ao teste do álcool. Vacas leiteiras com CCS superior a 200.000 células/ml e cultura bacteriana positiva foram analisadas, comparando-se os quartos mamários infectados e saudáveis das vacas, levando em conta o tipo de patógeno. Os resultados revelaram uma correlação entre a produção de leite e o teor de lactose com a estabilidade do leite no teste do álcool. Contudo, não houve evidência de correlação entre a presença de infecção intramamária subclínica e a estabilidade do leite no teste do álcool.

Arruda Júnior (2018) avaliou amostras de leite individuais de vacas, e amostras de leite conjunto de estabelecimentos rurais com baixa acidez titulável. O estudo indicou que a baixa acidez titulável está relacionada a elevada CCS e baixa concentração de lactose. Moslehishad; Ezzatpanah; Aminafshar (2010) também verificaram um aumento no pH e redução da acidez titulável em amostras de leite com elevada CCS.

No final da lactação e nos casos de infecção intramamária, há aumento na transferência de constituintes do sangue para o leite, o que resulta em mudança na composição, como menor concentração de lactose, maior concentração de cloretos e proteínas séricas: imunoglobulinas, albumina e em alterações nas propriedades físico-químicas, como diminuição estabilidade térmica, alteração das características da coalhada durante a produção do queijo (Nero; Carvalho, 2019).

### **1.3.2 Contagem Padrão em Placas**

A análise laboratorial mais utilizada para monitorar a qualidade microbiológica do leite cru é a CPP, a qual quantifica o número total de bactérias presentes no leite cru, podendo este ser analisado por procedimento de CPP e também por contadores eletrônicos baseados em citometria de fluxo (Santos; Fonseca, 2019). O limite preconizado pela legislação para o leite cru compreende médias geométricas trimestrais de no máximo 300.000 UFC/ml (trezentas mil unidades formadoras de colônia por mililitro) (Brasil, 2018b).

O leite permanece estéril dentro do úbere, porém contamina-se durante o processo de obtenção, conservação ou processamento (Nero; Carvalho, 2019). Os microrganismos presentes no leite podem ser classificados de acordo com a temperatura ótima de multiplicação em psicotróficas (0 e 15°C), mesófilas (20 e 40°C), termófilas (44 e 55°C), termodúricas (capazes de resistir ao processo de pasteurização) (Beloti, 2015). A quantificação bacteriana do leite cru auxilia na avaliação dos procedimentos de ordenha e armazenamento na propriedade

rural e permite inferir os prováveis efeitos adversos sobre o rendimento industrial e a segurança alimentar do leite (Vidal; Saran Netto, 2018).

A contaminação do leite por microrganismos mesófilos ocorre em condições deficientes de higiene e resfriamento do leite. As bactérias do gênero *Lactobacillus*, *Streptococcus* e do grupo das enterobactérias fermentam a lactose em ácido láctico, o que aumenta a acidez do leite (Santos; Fonseca, 2019). A redução do pH afeta a estabilidade do leite, pois a caseína apresenta cargas negativas ao redor da micela coloidal quando o pH se apresenta dentro da faixa normal. Como a concentração de íons de hidrogênio aumenta na solução, as forças de repulsão entre as micelas são reduzidas, levando à desestabilização da micela (Nero; Carvalho, 2019). Em estudos conduzidos por Machado *et al.* (2017) a estabilidade do leite medida com o teste de álcool diminuiu quando a CPP foi maior que 250.000 UFC/ml.

Já as bactérias psicotróficas, embora em sua maioria sejam eliminadas pela pasteurização, tem capacidade de produção de enzimas lipolíticas e proteolíticas termorresistentes, que causam problemas de qualidade dos produtos lácteos (Santos; Fonseca, 2019). A ação proteolítica das enzimas ocorre principalmente por ação sobre a  $\kappa$ -CN, causando hidrólise proteica e consequente desestabilização micelar, levando à coagulação do leite tratado pela tecnologia de UHT (Nörnberg *et al.*, 2010)

### **1.3.3 Efeito do Estágio de Lactação na composição e propriedades físico-químicas do leite**

O leite é denominado colostro nos três primeiros dias após o parto, diferenciando-se do leite produzido no restante da lactação por conter menor quantidade de lactose e maior concentração de gordura, proteína, peptídeos, nitrogênio não proteico, cinzas, vitaminas e minerais, hormônios, fatores de crescimento, citocinas, nucleotídeos e imunoglobulinas (Santos; Fonseca, 2019). Durante a transição do colostro para o leite, ocorrem variações tanto na composição, quanto nas propriedades físicas da secreção mamária (Madsen *et al.*, 2004).

Durante o curso da lactação, o teor de SNG no leite é relativamente alto no primeiro mês, diminui no segundo mês e, posteriormente, aumenta conforme a lactação progride (Harris; Bachman, 2003). A lactose, principal carboidrato do leite, apresenta um teor médio de 4,4% a 4,6%. Sua síntese atinge o máximo durante o pico da lactação, diminuindo gradualmente até o final do período lactacional. Os teores de gordura e proteína tendem a aumentar à medida que a lactação avança. Nos primeiros 60 dias após o parto, os teores de proteína são mais baixos, elevando-se com o progresso da lactação, enquanto o teor de gordura atinge seu máximo após 221 dias de lactação (Noro *et al.*, 2006; Santos; Fonseca, 2019a).



A composição mineral também sofre alterações com o estágio da lactação. Nogalska; Momot; Nogalski (2020), observaram maiores teores de potássio com o progresso da lactação, enquanto maiores teores de cálcio e sódio foram identificados no primeiro mês após o parto, em comparação com os meses seguintes. Da mesma forma, a concentração láctea de cloretos apresenta variações, sendo maior durante a fase colostrar e do leite de transição, com a estabilidade demonstrada a partir de 72 horas transcorridas da lactação (Raimondo *et al.*, 2009)

O pH do leite varia com o estágio da lactação, conforme relatado por diversos autores. Beloti (2015); Tsioulpas; Lewis; Grandison (2007) identificaram que inicialmente, o colostro apresenta um pH baixo, na faixa de 6,0 a 6,3 e que aumenta progressivamente com o tempo após o parto. Enquanto que, Madsen *et al.* (2004) observaram um aumento no pH de 6,4 para 6,7 durante as primeiras duas semanas após o parto.

Apesar do resultado da acidez titulável ser expresso em percentual de ácido láctico, outros componentes do leite também interferem nesta característica como, citratos, fosfatos e proteínas (Vidal; Saran Netto, 2018). Quanto maior a concentração desses componentes, maior o nível de acidez natural observado (Harris; Bachman, 2003).

Tsioulpas; Lewis; Grandison (2007) investigaram os efeitos dos minerais na estabilidade da micela de caseína do leite de vaca individual, ao longo de uma lactação completa. Houve uma relação inversa não linear entre a concentração de íons cálcio livres e a estabilidade do teste do álcool.

A estabilidade do leite ao teste do álcool apresenta variações no decorrer da lactação, com indícios de maior instabilidade no início da lactação (Horne, 2016). De acordo com Dadousis *et al.* (2017), o estágio de lactação afeta a estabilidade do leite, provavelmente, devido às alterações na concentração de proteínas (fase inicial), de cátions divalentes e sua proporção com ânions e equilíbrio salino.

Tsioulpas; Lewis; Grandison (2007) avaliaram as mudanças ocorridas do colostro (parto até 5 dias), pós colostro (6 a 30 dias) ao início da lactação (31 até 90 dias) em amostras individuais. A estabilidade do álcool durante os dias 1 a 4 foi baixa (<60%) para o leite de vaca e atingiu apenas 70% no dia 5. Observou-se também, um baixo pH e alta concentração de cálcio iônico. Entre os dias 1 e 5, houve uma diminuição constante na concentração de cálcio iônico, acompanhada por um aumento progressivo na estabilidade térmica. A estabilidade média ( $\pm$  DP) no presente estudo foi de  $76 \pm 3,1$  no décimo quinto dia. A acidez titulável do leite apresentou níveis normais duas semanas após o parto e apresentou boa relação logarítmica com proteínas totais ( $r = 0,95$ ,  $P < 0,001$ ) e com fósforo ( $r = 0,91$ ,  $P < 0,001$ ). Uma relação linear inversa com citrato ( $r = -0,67$ ,  $P < 0,01$ ) também foi encontrada.

Stumpf *et al.* (2020) avaliaram a permeabilidade das *tight junctions* da glândula mamária em vacas leiteiras por meio do teste do álcool. Os resultados indicaram que a redução da estabilidade está relacionada com a permeabilidade das *tight junctions* da glândula mamária. A probabilidade de vacas produzirem leite instável a 72° ou abaixo aumentou em vacas com adiantado estágio de lactação.

A contagem de células somáticas no leite é influenciada pelo estágio de lactação das vacas leiteiras, conforme descrito por Kennedy *et al.* (1982) que observaram contagens mais altas logo após o parto, com um declínio rápido entre 25 e 45 dias de lactação, seguido de um aumento durante o restante do período de lactação. Olejnik (1994) ao avaliar vacas leiteiras durante os primeiros 10 dias pós-parto, verificaram que as contagens de células somáticas em vacas não infectadas na 1ª e 2ª lactação são aparentemente dependentes do tempo e não podem ser consideradas características de animais individuais. De Vlieghe *et al.* (2005) avaliaram a CCS do leite em vacas leiteiras primíparas no início da lactação e estimaram seu impacto na CCS no dia do teste. O estudo analisou 14.766 amostras e demonstrou que a média geométrica da CCS diminuiu de 178.000 células/ml no 5º dia para 74.000 células/ml no 14º dia de lactação.

A produção de leite também se altera ao longo da lactação, havendo consenso na literatura sobre o formato esperado da curva de lactação para produção de leite. A quantidade de leite produzida aumenta após o parto, com uma produção máxima no primeiro ao segundo mês, que depois decresce conforme a lactação avança (Beloti, 2015; Macciotta; Vicario; Cappio-Borlino, 2005).

A análise laboratorial mais utilizada para monitorar a qualidade microbiológica do leite cru é a CPP, a qual quantifica o número total de bactérias presentes no leite cru, podendo este ser analisado por procedimento de CPP e também por contadores eletrônicos baseados em citometria de fluxo (Santos; Fonseca, 2019). O limite preconizado pela legislação para o leite cru compreende médias geométricas trimestrais de no máximo 300.000 UFC/ml (Brasil, 2018b).

O leite permanece estéril dentro do úbere, porém contamina-se durante o processo de obtenção, conservação ou processamento (Nero; Carvalho, 2019). Os microrganismos presentes no leite podem ser classificados de acordo com a temperatura ótima de multiplicação em psicotróficas (0 e 15°C), mesófilas (20 e 40°C), termófilas (44 e 55°C), termodúricas (capazes de resistir ao processo de pasteurização) (Beloti, 2015a). A quantificação bacteriana do leite cru auxilia na avaliação dos procedimentos de ordenha e armazenamento na propriedade rural e permite inferir os prováveis efeitos adversos sobre o rendimento industrial e a segurança alimentar do leite (Vidal; Saran Netto, 2018)

A contaminação do leite por microrganismos mesófilos ocorre em condições deficientes de higiene e resfriamento do leite. As bactérias do gênero *Lactobacillus*, *Streptococcus* e do grupo das enterobactérias fermentam a lactose em ácido lático, o que aumenta a acidez do leite (Santos; Fonceca, 2019).

A redução do pH afeta a estabilidade do leite, pois a caseína apresenta cargas negativas ao redor da micela coloidal quando o pH se apresenta dentro da faixa normal. Como a concentração de íons de hidrogênio aumenta na solução, as forças de repulsão entre as micelas são reduzidas, levando à desestabilização da micela (Nero; Carvalho, 2019). Em estudos conduzidos por Machado *et al.* (2017) a estabilidade do leite medida com o teste de álcool diminuiu quando a CPP foi maior que 250.000 UFC/ml.

Já as bactérias psicotróficas, embora em sua maioria sejam eliminadas pela pasteurização, tem capacidade de produção de enzimas lipolíticas e proteolíticas termorresistentes, que causam problemas de qualidade dos produtos lácteos (Santos; Fonseca, 2019). A ação proteolítica das enzimas ocorre principalmente por ação sobre a  $\kappa$ -CN, causando hidrólise proteica e consequente desestabilização micelar, levando à coagulação do leite tratado pela tecnologia de UHT (Nörnberg *et al.*, 2010).

### **1.3.4 Parição sazonal**

Sistemas de produção de leite baseados em pastagens com partos sazonalmente concentrados são comuns em várias regiões do mundo, onde o clima temperado favorece longas estações de crescimento das forrageiras. Esses sistemas buscam melhorar a eficiência na conversão de pasto em leite por meio da sincronização de partos coincidindo com o auge do crescimento das pastagens (Butler *et al.*, 2023).

Mudanças na composição de todos os constituintes do leite ocorrem durante a lactação, independentemente de fatores nutricionais e estações (Dillon *et al.*, 1995). Em sistemas de partos sazonais, projetados para combinar o pico de lactação com o pico de crescimento da grama, os efeitos do estágio de lactação causam um suprimento sazonal de leite no qual a composição e a quantidade variam entre os diferentes estágios de lactação (inicial, intermediário e final), independentemente da dieta consumida pelo rebanho (Timlin *et al.*, 2021). Desta forma, a prática de sincronização de partos resulta em um padrão de variação sazonal na composição do leite.

Nas primeiras semanas de lactação, observam-se teores mais elevados de proteína e gordura no leite, os quais tendem a diminuir gradualmente com o avanço da lactação (Santos e

Fonseca, 2019). Posteriormente, ocorre uma elevação nos teores de gordura e proteína, acompanhada por uma redução no teor de lactose à medida que o estágio lactacional progride (Alhussien; Dang, 2018).

## **CAPÍTULO II**

### **2 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE AO TESTE DO ÁLCOOL E DA ACIDEZ TITULÁVEL DO LEITE E SUA RELAÇÃO COM CONDIÇÕES AMBIENTAIS E FISIOLÓGICAS DE VACAS LEITEIRAS NO INÍCIO DA LACTAÇÃO**

#### **2.1 RESUMO**

O estudo investigou a composição e as propriedades físico-químicas do leite bovino ao longo das cinco primeiras semanas de lactação, com ênfase nas mudanças ocorridas durante esse período. Foram analisadas variáveis como proteína, caseína, lactose, gordura, ST, SNG, CCS, acidez titulável e estabilidade ao teste do álcool. Observou-se que a produção de leite aumentou gradualmente até estabilizar na terceira semana, enquanto os teores de gordura, proteína e caseína diminuíram, estabilizando-se entre a terceira e a quarta semana. O teor de lactose aumentou até a quinta semana, sendo maior em vacas primíparas. A acidez titulável diminuiu nas três primeiras semanas se estabilizando a partir da quarta semana, assim como a estabilidade ao teste do álcool, que só atingiu os padrões exigidos para comercialização após esse período. Conclui-se que as três primeiras semanas de lactação são críticas para a qualidade do leite, especialmente em sistemas de produção com alta concentração de partos, onde a conformidade com as normas de qualidade é desafiadora. O estudo destaca a importância de ajustes no manejo das fazendas para assegurar que o leite produzido esteja em conformidade com os padrões regulamentares, especialmente em relação às propriedades físico-químicas.

**Palavras-chave** - Pós Parto, Alizarol, Dornic.

## 2.2 ABSTRACT

The study investigated the composition and physicochemical parameters of bovine milk during the first five weeks of lactation, with emphasis on the changes occurring during this period. Variables such as protein, casein, lactose, fat, total solids (TS), solids-not-fat (SNF), somatic cell count (SCC), titratable acidity, and ethanol stability of the milk were analyzed. It was observed that milk yield gradually increased until stabilizing in the third week, while fat, protein, and casein contents decreased, stabilizing between the third and fourth weeks. Lactose content increased up to the fifth week, being higher in primiparous cows. Titratable acidity decreased during the first three weeks, stabilizing in the fourth week, as did ethanol stability, which only reached the standards required for commercialization after this period. It is concluded that the first three weeks of lactation are critical for milk quality, especially in production systems with a high concentration of calvings, where compliance with quality standards is challenging. The study highlights the importance of adjustments in farm management to ensure that the milk produced complies with regulatory standards, particularly in relation to physicochemical parameters.

**Keywords** – Postpartum, Alizarol and Dornic

## 2.3 INTRODUÇÃO

Para assegurar a fabricação de produtos lácteos de alta qualidade, a composição e as propriedades físico-químicas do leite vêm sendo reguladas por instruções normativas do MAPA. Atualmente encontram-se em vigor as INs 76 e 77/2018, (Brasil, 2018a; Brasil, 2018b). Entre os padrões mínimos estabelecidos para o recebimento industrial do leite, em relação à caracterização físico-química, incluem-se a acidez titulável, variando entre 14 e 18°D e a estabilidade em solução alcoólica de no mínimo 72% de álcool (Brasil, 2018b).

Durante a lactação, a composição e as propriedades físico-químicas do leite das vacas passam por variações dinâmicas que refletem a complexidade do processo de produção. Inicialmente, os SNG apresentam-se elevados, mas começam a diminuir a partir do segundo mês, para então aumentar novamente na fase final da lactação.

A lactose atinge seu pico na metade da lactação, diminuindo posteriormente, enquanto os níveis de gordura e proteína aumentam progressivamente ao longo do período lactacional; (Harris; Bachman, 2003; Noro *et al.*, 2006; Santos; Fonseca, 2019).

Durante as fases iniciais da lactação, o pH do leite tende a ser mais baixo, variando entre 6,4 e 6,8, e a estabilidade ao teste do álcool é frequentemente comprometida, normalizando aproximadamente duas semanas após o parto. A acidez titulável é expressa em percentual de ácido lático e sofre influência de componentes como citratos, fosfatos e proteínas. Esses componentes também desempenham um papel crucial na estabilidade do leite, pois sua concentração afeta a acidez natural e, conseqüentemente, a aceitação do leite pela indústria (Vidal; Saran Netto, 2018).

Os produtores de leite costumam iniciar a comercialização do leite assim que termina o período de transição do colostro para o leite, porém nestes primeiros dias de lactação o leite das vacas ainda pode apresentar não conformidades para alguns indicadores de qualidade em relação aos valores de referência estabelecidos nos regulamentos de qualidade do leite, especialmente quanto aos seus atributos físico-químicos.

Por outro lado, como as análises físico-químicas são feitas somente em amostras conjuntas de leite de tanques de resfriamento, a diluição deste leite com o de vacas em estágios de lactação mais avançados faz com que eventuais problemas não sejam detectados. Entretanto, em sistemas de produção com concentração de parições e, conseqüentemente, maior participação de leite de vacas recém paridas no “*pool*” (tanque) pode levar a detecção de problemas tais como elevada acidez titulável e LINA.

Apesar de haver trabalhos que demonstram as diferenças na composição e propriedades físicas do leite nos diferentes estágios de lactação (Schmitz *et al.*, 2024), existe uma lacuna de informação científica sobre as diferenças nos primeiros dias ou semanas de lactação que permitam a orientação sobre a eventual necessidade de segregação de leite em um período maior aos primeiros 3 a 5 dias de lactação, no qual normalmente o leite não é comercializado.

O RIISPOA (Brasil, 2017) determina que é impróprio para qualquer tipo de aproveitamento do leite cru, quando este revela presença de colostro (art. 501), entretanto define colostro como sendo o produto da ordenha obtido após o parto e enquanto estiverem presentes os elementos que o caracterizam (art. 236), deixando vago a partir de que momento ou condições o leite deixa de ser colostro e pode sofrer processamento industrial. Em função disto, este estudo visa investigar a composição e as propriedades físico-químicas do leite ao longo das cinco primeiras semanas de lactação.

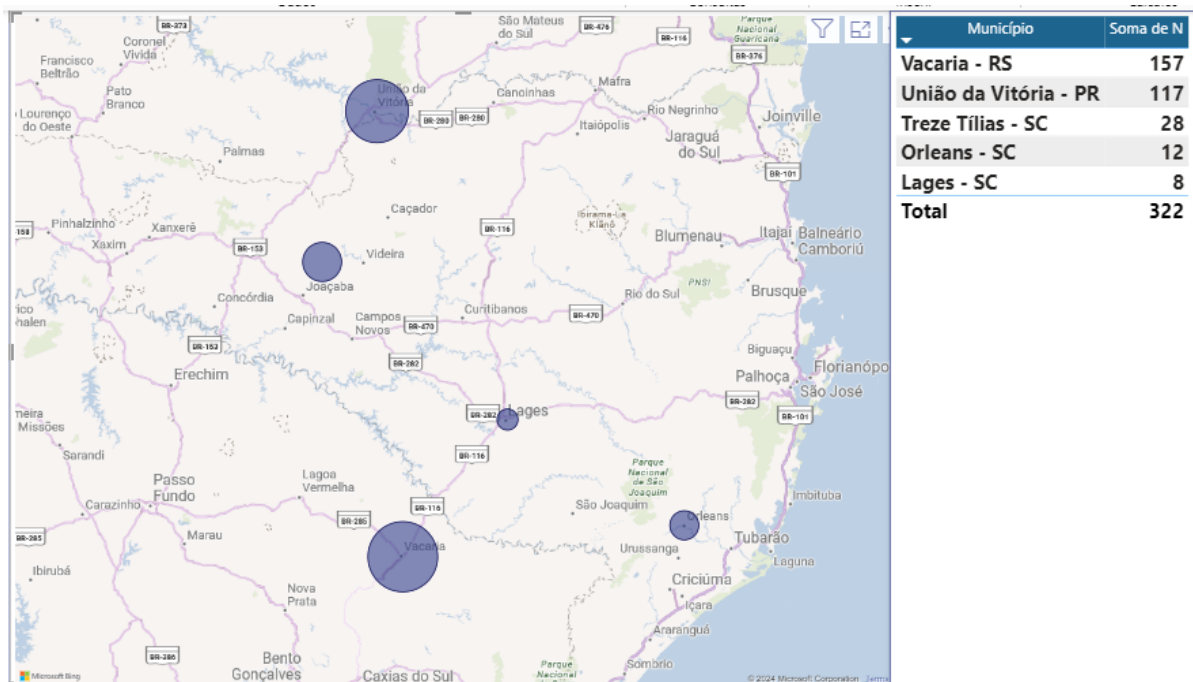
O objetivo do presente estudo foi investigar a composição e as propriedades físico-químicas do leite ao longo das cinco primeiras semanas de lactação. A hipótese deste trabalho é de que especialmente o leite produzido na primeira semana, entre o quarto e sétimo dia pós-parto, embora seja comercializado, ainda apresenta alterações que podem comprometer sua adequação à certos processos industriais específicos.

## 2.4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido em propriedades leiteiras comerciais localizadas nos municípios de União da Vitória - PR, Vacaria - RS, Orleans - SC, Treze Tílias - SC, Itapiranga - SC e Lages - SC (Figura 1).



Figura 1 - Localização das propriedades leiteiras



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

Em um período de dois anos foram avaliadas vacas Holandesas, Jersey e Mestiças Holandesas x Jersey em propriedades com sistema de confinamento e baseado em pastagem. As avaliações e coletas foram realizadas semanalmente entre 4º e o 35º dia do período pós-parto. Após a edição foram mantidos 336 dados individuais por vacas, com observações para DEL, OP, produção de leite, estabilidade ao teste do álcool, acidez titulável, pH, gordura, proteína, caseína, lactose, ST, CCS, teores de cloretos e de fósforo.

Semanalmente, foi mensurada a produção de leite de forma individual (kg/dia), utilizando medidores/coletores de amostras acoplados ao sistema de ordenha. Ao final de cada ordenha, foi coletada uma amostra de leite do coletor, formando uma amostra composta e proporcional ao final da segunda ordenha

As amostras compostas coletadas foram homogêneas e separadas para composição, análises físicas, teor de cloretos e fósforo total. Uma fração da amostra foi transferida para um frasco de 40ml com conservante bactericida bronopol (2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol). Essas amostras foram encaminhadas para o Laboratório da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa, localizado em Curitiba - PR, onde foram realizadas análises de composição, nas quais empregou-se o método de infravermelho para análise de proteína, gordura, lactose, ureia, caseína, ST e extrato seco desengordurado, enquanto que a CCS foi analisada através de citometria de fluxo.

Duas frações da amostra foram acondicionadas em dois frascos de 40 ml estéril sem conservantes e congeladas para posterior análise de teor de cloretos e teor de fósforo total. A parte restante da amostra, foi mantida refrigerada entre 3 a 8°C para análise dos parâmetros físicos (estabilidade ao teste do álcool, acidez titulável e pH) do leite após 12 horas. Para o teste do álcool, foi misturado 2 ml de leite e 2 ml de álcool em uma placa de Petri disposta sobre um fundo preto. A concentração das soluções de álcool utilizadas (56 a 86%), foram preparadas com concentrações variando em intervalos de 2%. As amostras de leite analisadas pelo teste do álcool foram consideradas instáveis quando houve a formação de grumos. A acidez titulável foi determinada em °D, misturando-se 10 ml da amostra de leite, 4 a 5 gotas de fenolftaleína 1%, sendo a mistura resultante titulada com uma solução de NaOH 0,1 mol/L até aparecimento de coloração rósea persistente por aproximadamente 30 segundos. O pH foi mensurado por potenciometria, com um peagâmetro (Kasvi K39-00PHC, Kasvi, Brazil).

O teor de cloretos foi analisado pelo método de Mohr modificado, utilizando condutivímetro para identificar o ponto final da titulação. Para essa análise foram adicionados 20 ml de leite e 5 gotas de ácido nítrico em 250 ml de água destilada. Titulou-se a solução resultante com nitrato de prata 0,08 mol/L. Calculou-se a concentração de cloretos através da seguinte fórmula: cloretos (g/l) = V x 0,142.

Para a determinação de fósforo total em g/kg, as amostras de leite foram digeridas misturando-se 0,5 ml de leite com 1 ml de ácido nítrico 65% em um tubo de ensaio. O tubo contendo a mistura foi colocado em um banho-maria com água em ebulição por 1,5h (Hamay *et al.*, 2000). Posteriormente, as amostras digeridas foram diluídas em água ultrapura na proporção (1:4). A concentração de fósforo (TP) foi determinada usando um kit comercial (Fósforo UV *Liquiform*, Lagoa Santa, MG, Brasil) seguindo as recomendações do fabricante. A absorbância de cada amostra foi lida em 340 nm utilizando um espectrofotômetro NanoDrop 2000 (*Thermo Scientific*<sup>TM</sup>, Wilmington, DE, USA) (Malacarne *et al.*, 2015).

#### **2.4.1 Análise Estatística**

Os dados foram tabulados em planilha eletrônica constituindo um banco de dados conjunto de todas as propriedades envolvidas nos experimentos. Além dos dados de produção, composição, propriedades físico-químicas e CCS do leite, foram incluídos dados referentes aos animais (grupamento genético e OP e número de dias em lactação). Os dados de CCS foram transformados para ECS, pela equação  $ECS = \log_2 (CCS/100) + 3$ . Os DEL foram subdivididos em intervalos semanais, sendo categorizados da seguinte forma: semana 1 (4 a 7

dias), semana 2 (8 a 14 dias), semana 3 (15 a 21 dias), semana 4 (22 a 28 dias) e semana 5 (29 a 35 dias). As ordens de parto foram agrupadas em um, dois e três ou mais partos.

Os dados foram submetidos à análise de variância, como medida repetida no tempo, sendo consideradas as amostras de forma individual por vaca, empregando-se o procedimento MIXED do pacote estatístico *Statistical Analysis System* (SAS), sendo previamente testados para normalidade de resíduos pelo Teste *Kolmogorov Smirnov*. O modelo foi composto pela semana de lactação, OP, pela interação entre semana, OP e grupamento genético aninhado dentro do município, sendo a vaca considerada como variável aleatória, aninhada dentro da propriedade.

Os grupamentos genéticos (Holandês, Jersey e Mestiço Holandês X Jersey) variaram entre os municípios analisados e, portanto, a inclusão no modelo visou não considerar o efeito das diferenças raciais sobre as variáveis analisadas, por não permitirem a comparação entre os grupamentos genéticos, visto que, o experimento não foi delineado com esta finalidade. As médias das semanas e das ordens de parto foram comparadas pelo teste de *Tukey* ao nível de 5% de significância.

## 2.5 RESULTADOS

A análise descritiva da OP, DEL, produção, composição e parâmetros físicos do leite nas primeiras 5 semanas de lactação. Os valores médios da estabilidade ao teste do álcool e acidez titulável nas primeiras cinco semanas de lactação, não atende aos padrões mínimos estabelecidos pela legislação vigente (Tabela 1).

Tabela 1. Estatística descritiva das variáveis analisadas nas amostras individuais de leite por vaca.

(Continua)

Variável	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
OP	2,8	1,21	1	7
Produção (Kg/dia)	35,54	13,82	10	69,1
DEL	20,11	8,6	4	35
Álcool (%)	69,69	6,24	58	84

Dias em lactação (DEL), Ordem de parto (OP), produção de leite (produção), estabilidade ao teste do álcool (álcool), acidez titulável (acidez), potencial hidrogeniônico (pH) sólidos totais (ST), sólidos não gordurosos (SNG), escore de célula somática no logaritmo de base 2 (ECS\_Log2), contagem de células somáticas (CCS)  
Fonte: Elaborada pela autora (2024)

Tabela 1. Estatística descritiva das variáveis analisadas nas amostras individuais de leite por vaca.

(Continuação)

Variável	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Acidez ( <sup>0</sup> D)	18,15	3,7	11,6	30
pH	6,48	0,42	5,2	7
Gordura_(%)	3,47	0,97	0,7	7,23
Proteína_(%)	3,26	0,45	2,34	5,14
Lactose_(%)	4,53	0,31	2,94	5,18
ST_(%)	12,23	1,18	9,05	16,73
SNG_(%)	8,74	0,51	7,39	10,11
CCS x1000	474,56	1016,06	2	9998
ECS	3,32	2,45	-2,05	9,64
Caseína_(%)	2,59	0,38	1,94	4,17
Cloretos (g/L)	0,86	0,19	0,28	1,78
Fósforo_(g/L)	0,14	0,05	0,015	0,033

Dias em lactação (DEL), Ordem de parto (OP), produção de leite (produção), estabilidade ao teste do álcool (álcool), acidez titulável (acidez), potencial hidrogeniônico (pH) sólidos totais (ST), sólidos não gordurosos (SNG), escore de célula somática no logaritmo de base 2 (ECS\_Log2), contagem de células somáticas (CCS)  
 Fonte: Elaborada pela autora (2024)

Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) para produção de leite, teor de gordura, ST, cloretos, fósforo, estabilidade do leite ao teste do álcool, acidez titulável, pH, ECS ao longo das primeiras 5 semanas de lactação (Tabela 2).

Os teores de proteína, caseína e lactose também variaram entre as semanas, porém houve interação significativa com a ordem de parto ( $P < 0,05$ ). As concentrações de cloretos e fósforo no leite não diferiram significativamente ( $P > 0,05$ ) ao longo das semanas (Tabela 2).

Tabela 2. Média  $\pm$  erro padrão da média e valor de P para a produção, composição, propriedades físico-químicas do leite e escore de células somáticas nas primeiras 5 semanas de lactação.

Variável	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	P-value		
						Semana	OP	OP*Semana
Produção (Kg/dia)	24,60 $\pm$ 2,19 <sup>C</sup>	27,16 $\pm$ 1,89 <sup>BC</sup>	30,95 $\pm$ 1,89 <sup>AB</sup>	33,93 $\pm$ 1,89 <sup>A</sup>	33,69 $\pm$ 1,89 <sup>A</sup>	0,0001	0,02	0,99
Gordura (%)	4,18 $\pm$ 0,21 <sup>A</sup>	3,65 $\pm$ 0,19 <sup>AB</sup>	3,59 $\pm$ 0,16 <sup>B</sup>	3,47 $\pm$ 0,15 <sup>B</sup>	3,29 $\pm$ 0,18 <sup>B</sup>	0,001	0,03	0,28
Proteína (%)	4,00 $\pm$ 0,07 <sup>A</sup>	3,58 $\pm$ 0,07 <sup>B</sup>	3,34 $\pm$ 0,06 <sup>C</sup>	3,20 $\pm$ 0,05 <sup>D</sup>	2,98 $\pm$ 0 <sup>E</sup>	<.0001	0,77	0,03
Caseína (%)	3,29 $\pm$ 0,07 <sup>A</sup>	2,86 $\pm$ 0,06 <sup>B</sup>	2,65 $\pm$ 0,05 <sup>C</sup>	2,54 $\pm$ 0,05 <sup>D</sup>	2,36 $\pm$ 0,06 <sup>E</sup>	<.0001	0,47	0,009
Lactose (%)	4,25 $\pm$ 0,06 <sup>C</sup>	4,50 $\pm$ 0,05 <sup>B</sup>	4,59 $\pm$ 0,05 <sup>AB</sup>	4,57 $\pm$ 0,04 <sup>AB</sup>	4,66 $\pm$ 0,04 <sup>A</sup>	<.0001	0,02	0,003
Álcool (%)	65,01 $\pm$ 1,38 <sup>C</sup>	69,16 $\pm$ 1,18 <sup>B</sup>	69,83 $\pm$ 0,87 <sup>B</sup>	73,24 $\pm$ 0,88 <sup>A</sup>	75,22 $\pm$ 1,13 <sup>A</sup>	<.0001	0,42	0,24
Acidez ( <sup>o</sup> D)	23,73 $\pm$ 0,71 <sup>A</sup>	19,96 $\pm$ 0,61 <sup>B</sup>	18,09 $\pm$ 0,51 <sup>C</sup>	16,43 $\pm$ 0,51 <sup>D</sup>	15,09 $\pm$ 0,59 <sup>D</sup>	<.0001	0,89	0,48
pH	6,42 $\pm$ 0,08 <sup>B</sup>	6,44 $\pm$ 0,06 <sup>B</sup>	6,54 $\pm$ 0,04 <sup>AB</sup>	6,64 $\pm$ 0,04 <sup>A</sup>	6,51 $\pm$ 0,05 <sup>AB</sup>	0,023	0,543	0,058
SNG (%)	9,43 $\pm$ 0,10 <sup>A</sup>	9,11 $\pm$ 0,08 <sup>B</sup>	8,94 $\pm$ 0,08 <sup>B</sup>	8,76 $\pm$ 0,07 <sup>C</sup>	8,58 $\pm$ 0,08 <sup>D</sup>	<.0001	0,61	0,01
ST (%)	13,56 $\pm$ 0,23 <sup>A</sup>	13,81 $\pm$ 0,21 <sup>B</sup>	12,55 $\pm$ 0,19 <sup>BC</sup>	12,21 $\pm$ 0,17 <sup>CD</sup>	11,92 $\pm$ 0,21 <sup>D</sup>	<.0001	0,11	0,41
Cloretos (g/L)	0,86 $\pm$ 0,04 <sup>A</sup>	0,86 $\pm$ 0,04 <sup>A</sup>	0,83 $\pm$ 0,03 <sup>A</sup>	0,87 $\pm$ 0,03 <sup>A</sup>	0,81 $\pm$ 0,03 <sup>A</sup>	0,44	0,65	0,88
Fósforo (g/L)	0,14 $\pm$ 0,01 <sup>A</sup>	0,15 $\pm$ 0,01 <sup>A</sup>	0,13 $\pm$ 0,01 <sup>A</sup>	0,12 $\pm$ 0,01 <sup>A</sup>	0,12 $\pm$ 0,01 <sup>A</sup>	0,17	0,23	0,22
ECS	3,75 $\pm$ 0,44 <sup>A</sup>	2,79 $\pm$ 0,40 <sup>AB</sup>	2,66 $\pm$ 0,37 <sup>B</sup>	3,07 $\pm$ 0,35 <sup>AB</sup>	2,96 $\pm$ 0,40 <sup>AB</sup>	0,050	0,02	0,051

Dias em lactação (DEL), Ordem de parto (OP), produção de leite (produção), estabilidade ao teste do álcool (álcool), acidez titulável (acidez), potencial hidrogeniônico (pH) sólidos totais (ST), sólidos não gordurosos (SNG), escore de células somáticas (ECS). Fonte: Elaborada pela autora (2024)

A produção de leite aumentou ao longo das semanas, estabilizando-se a partir da terceira semana de lactação. Em contraste, a concentração de gordura apresentou valor mais elevado na primeira semana de lactação, estabilizando-se a partir da segunda semana. Os teores de ST também apresentaram redução a partir da primeira semana de lactação, porém sua estabilização se deu somente a partir da quarta semana de lactação (Tabela 2).

As propriedades físico-químicas do leite apresentaram variações expressivas no início da lactação. A estabilidade do leite no teste do álcool apresentou valor médio de  $65,01 \pm 1,38\%$  na primeira semana. A partir da segunda semana houve aumento na estabilidade, mas somente na quarta semana atingiu um valor mínimo estabelecido pela legislação para comercialização do leite, com valores semelhantes na quinta semana (Tabela 2).

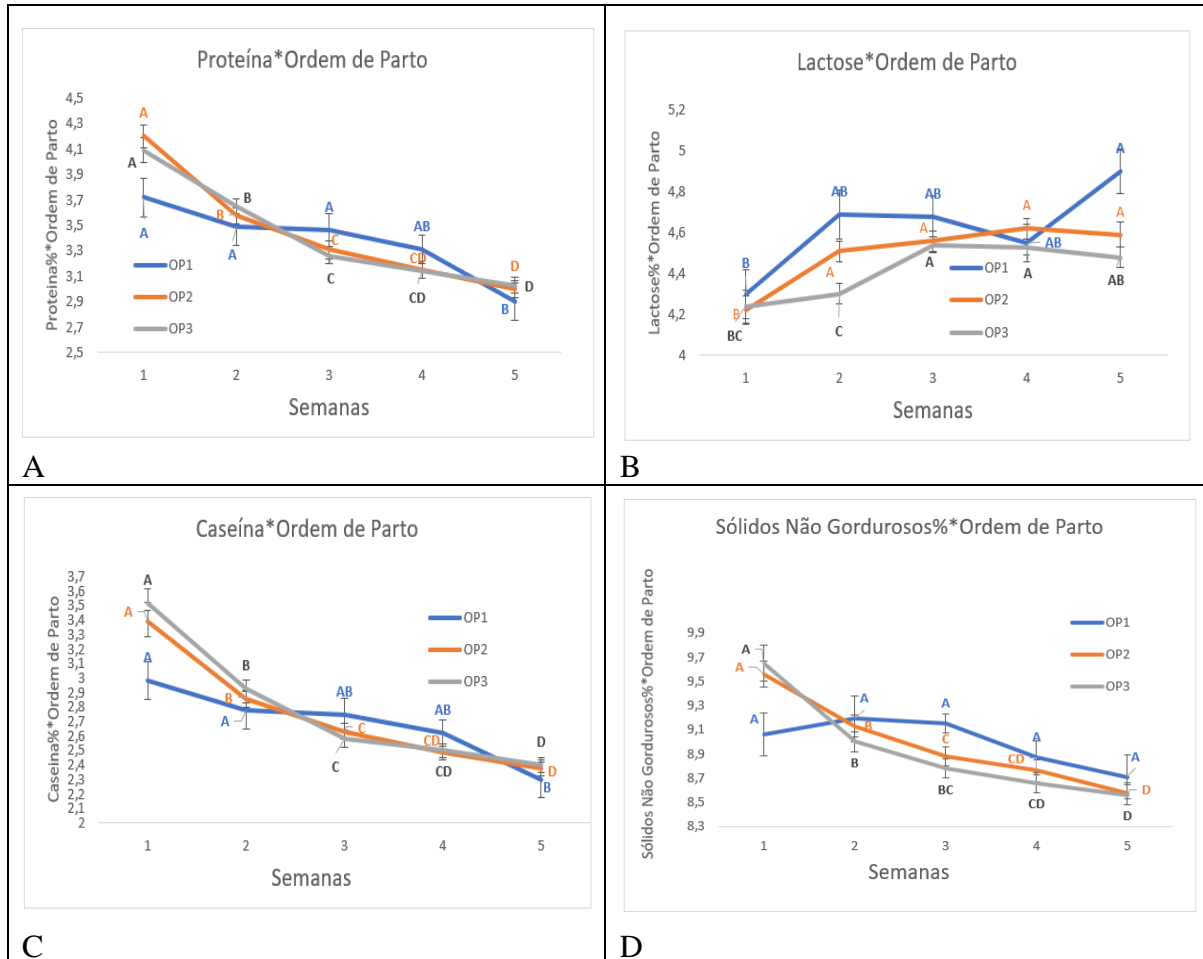
A acidez titulável do leite apresentou valores muito elevados ( $23,73 \pm 0,7$ ), especialmente na primeira semana de lactação, com pH muito baixo de modo correspondente ( $6,42 \pm 0,08$ ). A partir da segunda semana, iniciou a redução da acidez titulável e aumento do pH do leite. Porém, enquanto o pH do leite se estabilizou a partir da terceira semana de lactação, a acidez titulável apresentou estabilização somente na quarta semana, quando atingiu valor médio inferior ao estabelecido pela IN 76/2018 que é de no máximo  $18^{\circ}\text{D}$  (Tabela 2).

O ECS foi maior na primeira semana, se estabilizando a partir da segunda até a quinta semana. Houve interação significativa entre a semana de lactação e a OP para as variáveis teor de proteína, caseína, lactose e SNG. Observou-se que vacas de todas as ordens de parto apresentaram uma redução na concentração de proteína nas primeiras semanas de lactação, com estabilização a partir da quarta semana. Vacas múltiparas iniciaram a lactação com maiores teores de proteína em comparação às primíparas (Figura 2A). De modo similar, o teor de caseína também diminuiu ao longo das semanas, independente da OP. Vacas múltiparas iniciaram a lactação com níveis mais elevados de caseína em comparação às primíparas, estabilizando-se a partir da quarta semana. Por outro lado, vacas primíparas começam com uma menor concentração de caseína, mas apresentam uma persistência maior, estabilizando-se na terceira semana (Figura 2C).

Observou-se a tendência de o teor de lactose aumentar ao longo das primeiras semanas, independente da OP. No entanto, as variações no teor de lactose entre as OP's são mais pronunciadas na primeira e na quinta semana, sendo que as primíparas apresentaram teores de lactose superiores em relação às múltiparas (Figura 2B). Vacas múltiparas apresentaram maiores teores de SNG na primeira semana em comparação às primíparas. Porém, apresentaram redução nos teores de SNG conforme aumento das semanas de lactação, enquanto que vacas primípara não reduziram os teores de SNG estas últimas tendem a manter níveis mais elevados

ao longo das semanas (Figura 2D). Médias seguidas de letras diferentes entre semanas diferem entre si ( $P < 0,05$ )

Figura 2. Interações entre ordem de parto e semana para proteína (kg/dia) (A), entre ordem de parto e semana para lactose (%) (B), entre ordem de parto e semana para caseína (%) (C) e ordem de parto e semana para sólidos não gordurosos (°D).



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

## 2.6 DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi investigar a composição e as propriedades físico-químicas do leite ao longo das cinco primeiras semanas de lactação, pois é o período em que ocorrem mudanças mais acentuadas no leite. Pelo nosso conhecimento este estudo é pioneiro na avaliação de propriedades físicas do leite, em especial a resistência ao teste do álcool e a acidez titulável em um número expressivo de amostras individuais de leite de vacas nas primeiras semanas de lactação, atributos estes importantes para permitir a comercialização do

leite em conformidade com as normas estabelecidas pelas INs 76 e 77/2018 do MAPA (Brasil, 2018; Brasil, 2018b).

Embora o leite proveniente de vacas que se encontram nas 3 primeiras semanas de lactação possa ser comercializado, ele ainda não atinge estabilidade adequada para o processamento térmico (Tabela 2). A estabilidade ao teste do álcool apresenta grandes variações no início da lactação, estabilizando-se apenas a partir da quarta semana de produção. Esse resultado pode ser prejudicial ao produtor, já que a estabilidade ao teste do álcool é um dos principais critérios de qualidade utilizados pela indústria, sendo comumente avaliada na própria propriedade por meio do teste do alizarol.

Alguns trabalhos já haviam demonstrado a existência de desafios em relação à estabilidade do leite ao teste do álcool no início da lactação, porém não foram delineados para mostrar a partir de quando esta estabilidade pode ser atingida. (Tsioulpas; Lewis; Grandison, 2007) relataram uma estabilidade ao teste do álcool de 76% em amostras coletadas de vacas aos 15 dias pós-parto. Em concordância, Heisler *et al.* (2017) demonstraram que a estabilidade ao álcool foi de 72% e 76% aos 11 dias e 21 dias após o parto, respectivamente. Essa instabilidade inicial pode estar relacionada ao fato de que, nos primeiros dias após o parto, a vaca produz colostro, um fluido rico em proteínas, especialmente imunoglobulinas (IgG), essenciais para fornecer imunidade passiva ao bezerro. O colostro possui uma alta concentração de proteínas do soro, como lactoferrina e albumina, e uma menor proporção de caseína em comparação ao leite produzido nas fases mais avançadas da lactação. Conforme o colostro se transforma em leite de transição, ocorre uma diminuição significativa na concentração de IgG e outras proteínas imunológicas. Durante esse período, que geralmente dura de 5 a 10 dias, a proporção de proteínas do soro diminui, enquanto a quantidade de caseína aumenta (Tsioulpas; Lewis; Grandison, 2007).

Em propriedades com produção leiteira contínua ao longo do ano, essa instabilidade nas primeiras semanas de lactação tende a ter pouco impacto, já que o número de vacas parindo é relativamente pequeno em comparação ao total de vacas em lactação, o que contribui para uma diluição dos efeitos no tanque de leite. Schmitz, (2023) avaliou a estabilidade do leite no início e no final da lactação, testando diferentes níveis de inclusão de leite com estabilidade inferior ao leite de tanque. Os resultados indicaram que a inclusão de leite com estabilidade reduzida em percentuais iguais ou superiores a 20% pode impactar a estabilidade do leite armazenado. Portanto, para que haja alterações detectáveis na estabilidade do leite do tanque, é necessário que mais de 20% do volume seja composto por leite instável, proveniente de vacas no início da lactação. Em propriedades com poucas parições mensais é pouco provável que o leite do tanque



seja significativamente afetado. No entanto, em sistemas de parições sazonais, onde há uma maior concentração de partos em determinados períodos do ano, a taxa de diluição é menor podendo chegar a mais de 20%, o que pode acentuar as alterações no teste de estabilidade do álcool, impactando a qualidade geral do leite produzido.

Por outro lado, a acidez titulável do leite inicia elevada nas primeiras semanas, estabilizando-se a partir da quarta semana, quando atinge os parâmetros determinados pelas normativas. No início da lactação, o teor elevado de caseínas, albúmina, fosfatos, citratos e dióxido de carbono contribuem para uma acidez superior do leite em comparação com os estágios posteriores da lactação (Fox; Shook; Schultz, 1985). O estudo de Schmitz, (2023) considerando o grupamento genético, destacou maior acidez no início da lactação, até 60 dias, em vacas da raça Holandesa e mestiças em comparação com Jersey.

Em nosso estudo encontramos baixo pH no leite da primeira semana de lactação, assim como no trabalho de Beloti, (2015) que observou um pH de colostro entre 6,0 a 6,3, com aumento posterior. A concentração dos componentes do leite, como dióxido de carbono, proteínas, fosfatos e citratos, exerce uma influência significativa sobre a acidez do leite. O aumento na concentração desses componentes está diretamente relacionado com maior acidez do leite, diminuindo o pH (Harris; Bachman, 2003).

O elevado nível de ECS na primeira semana pós parto pode ser atribuído a um possível aumento nas células de defesa presentes no leite logo após o parto. (Tommasoni *et al.*, 2023) relatam que altas contagens de células no início da lactação podem ser devido à excreção excessiva de células epiteliais em um pequeno volume de leite. Segundo (Ruegg; Pantoja, 2013), imediatamente após o parto, a CCS pode exceder 1.000.000 células por mililitro (células/ml) de leite. No entanto, em vacas saudáveis, a CCS tende a retornar a níveis abaixo de 100.000 células/ml dentro de 7 a 10 dias após o parto.

O aumento na produção média de leite ao longo das primeiras semanas de lactação é um fenômeno bem conhecido na pecuária leiteira, no entanto, considerando que no presente estudo, as avaliações foram realizadas somente até a quinta semana de lactação, não foi possível determinar quando ocorreu o pico de produção de leite dos animais avaliados. O aumento na produção de leite, observado nas vacas ao longo da lactação, pode ser atribuído ao processo de adaptação metabólica que ocorre nos primeiros estágios da lactação, no qual a produção melhora à medida que a lactação avança (Tekerli *et al.*, 2000). Autores relatam que a quantidade de leite produzida aumenta após o parto, com uma produção máxima do primeiro ao segundo mês, que depois decresce conforme a lactação avança (Beloti, 2015; Macciotta; Vicario; Cappio-Borlino, 2005).

O teor de lactose mais baixo no início da lactação pode estar relacionado ao período de transição de colostro para leite, visto que o colostro bovino apresenta teor de lactose substancialmente mais baixo do que o leite (Alessio *et al.*, 2016). Os teores de lactose em leite produzido nas primeiras semanas de lactação de vacas primíparas, foram menores do que nas vacas a partir da segunda cria, o que pode estar relacionado ao fato de que o leite produzido por vacas mais velhas apresenta menores teores de lactose, condição que pode estar relacionada ao avanço da idade das vacas, uma vez que com o passar dos anos as mesmas tendem a ter CCS mais elevada, deprimindo assim o teor de lactose. Porém, Alessio *et al.* (2016) demonstraram que a diminuição do teor de lactose com o aumento do número de lactações ocorre também em vacas com baixa CCS.

Os teores mais elevados de lactose em vacas primíparas, em comparação com vacas multíparas, podem ser explicados pela maior disponibilidade de glicose endógena. Isso ocorre porque as vacas primíparas ainda não expressam todo o seu potencial produtivo, o que resulta em uma menor demanda de glicose corporal. Em vacas multíparas de alta produção, a glicose disponível é utilizada prioritariamente como substrato para a síntese de lactose (Qiao *et al.*, 2005). Além disso, a lactose é o principal determinante do volume de leite, então vacas com menor produção podem ter menor níveis de lactose, de acordo com a lactose é componente osmótico primário do leite, é o principal determinante do volume de leite.

A maior concentração de gordura na primeira semana de lactação pode estar relacionada ao fato de o teor de gordura no colostro ser elevado (Arslan *et al.*, 2021), podendo ainda haver algum efeito relacionado a transição de colostro para leite. Além disso, a correlação fenotípica entre produção de leite é negativa, sendo que a medida em que aumenta a produção de leite diminui o teor de gordura. Conforme Behmer (1987), a curva de concentração de gordura é inversamente proporcional à produção de leite, visto que a produção aumenta até o pico, e em seguida, declina ao longo da lactação, enquanto que próximo ao pico o teor de gordura atinge valores menores.

O teor de proteína e o de caseína no leite diminuiu progressivamente ao longo das primeiras semanas de lactação independente da OP, porém vacas multíparas tendem a iniciar a lactação com maior concentração de proteína e as primíparas tendem a ter maior persistência da concentração de proteína. Esse decréscimo na concentração proteica pode ser atribuído ao fato de que o colostro e o leite de transição possuem uma maior concentração de proteínas, o que leva um tempo para se estabilizar durante a lactação, cerca de 5 a 10 semanas, correspondendo inversamente à produção máxima de leite. Depois disso, a quantidade de proteína tende a aumentar gradualmente conforme a lactação progride (Linn, 1988). O

decréscimo dos teores de proteína conforme avança o DEL é relatado na literatura, Tsioulpas; Grandison; Lewis, (2007) observaram que a proteína total atingiu níveis normais ( $3,08\% \pm 0,19\%$ ) aos 30 dias após o parto, enquanto Heisler *et al.* (2017) relataram teores de 3,4% aos 21 dias após o parto.

O teor de ST do leite diminui nas primeiras semanas de lactação, estabilizando a partir da terceira semana. Observa-se que a concentração desses sólidos é maior tanto no início quanto no final da lactação, períodos em que a produção de leite é menor, o que aumenta a concentração dos componentes (Beloti, 2015a).

A concentração de SNG também é maior na primeira semana, independentemente da OP, com redução e estabilização a partir da terceira semana. Vacas multíparas tendem a começar a lactação com concentrações mais altas de SNG, enquanto primíparas apresentam maior persistência desses níveis, refletindo um padrão semelhante ao das proteínas. Os SNG incluem e são influenciados pela presença de proteínas, caseínas, lactose e minerais, cuja composição pode ser influenciada também pela dieta e manejo nutricional das vacas. Um aumento na proteína bruta do leite tende a elevar os SNG, uma vez que a mesma é um dos principais constituintes desses sólidos (Costa *et al.* 2011). De acordo com De Pádua *et al.* (2019), ajustes na dieta que melhoram a qualidade da proteína fornecida às vacas aumentam os níveis de proteína total no leite, resultando em maior quantidade de SNG.

## 2.7 CONCLUSÃO

Nas três primeiras semanas de lactação o leite das vacas apresenta baixa estabilidade ao teste do álcool e elevada acidez titulável. Nas primeiras semanas de lactação, paralelamente ao aumento na produção de leite, ocorre incremento no teor de lactose e redução nos níveis dos demais sólidos do leite, como gordura, proteína e caseína.

Os resultados deste estudo demonstram que sistemas de produção em que ocorrem concentrações muito elevadas de parição podem ser desafiadores em termos de atendimento aos padrões exigidos pelas normas brasileiras de qualidade do leite, especialmente quanto à conformidade aos padrões estabelecidos para os atributos físico-químicos do leite.

## CAPÍTULO III

### 3 ESTABILIDADE DO LEITE AO TESTE DO ÁLCOOL E SUA RELAÇÃO COM OS DEMAIS INDICADORES DE QUALIDADE DO LEITE EM AMOSTRAS DE TANQUES DE RESFRIAMENTO: ANÁLISE DE DADOS DE EXPERIMENTOS.

#### 3.1 RESUMO

Esse artigo aborda a importância da estabilidade ao teste do álcool como um parâmetro fundamental para avaliar a qualidade do leite cru, tanto em propriedades rurais quanto em plataformas de recebimento em laticínios. A legislação brasileira exige que o leite apresente estabilidade mínima em concentrações de 72% de álcool, simulando o efeito do aquecimento durante a pasteurização e assegurando a integridade da caseína. O objetivo deste estudo foi identificar fatores relacionados à estabilidade do leite ao teste do álcool em amostras de tanques de resfriamento. A pesquisa avaliou um conjunto de dados totalizando 1.760 amostras de tanques de resfriamento, coletadas em propriedades leiteiras localizadas no Estado de Santa Catarina e em diferentes estações do ano, identificando variações sazonais significativas na estabilidade ao teste do álcool. As amostras apresentaram menor estabilidade no outono e inverno. Os resultados evidenciaram uma relação positiva entre proteína, gordura e acidez. A CCS e a CPP têm relação positiva entre si e relação inversa com os níveis de lactose. A estabilidade ao teste do álcool tem relação positiva com a concentração de lactose, sugerindo que amostras com maior teor de lactose são mais estáveis. A pesquisa mostrou que a instabilidade do leite ao teste do álcool nem sempre está associada à acidez elevada, caracterizando o fenômeno conhecido como LINA. A estabilidade ao teste do álcool independe da saúde da glândula mamária e da qualidade microbiológica do leite. A análise multivariada demonstrou ser uma ferramenta valiosa para entender as relações complexas entre as diferentes características do leite e sua estabilidade ao teste do álcool, proporcionando uma melhor compreensão dos fatores que influenciam a qualidade do leite.

**Palavras-chave:** Leite Instável Não Ácido, Acidez Titulável, e Análise de fator

### 3.2 ABSTRACT

This paper highlights the importance of milk stability to the alcohol test as a fundamental parameter for assessing raw milk quality, both on farms and in the dairy industry. Brazilian legislation requires that milk demonstrate at least 72% stability in the alcohol test, which simulates the effects of heating during pasteurization and ensures the integrity of casein. The objective of this study was to identify factors related to milk stability in the alcohol test using samples from bulk tanks. The research analyzed a dataset of 1,760 samples from bulk tanks of dairy farms in Santa Catarina state, across different seasons, identifying significant seasonal variations in milk stability to the alcohol test. The samples exhibited lower stability in autumn and winter. The results revealed a positive relationship between protein, fat, and titratable acidity. Somatic cell count (SCC) and total bacterial count (TBC) showed a positive correlation with each other and a negative correlation with lactose content. Milk stability in the alcohol test was positively associated with lactose concentration, suggesting that samples with higher lactose content are more stable. The study also showed that milk instability in the alcohol test is not always linked to high acidity, indicating the phenomenon known as unstable non-acid milk. Milk stability in the alcohol test was found to be independent of mammary gland health and the microbiological quality of the milk. Multivariate analysis proved to be a valuable tool for understanding the complex relationships between different milk characteristics and stability in the alcohol test, providing deeper insights into the factors that influence milk quality.

**Keywords:** Non-Acidic Unstable Milk, Titratable Acidity, and Principal Component Analysis

### 3.3 INTRODUÇÃO

A estabilidade do leite ao teste do álcool é um parâmetro físico-químico amplamente utilizado na indústria para avaliar a qualidade do leite, tanto nas fazendas leiteiras, quanto nas plataformas de recebimento. No Brasil, a legislação estabelece que o leite deve ser estável quando submetido a uma concentração alcoólica mínima de 72% para garantir a estabilidade da caseína, simulando os efeitos do aquecimento durante o processo de (Brasil, 2018b)

A estabilidade do leite cru é um parâmetro fundamental para determinar sua adequação ao processamento industrial, especialmente em produtos que demandam alta resistência ao tratamento térmico, como o leite UHT. O leite instável ao álcool é frequentemente rejeitado pelos laticínios devido à instabilidade da caseína, uma vez que a mesma, ao ser submetida ao aumento de temperatura durante o processamento, precipita-se e forma uma película nos trocadores de calor. Essa película, além de reduzir a eficiência do tratamento térmico, atua como isolante, intensificando o sabor de cozido do leite e dificultando o processo de higienização, favorecendo assim o desenvolvimento de biofilmes e a proliferação microbiana (Silva *et al.*, 2012). Além disso, essa precipitação durante o processamento UHT pode resultar na aderência do produto ao equipamento, elevando os custos com limpeza e também descarte de leite (Dadousis *et al.*, 2017). A temperatura e o tratamento térmico podem alterar a estrutura das micelas de caseína, afetando a resistência do leite à coagulação (Brasil; Nicolau; Da Silva, 2015; Holt, 2016).

Vários fatores podem influenciar essa estabilidade. Alterações nas concentrações de sais minerais, como cálcio, decorrentes de desequilíbrios fisiológicos, metabólicos e nutricionais, afetam diretamente a estabilidade do leite (Zanela *et al.*, 2009) O Ph Também Desempenha Papel Importante, Com Maior Estabilidade Observada Quando O Mesmo Se Apresenta Mais Elevado (Schmitz, 2023). Já O Aumento Do Cálcio Iônico Reduz A Estabilidade, Favorecendo A Coagulação (Schmitz, 2023; (Martins *et al.*, 2024), Pode Ocorrer Também Redução De Lactose (Schmitz, 2023; Schmitz *et al.*, 2024; Martins *et al.*, 2019, 2024), Redução De Caseína (Oliveira *et al.*, 2013), Aumento De (Oliveira *et al.*, 2013), Aumento De Proteína (Li; Ye; Singh, 2019) Ou Redução Da Mesma (dos Santos; da Fonseca, 2019). Barbosa *et al.* (2009; Schmidt *et al.* (2024) relatam que a estabilidade do leite é afetada pelo estágio da lactação da vaca.

Considerando que existem inúmeras variáveis que influenciam a estabilidade do leite ao realizar mais pesquisas é importante adicionar análise multivariadas nos métodos estatísticos podendo ser utilizados para melhor compreender as relações entre os fatores que afetam a

estabilidade do leite ao teste do álcool. As análises de estabilidade ao teste do álcool, assim como de acidez titulável, são testes frequentemente utilizados para garantir que o leite atinja o padrão de qualidade mínimo aceitável pelas normas brasileiras. Porém entender todas as características que influenciam essas análises bem como as interações múltiplas dessas características sobre a qualidade do leite é necessário, assim, novas pesquisas com o uso de técnicas multivariadas podem ser eficientes para esclarecer essas relações.

A análise multivariada disponibiliza diversas técnicas capazes de captar a estrutura de covariância em padrões complexos de variáveis. Algumas dessas técnicas permitem resumir as relações entre várias características em um número menor de novas variáveis explicativas, facilitando a interpretação do sistema multivariado original (Mele *et al.*, 2016). Quando se avalia um grande volume de informações, é necessário utilizar ferramentas estatísticas apropriadas para realizar inferências sobre as causas de variação e analisar os padrões de relacionamento. Entre as técnicas de análise multivariada, a análise fatorial pode ser uma opção valiosa nesse contexto (Macciotta *et al.*, 2012).

Na busca por obter leite com maior estabilidade térmica, muitas indústrias de laticínios têm aumentado a concentração alcoólica para elevar a rigidez do teste. Essa prática, no entanto, resulta em um maior percentual de leite rejeitado ou subvalorizado devido a problemas de instabilidade no teste alcoólico (Zanela; Ribeiro; Fischer, 2015). Devido ao fato de que a estabilidade do leite na cadeia produtiva do mesmo, é analisada somente como característica binária com concentrações alcoólicas que variam de uma indústria para outra, tanto no carregamento do leite na propriedade como para triagem na plataforma de recepção das indústrias, sendo limitados os bancos de dados para analisar a relação da estabilidade do leite com outras variáveis.

A análise de dados de conjuntos de experimentos, pode ser uma alternativa para uma melhor compreensão da estabilidade ao teste do álcool. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar fatores relacionados à estabilidade do leite ao teste do álcool em amostras de tanques de resfriamento.

### 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado com um conjunto de dados coletados a campo, provenientes de experimentos e avaliações previamente realizadas por pesquisadores vinculados ao Grupo de Estudo e Pesquisa em Bovinocultura de Leite do Centro de Ciências Agroveterinárias da

Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV/Udesc) e ao Núcleo de Pesquisa em Pecuária Leiteira e Comportamento Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

### **3.4.1 Descrição do Banco de Dados**

Foram utilizados 1.760 dados de amostras provenientes de leite de tanque, sendo estas advindas de 225 propriedades leiteiras, com observação para as variáveis: gordura, proteína, lactose, estabilidade ao teste do álcool, acidez titulável, CCS e CPP (Tabela1).

Os experimentos foram selecionados por utilizarem as mesmas metodologias de análise, bem como as mesmas variáveis. Foram utilizados somente dados de estudos de levantamento de dados em diferentes regiões do Estado de Santa Catarina, sem a imposição de qualquer tipo de tratamento ou seleção de propriedades por quaisquer características, exceto o fato de que em todos os estudos foram utilizadas estratégias para selecionar conjuntos de propriedades leiteiras que representassem a realidade da região quanto ao tamanho da propriedade, utilizando como critério a produção mensal de leite. Além destes atributos, para um estudo integrar o banco de dados ele deveria possuir dados de amostras de qualidade do leite em todas as quatro estações do ano. A partir destas restrições, foram selecionados dados de amostras de leite advindas de tanque de resfriamento de cinco estudos independentes, executados entre 2012 e 2024 nas regiões Oeste e Planalto Sul de Santa Catarina.

Os detalhes de tratamentos, análises, avaliações, condições experimentais, períodos de avaliação e locais podem ser encontrados nas respectivas dissertações e teses listadas a seguir: (Werncke, 2012), (Voges, 2015), (Abreu, 2015), (Orsolin, 2019) e (Danieli, 2024).

### **3.4.2 Análise de Dados**

Para a análise de dados, os valores de CCS e CPP foram transformados em logaritmos de base 10  $\log$ , visando a obtenção de normalidade. A classe estação do ano foi subdividida em: 1-verão (dezembro, janeiro e fevereiro) 2-outono (março, abril e maio) 3-inverno (junho, julho e agosto) e 4-primavera (setembro, outubro e novembro). Os dados foram analisados utilizando o software estatístico SAS® (SAS, 2002), com padronização para médias igual a 0 e variâncias igual a 1, empregando o procedimento PROC STANDARD. Para se chegar à concentração de álcool com a qual o leite resistiria sem coagular em função da estação do ano, as amostras foram submetidas à análise de variância com medidas repetidas no tempo, sendo considerado cada produtor de forma individual, utilizando o procedimento MIXED do software



estatístico SAS®. Previamente, as amostras foram testadas quanto à normalidade pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*. O modelo incluiu os efeitos de estação, da região do Estado e da interação entre estas variáveis. As médias das semanas foram comparadas utilizando o teste de *Tukey*, com um nível de significância de 5%.

Para avaliar a relação entre as variáveis de qualidade do leite, foi empregada a análise fatorial, técnica de análise multivariada. A análise foi realizada utilizando o procedimento FACTOR do pacote estatístico SAS®, com a rotação da matriz Promax. As variáveis foram agrupadas nos fatores mais correlacionados, e a adequação do modelo foi avaliada pelo índice *Kaiser-Meyer-Olkin* (KMO), que compara a magnitude dos coeficientes de correlação observados com os coeficientes de correlação parciais. A seleção das variáveis que compuseram os fatores baseou-se na comunalidade, que representa a proporção da variância explicada pelo fator comum.

O número de fatores foi determinado com base no autovalor, considerando-se aqueles superiores a um. Cargas fatoriais iguais ou superiores a 0,3 foram consideradas significativas, conforme Costa (2008), que indica que essa carga é apropriada para bancos de dados com mais de 350 observações. Gráficos dos fatores com maior comunalidade foram gerados para facilitar a interpretação dos resultados comparativos.

### 3.5 RESULTADOS

O banco de dados de indicadores de qualidade do leite, coletadas de tanques de resfriamento, em média, os valores de estabilidade ao teste do álcool encontram-se dentro dos limites estabelecidos pelas normativas vigentes (Tabela 1). No entanto, os valores mínimos e máximos mostram a grande variabilidade existente, sendo que 15,6% das amostras apresentaram resultados abaixo do mínimo estabelecido pelas normas brasileiras de qualidade do leite, quadro este caracterizado como LINA. Em relação à acidez titulável, o banco de dados foi filtrado para incluir apenas amostras com acidez igual ou inferior a 18 °D, a fim de eliminar a possibilidade de que o resultado do teste do álcool estivesse relacionado à presença de leite ácido.

Tabela 1 - Estatística descritiva do banco de dados das amostras de leite de tanques de resfriamento, com composição do leite, estabilidade ao teste do álcool, acidez titulável, CCS e CPP (n = 1760).

Variável	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Gordura (%)	4,1	0,44	1,88	5,93
Proteína (%)	3,44	0,31	2,5	5,05
Lactose (%)	4,4	0,15	3,57	4,94
CCS X 1000	552,7	399,91	14	5867
CPP X 1000	558,8	1261,83	1	9999
Álcool (%)	75,08	3,95	64	84
Acidez ( <sup>0</sup> D)	15,98	1,32	13	18
CCSlog10	5,64	0,3	4,14	6,76
CPPlog10	5,13	0,76	3	6,99

Estabilidade ao teste do álcool (álcool), acidez titulável (acidez), logaritmo de base 10 de contagem de células somáticas (CCS\_log10) e logaritmo de base 10 de contagem padrão em placas (CPP\_log10). Fonte: Elaborada pela autora (2024)

Ocorreu variação significativa ( $P < 0,05$ ) ao longo das estações de lactação para estabilidade ao teste do álcool, com valores menores no inverno, se comparada à primavera e verão e valores intermediários no outono.

Tabela 2 - Média dos quadrados mínimos e erro padrão da média para álcool em função de estação em amostras de tanque.

Estação	Estimativa	Erro Padrão da média
Inverno	74,16 <sup>B</sup>	0,34
Outono	75,11 <sup>AB</sup>	0,32
Primavera	75,21 <sup>A</sup>	0,26
Verão	75,20 <sup>A</sup>	0,23

As médias das estações foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Fonte: Elaborada pela autora (2024)

Na análise fatorial foram identificados três fatores que em conjunto, explicaram 61,80% da variância total (Tabela 3).

O modelo fatorial foi considerado adequado para o conjunto de variáveis utilizadas, conforme indicado pelo índice de KMO = 0,545. As variáveis analisadas apresentaram elevadas comunalidades, sendo a maioria superior a 50%, indicando que as variáveis desempenharam um papel fundamental na explicação da variância dos dados (Tabela 3).

As variáveis do Fator 1 com maior carga fatorial foram gordura, proteína e acidez. Esse fator apresenta uma relação positiva e elevada entre os teores de gordura e proteína, indicando que o aumento em uma das variáveis apresenta forte relação com o aumento da outra e vice-versa, enquanto a acidez demonstra uma relação positiva de intensidade moderada com os teores de gordura e proteína. O Fator 2 foi composto por CCS, CPP e lactose, em que CCS e CPP apresentaram uma relação positiva entre si, porém inversamente relacionadas ao teor de lactose. O Fator 3 inclui lactose, estabilidade ao teste do álcool e, em menor intensidade, a acidez, cujo componente é coerente devido ao fato de os dados de acidez estarem dentro dos limites desejáveis estabelecidos pelas normativas, indicando que leite de excelente qualidade, com alta estabilidade ao teste do álcool, tende a apresentar maiores concentrações de lactose (Tabela 3).

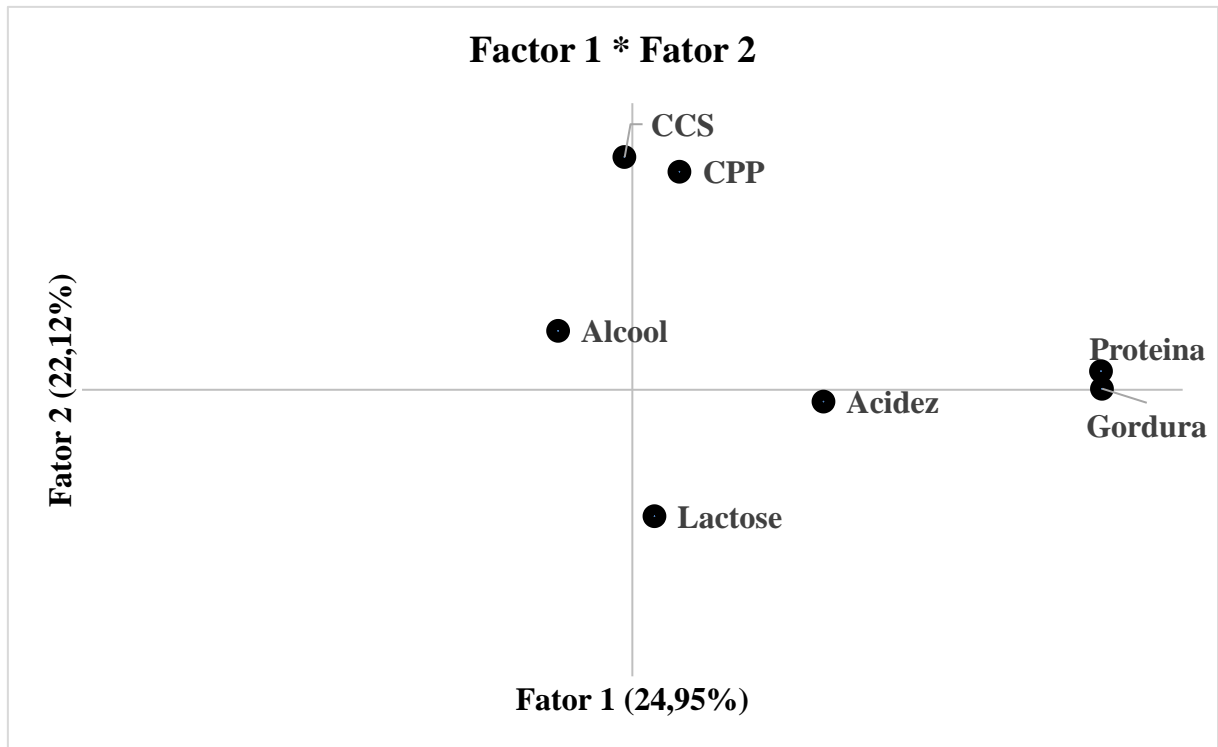
Tabela 3 - Análise de Fator das variáveis relacionadas à qualidade de leite em amostras de tanque.

Variável	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Comunalidade
Gordura	<b>0,855</b>	0,003	-0,01	0,731
Proteína	<b>0,854</b>	0,066	-0,013	0,726
Lactose	0,04	<b>-0,448</b>	<b>0,579</b>	0,63
Álcool	-0,134	0,208	<b>0,79</b>	0,627
Acidez	<b>0,348</b>	-0,041	<b>0,449</b>	0,343
CCSlog10	-0,013	<b>0,824</b>	-0,015	0,686
CPPlog10	0,086	<b>0,772</b>	0,114	0,58
% da variância explicada	0,2495	0,2212	0,1473	

Estabilidade ao teste do álcool (álcool), acidez titulável (acidez), logaritmo de base 10 de contagem de células somáticas (CCS\_log10) e logaritmo de base 10 de contagem padrão em placa (CPP\_log10). Fonte: Elaborada pela autora (2024)

A figura 1 plota a análise fatorial representando os dois primeiros fatores extraídos, no eixo X encontra-se o fator 1 explicando 24,95% da variância dos dados, já no eixo Y aparece o fator 2 explicando 22,12%, totalizando aproximadamente 47,07% da variância explicada. Fator 1 mostra as variáveis proteína e gordura, com uma relação positiva e próxima entre elas e demonstra relação das mesmas para com a acidez. No Fator 2 podem ser observadas as variáveis CCS e CPP que apresentam relação positiva entre elas e contrária à lactose. As variáveis descritas nos fatores 1 e 2, respectivamente, não apresentam relação entre si, estando todas próximas a um dos eixos. A resistência do leite ao teste de estabilidade do álcool não mostra relação com as demais variáveis nesses primeiros fatores.

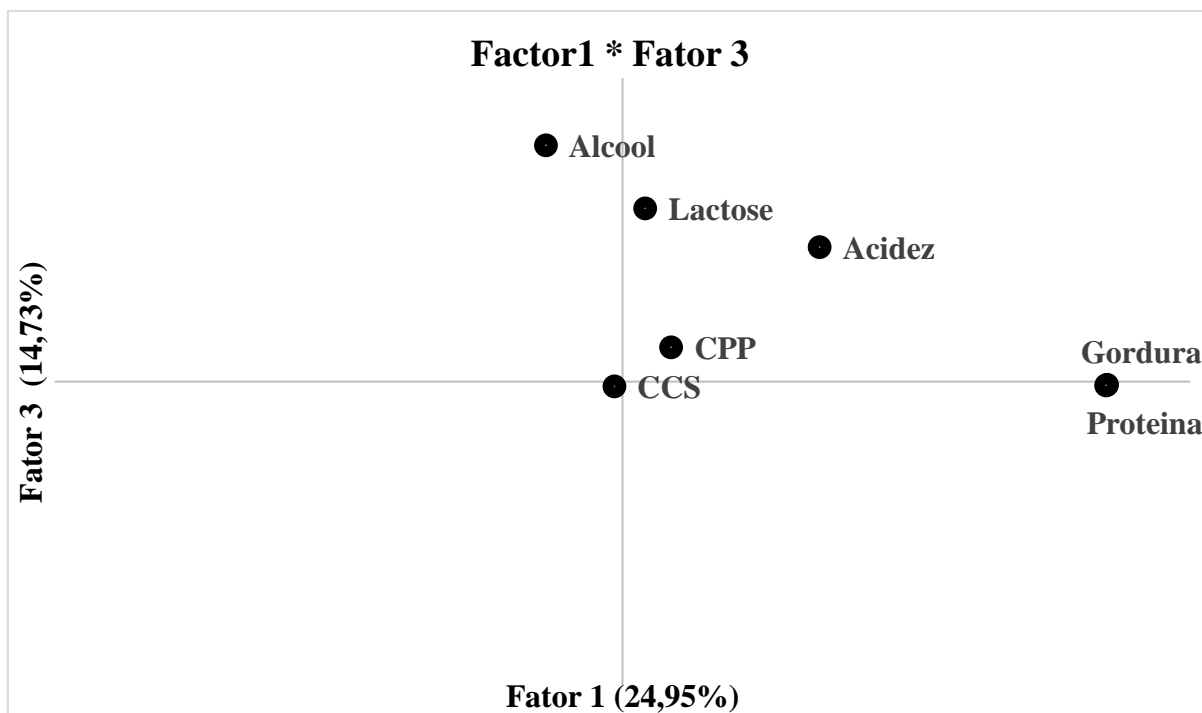
Figura 1 - Análise do Fator 1 e 2 para as variáveis gordura, proteína, lactose, estabilidade ao teste do álcool (álcool), acidez titulável (acidez), logaritmo de base 10 de contagem de células somáticas (CCS) e logaritmo de base 10 de contagem padrão em placas (CPP) relacionadas a qualidade de leite de tanque.



Fonte: Elaborada pela autora (2024)

A figura 2 plota a análise fatorial representando no eixo X o fator 1 explicando 24,95% da variância dos dados e no eixo Y fator 3 explicando 14,73%, totalizando aproximadamente 39,68% da variância explicada. Fator 1 continua com a proximidade das variáveis proteína e gordura e a acidez em menor intensidade, mostrando a relação positiva entre estas variáveis. O fator 3 demonstra a relação positiva das variáveis da estabilidade ao teste do álcool, lactose e acidez demonstrando que um leite estável tende a ter mais lactose. Pode-se observar na figura que a acidez tem relação positiva tanto com as variáveis do fator 1 como do fator 3. As variáveis CCS e CPP estão localizadas juntas, porém sem relação com as demais nesses dois fatores.

Figura 2 - Análise do Fator 1 e 3 para as variáveis gordura, proteína, lactose, estabilidade ao teste do álcool (álcool), acidez titulável (acidez), logaritmo de base 10 de contagem de células somáticas (CCS) e logaritmo de base 10 de contagem padrão em placa (CPP) relacionadas a qualidade de leite de tanque.



Fonte: Elaborada pela autora (2024)

### 3.6 DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho é identificar os principais fatores relacionados à estabilidade do leite ao teste do álcool e sua relação com os demais indicadores de qualidade do leite em tanques de resfriamento, no entanto há uma limitação do estudo, em razão de que os bancos de dados utilizados para elaboração do mesmo, consideraram somente as variáveis de qualidade do leite e a época do ano, sem informações ou registros sobre o nível de produção, técnicas de manejo e alimentação das propriedades, bem como os grupamentos genéticos que compõem cada um dos rebanhos.

Embora o teor médio de estabilidade ao teste do álcool no leite de tanques de resfriamento utilizados neste estudo tenha sido adequado (75,08%), houve uma variação considerável (64 - 84%). Como o conjunto de dados analisados foi composto apenas por amostras de leite com no máximo 18°D, o leite que compõe os 15,6% de amostras restantes, pode ser caracterizado como LINA, visto que, coagularam na presença de etanol com

concentração inferior à 72%, a qual é estabelecida pelas normas brasileiras de qualidade do leite como parâmetro mínimo para a comercialização e processamento do leite (Brasil, 2018; Brasil, 2018b). O LINA ocorre quando há uma perda de estabilidade da caseína durante o teste do álcool, resultando em uma precipitação positiva, mesmo sem a presença de acidez elevada, ou seja, com valores de acidez abaixo de 18°D (Zanela; Ribeiro; Fischer, 2015). Como na prática, usualmente os laticínios brasileiros utilizam concentrações mais elevadas de álcool, para a seleção do leite em nível de propriedade leiteira, o percentual real de unidades produtoras que podem vir a ter seu leite rejeitado pelas indústrias de laticínios, tende a ser mais elevado. Configurando-se em um problema de elevada relevância econômica para os produtores de leite.

Os resultados indicam uma menor estabilidade no teste do álcool durante as estações do outono e inverno, o que pode estar relacionado à disponibilidade de forragens. Especialmente e mais especificamente no final do outono e início do inverno, condição observada principalmente em propriedades com sistema de produção baseado em pastagem, podendo, portanto, ser um reflexo da entressafra na produção de forragem, coincidindo com a redução da qualidade e disponibilidade das espécies estivais e a baixa disponibilidade de forragem nas pastagens hibernais que estão iniciando seu ciclo, ainda não atingindo seu pleno desenvolvimento (Silva *et al.*, 2019). Desta forma, os animais passam por restrição alimentar, que é uma das principais causas de LINA.

A escassez alimentar é um fator relativamente frequente em sistemas de produção leiteira baseados em pastagens subtropicais, sendo a restrição alimentar associada à redução da estabilidade do leite no teste do álcool (Fruscalso *et al.*, 2013). Em uma metanálise, Da Silveira Garcia *et al.*, (2024) observaram que o leite de vacas submetido a diferentes níveis de restrição alimentar apresentou uma redução de 5 pontos percentuais na estabilidade ao teste do álcool, quando comparado ao leite de vacas do grupo controle. Schmidt *et al.* (2024) demonstraram que as vacas que foram submetidas a uma restrição alimentar severa, apresentaram significativo quadro de LINA (leite resistindo ao teste com álcool somente a 66%) e que a recuperação desta condição somente foi possível quando as vacas receberam dietas com níveis adequados de energia e proteína.

A escassez alimentar é um fator relativamente frequente em sistemas de produção leiteira baseados em pastagens subtropicais, sendo a restrição alimentar associada à redução da estabilidade do leite no teste do álcool Fruscalso *et al.* (2013), observaram que o leite de vacas submetido a diferentes níveis de restrição alimentar apresentou uma redução de 5 pontos percentuais na estabilidade ao teste do álcool, quando comparado ao leite de vacas do grupo controle. Schmidt *et al.* (2024) demonstraram que as vacas que foram submetidas a uma

restrição alimentar severa, apresentaram significativo quadro de LINA (leite resistindo ao teste com álcool somente a 66%) e que a recuperação desta condição somente foi possível quando as vacas receberam dietas com níveis adequados de energia e proteína.

Diversos trabalhos demonstram que relação positiva entre estabilidade ao teste do álcool e a concentração de lactose pode se dar pelo fato de que quando há situações de baixo nível nutricional, ocorre redução na percentagem de lactose. Esta relação foi demonstrada experimentalmente nas pesquisas de Stumpf *et al.* (2013), através da redução da quantidade de alimento fornecido e de Schmitz *et al.* (2024), em dietas que visavam a recuperação de quadros de LINA causados por deficiência de energia. Alessio *et al.* (2016) observaram menor percentagem de lactose no outono, período em que ocorre menor oferta de alimento, sendo que no presente estudo os teores de lactose foram menores no outono e inverno (dados não apresentados), o que coincide com as estações com menor resistência ao teste do álcool.

Em uma metanálise, Da Silveira Garcia *et al.* (2024) obtiveram uma correlação linear positiva ( $r = 0,42$ ) entre estabilidade ao teste do álcool e lactose, o que foi atribuído à restrição alimentar, justificado por um menor suprimento arterial de glicose.

Apesar da lactose ser um dos componentes mais estáveis do leite, apresenta concentrações significativamente menores em amostras com LINA em comparação ao leite normal. Diversos estudos Fischer *et al.* (2012) indicam que essa redução está relacionada a fatores dietéticos. De acordo com Zanela *et al.* (2006), diferenças nos teores de lactose entre o leite estável e o instável podem ser causadas por uma alimentação inadequada, uso de forragens de baixa qualidade e distúrbios metabólicos. Outros autores como Fagnani *et al.* (2016), destacam que a deficiência nutricional compromete a síntese de lactose. Como a lactose tem um papel crucial na regulação osmótica, sua diminuição impacta diretamente a estabilidade do leite no teste de etanol (Chavez *et al.*, 2004; Tsioulpas; Lewis; Grandison, 2007).

O fato de que em um banco de dados consistente, com um grande número de amostras de tanques de resfriamento, não ter sido encontrado qualquer relação da estabilidade ao teste do álcool com CCP e CCS pode auxiliar no estabelecimento de estratégias de manejo visando a redução da ocorrência de LINA, visto que elevada CCS ou CPP podem ser descartadas como fatores causais, indicando que a estabilidade do leite ao teste do álcool pode ser afetada por diversos outros fatores. Diversos fatores têm sido apontados como causadores de variação da estabilidade do leite. O efeito negativo da elevada CCS e CPP sobre o teor de lactose tem sido apontado em diversos estudos com amostras de leite de vacas individuais e de tanques de resfriamento, tais como os de Alessio *et al.* (2016); Arruda Junior *et al.* (2019); Danieli (2024); Schmidt *et al.* (2024) e Stocco *et al.* (2021).

A diminuição do teor de lactose associada à alta CCS ocorre devido à redução do número de células epiteliais responsáveis pela secreção de lactose, além da transferência da lactose para a corrente sanguínea, consequência do aumento da permeabilidade vascular (Stelwagen *et al.*, 1998). Quando há um aumento na CPP, a quantidade de lactose no leite tende a diminuir, pois as bactérias utilizam essa lactose como fonte de nutrição (Blum *et al.*, 2008). Porém, os resultados da análise de fatores no presente trabalho evidenciam que as relações entre o teor de lactose e a estabilidade do leite ao teste do álcool não estão relacionadas ao efeito da saúde da glândula mamária e da qualidade microbiológica do leite.

Diversos fatores que não foram avaliados no presente trabalho, têm sido apontados como estando relacionados com o nível de instabilidade do leite, tais como variações nas concentrações de sais minerais no leite, decorrentes de desequilíbrios fisiológicos, metabólicos e nutricionais (Zanela *et al.*, 2009). As micelas de caseína, essenciais para a estabilidade térmica do leite, podem sofrer alterações por fatores como temperatura, pH, hidrólise enzimática da  $\kappa$ -caseína, excesso de cálcio iônico, e adição de polifenóis ou solventes polares (Brasil; Nicolau; Da Silva, 2015; Holt, 2016). Características fisiológicas do animal, como estágio de lactação, número de lactações também impactam essa estabilidade (Brasil; Nicolau; Da Silva, 2015; Holt, 2016).

Kunz *et al.* (2024) observaram uma intensa relação entre aumento da concentração de cálcio iônico e redução da estabilidade do leite em amostras de tanques de leite na região Oeste de Santa Catarina. Por outro lado Schmitz *et al.* (2024) avaliando vacas das raças Holandesa, Jersey e mestiças Holandês x Jersey, observaram variação na concentração de cálcio iônico entre os estágios de lactação apenas para vacas da raça Holandesa, não apresentando um padrão de consistência com a estabilidade ao etanol.

A relação positiva entre proteína e gordura já é conhecida e a análise multivariada só confirma essa relação. Danieli (2024) encontrou uma relação positiva entre gordura e proteína, descrevendo que o aumento das mesmas está relacionado a diminuição da produção de leite. A proteína é descrita como um dos componentes que contribui para a acidez natural do leite, assim como dióxido de carbono, fosfatos e citratos, sendo que o aumento na concentração desses componentes está diretamente relacionado com maior acidez natural do leite (Harris; Bachman, 2003). Desta forma, a relação positiva entre gordura, proteína e acidez pode ocorrer devido a relação que a acidez tem com o teor de proteína. Arruda Júnior (2018) observou que amostras de tanque com acidez inferior a 14°D apresentavam redução no teor de caseína em relação àqueles com acidez dentro da normalidade. No mesmo estudo Arruda Júnior (2018), constatou que tanto nas amostras de leite de tanques de resfriamento como de vacas individuais com baixa



acidez titulável, também foram detectados teores de lactose substancialmente menores em relação àquelas com acidez titulável dentro dos padrões.

A relação positiva entre CCS e CPP já foi descrita pela literatura assim como a relação contrária dessas variáveis com lactose. Fadillah *et al.* (2023) relatam que a CCS e a CPP refletem a qualidade do leite e a saúde do rebanho, e uma relação positiva entre elas pode existir. No entanto, ambas são influenciadas por diversos fatores de manejo e higiene. Esses fatores afetam as contagens de maneiras diferentes, o que significa que uma mudança em uma delas nem sempre tem o mesmo impacto na outra, mostrando a complexidade dos elementos que influenciam a produção de leite. Alessio *et al.* (2021) observaram que o aumento tanto na CCS quanto na CPP o que resultou na redução dos níveis de lactose no leite.

### 3.7 CONCLUSÃO

Amostras provenientes de tanques de resfriamento do leite apresentam grande variabilidade quanto a estabilidade do leite ao teste do álcool evidenciando que a ocorrência de LINA é um desafio da cadeia produtiva do leite.

Leite de tanque de resfriamento apresenta variabilidade ao longo do ano, com menor estabilidade no inverno, seguido do outono, o que pode estar relacionado a um menor atendimento das necessidades nutricionais das vacas neste período.

A estabilidade ao teste do álcool independe da saúde da glândula mamária e da qualidade microbiológica do leite.

Amostras de leite com baixa estabilidade ao teste do álcool apresentam menor teor de lactose, de modo que estratégias que promovem o aumento do teor de lactose, tais como adequadas nutrições, são importantes para melhorar a estabilidade do leite ao teste do álcool.

## CAPÍTULO V

### 4 ACIDEZ TITULÁVEL ELEVADA EM LEITE

#### 4.1 RESUMO

Este estudo investigou os fatores que influenciam a acidez titulável do leite em um rebanho com histórico de elevada acidez titulável, analisando a relação entre a mesma e a composição físico-química do leite. A acidez titulável, tradicionalmente utilizada como indicador de qualidade, reflete não apenas a possível contaminação bacteriana, mas também a composição natural do leite. Foram coletadas 70 amostras de leite de vacas Jersey, mestiças Holandês x Jersey e Holandês, analisando a produção de leite, composição (proteína, gordura, lactose, fósforo), parâmetros físicos do leite (acidez titulável, estabilidade ao teste do álcool e pH) e contagem de células somáticas. Observou-se que a acidez titulável média das amostras foi superior aos valores considerados ideais. Os teores de fósforo foram associados aos teores de gordura e proteína, elevando a acidez titulável do leite. Os resultados demonstram que a acidez titulável não deve ser avaliada isoladamente como um indicador de qualidade, mas sim em conjunto com outros parâmetros físico-químicos para uma melhor avaliação da qualidade do leite. A pesquisa destaca a necessidade de se compreender as interações complexas entre fatores genéticos, ambientais e dietéticos. Sugerimos que novos estudos sejam realizados para aprimorar a compreensão da elevada acidez titulável em diferentes sistemas de produção de leite.

**Palavras-chave** - Leite Hiperácido, Fósforo Total e Caseína.

## 4.2 ABSTRACT

This study investigated the factors influencing the titratable acidity of milk in a herd with a history of high titratable acidity, analyzing the relationship between titratable acidity and the physicochemical composition of milk. Titratable acidity, traditionally used as a quality indicator, reflects not only possible bacterial contamination but also the natural composition of milk. Seventy milk samples were collected from Jersey, Holstein x Jersey crossbred, and Holstein cows. Milk yield, composition (protein, fat, lactose, phosphorus), physical parameters (titratable acidity, stability in the alcohol test, and pH), and somatic cell count were analyzed. It was observed that the average titratable acidity of the samples was higher than the values considered ideal. Phosphorus levels were associated with fat and protein levels, contributing to increased titratable acidity. The results demonstrate that titratable acidity should not be evaluated in isolation as a quality indicator but rather in conjunction with other physicochemical parameters for a more comprehensive assessment of milk quality. The research highlights the need to understand the complex interactions between genetic, environmental, and dietary factors. We suggest that further studies should be conducted to improve the understanding of high titratable acidity in different milk production systems.

**Keywords** – Hyperacid Milk, Total Phosphorus and Casein.

This study investigated the factors influencing the titratable acidity of milk in a herd with a history of high titratable acidity, analyzing the relationship between titratable acidity and the physicochemical composition of milk. Titratable acidity, traditionally used as a quality indicator, reflects not only possible bacterial contamination but also the natural composition of milk. Seventy milk samples were collected from Jersey, Holstein x Jersey crossbred, and Holstein cows. Milk yield, composition (protein, fat, lactose, phosphorus), physical parameters (titratable acidity, stability in the alcohol test, and pH), and somatic cell count were analyzed. It was observed that the average titratable acidity of the samples was higher than the values considered ideal. Phosphorus levels were associated with fat and protein levels, contributing to increased titratable acidity. The results demonstrate that titratable acidity should not be evaluated in isolation as a quality indicator but rather in conjunction with other physicochemical parameters for a more comprehensive assessment of milk quality. The research highlights the need to understand the complex interactions between genetic, environmental, and dietary

factors. We suggest that further studies should be conducted to improve the understanding of high titratable acidity in different milk production systems.

**Keywords** – Hyperacid Milk, Total Phosphorus and Casein.

### 4.3 INTRODUÇÃO

A acidez titulável tem sido historicamente utilizada como um indicador de degradação da lactose por bactérias, resultante de condições inadequadas de higiene na obtenção do leite, armazenamento em temperaturas elevadas ou longos períodos de estocagem (Schmidt *et al.*, 1996). No entanto, devido à obrigatoriedade da refrigeração do leite cru e à avaliação prévia à coleta na propriedade rural, juntamente com análises mensais da CPP, questões como degradação bacteriana e exposição a temperaturas inadequadas tornaram-se menos frequentes, visto que, os tanques de resfriamento por expansão direta permitem a adequada conservação do leite, dificultando a multiplicação de bactérias mesófilas, desde que utilizados adequadamente (Cardozo *et al.*, 2015; Mcsweeney; Mcnamara, 2022). Além disso, o leite é sujeito a inspeção e avaliação ao chegar na plataforma de recebimento de laticínios, conforme determinado pelo RIISPOA e pela IN 76 (Brasil, 2018b). Conforme ainda estipulado por tais regulamentações, a acidez do leite cru refrigerado deve estar dentro da faixa de 0,14 a 0,18 gramas de ácido láctico por 100 ml para ser aceito e processado.

Brasil (2018b) descreve que, no entanto, variações na acidez, acima ou abaixo desses valores, não necessariamente indicam adulteração ou deterioração. A acidez total do leite é resultante da acidez natural e da acidez adquirida, sendo geralmente determinada pelo método da titulação da acidez. Neste procedimento, um volume específico de leite é neutralizado por titulação com uma solução padronizada de hidróxido de sódio, na presença de um indicador ácido-base, como a fenolftaleína (Brasil, 2017a).

A acidez natural do leite é predominantemente atribuída a seus componentes intrínsecos, tais como íons fosfato, caseína, íons citrato e CO<sub>2</sub> (Schmidt *et al.*, 1996). Segundo estudos de Formaggioni *et al.* (2001), a caseína e o fósforo solúvel determinam cerca de 80% da acidez titulável natural do leite. Já a acidez adquirida do leite é resultante da degradação da lactose por bactérias presentes no leite, resultando na produção de ácido láctico e, conseqüentemente, na elevação da acidez do leite (Alhussien; Dang, 2018; Formaggioni *et al.*, 2001b).

A acidez desempenha um papel crucial no processo de fabricação de queijos e produtos derivados, influenciando desde a coagulação do leite até a eficiência da sinérese do coalho. Contudo, a determinação da acidez por titulação considera somente o ácido láctico, desconsiderando outros componentes com capacidade tamponante do leite avaliado através da resistência a variações no pH. Em virtude da complexidade da matriz do leite, a acidez pode ser uma medida simplificada e propensa a interpretações errôneas se utilizada isoladamente como

um indicador de qualidade, sem levar em conta outros parâmetros como composição do leite (Kindstedt, 2005).

Relatos de produtores e técnicos, sobre ocorrência de acidez elevada em propriedades leiteiras com histórico de baixos valores de CPP são frequentes, e causam situações de desconforto na cadeia produtiva do leite, pois ao apresentar acidez elevada, independentemente da causa, o leite não pode ser comercializado em atendimento das normas brasileiras de qualidade do leite. Estas situações sugerem alterações na acidez natural do leite e necessitam pesquisas mais aprofundadas buscando-se assim a compreensão do problema, visto que, na rotina da cadeia produtiva do leite bovino, a acidez titulável não é avaliada em amostras individuais. Em função disto, o objetivo deste estudo foi investigar quais fatores podem influenciar a acidez titulável do leite, analisando sua relação com a composição e propriedades físicas do leite.

#### 4.4 MATERIAL E MÉTODOS

##### 4.4.1 Animais

O experimento foi realizado a partir de um relato evidenciando caso de recorrente e elevada acidez titulável, na produção de leite em um rebanho pertencente à Estação Experimental de Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri), situada no município de Campos Novos - SC. Foram coletadas informações e amostras de leite provenientes de 70 vacas, majoritariamente Jersey e mestiças Holandês x Jersey, em diferentes proporção e em menor número por vacas Holandês, porém, a raça não foi considerada na análise (Leite = 17,56 kg, DEL = 162,4, OP 2,42). As vacas cujas amostras foram coletadas, são mantidas em sistema de pastejo e recebem suplementação a base de concentrado.

##### 4.4.2 Coleta e Análise de Amostra de Leite

A produção individual de leite de cada vaca foi medida com auxílio de uma balança. Coletou-se uma amostra de leite do tanque, com azidiol como conservante, para análise de CBT e amostras individuais de leite de cada vaca, tendo-se como base a ordenha do período da manhã.

Coletaram-se amostras de leite, com bronopol como conservante, para realização das análises de composição (teores de gordura, proteína, lactose, caseína e concentração de NUL, pelo método de infravermelho (Bentley Combisystem, Bentley Instruments®, Inc., U.S.A.) e CCS, por citometria de fluxo (Delta Combiscope, Advanced Instruments®, Inc., U.S.A.). As análises foram realizadas no Laboratório da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa, Curitiba - PR.

Foram coletadas amostras individuais de leite de cada vaca, da ordenha da manhã, sem emprego de conservante, para a realização das análises físico-químicas. As amostras foram refrigeradas entre 3 e 8°C e analisadas 12 horas após a coleta. Foi realizado o teste do álcool, misturando-se 2 ml de leite e 2 ml de álcool em uma placa de Petri disposta sobre um fundo preto. As concentrações das soluções de álcool utilizadas (56 a 88%) foram preparadas com concentrações variando em intervalos de 2%.

As amostras de leite analisadas pelo teste do álcool foram consideradas instáveis quando houve a formação de grumos. A acidez titulável foi determinada em °D, conforme a metodologia descrita na IN 68 (Brasil, 2006). Ainda, em outra amostra de 10 ml de leite, adicionou-se 4 a 5 gotas de fenolftaleína 1%, sendo a mistura resultante titulada com uma solução de NaOH 0,1 mol/L até aparecimento de coloração rósea persistente por aproximadamente 30 segundos.

Para a determinação de fósforo total em g/kg, as amostras de leite foram digeridas misturando-se 0,5 ml de leite com 1 ml de ácido nítrico 65% em um tubo de ensaio. O tubo contendo a mistura foi colocado em um banho-maria com água em ebulição por 1,5h (Hamay *et al.*, 2000). Posteriormente, as amostras digeridas foram diluídas em água ultrapura na proporção (1:4). A concentração de fósforo (TP) foi determinada usando um kit comercial (Fósforo UV *Liquiform*, Lagoa Santa, MG, Brasil) seguindo as recomendações do fabricante. A absorbância de cada amostra foi lida em 340 nm utilizando um espectrofotômetro NanoDrop 2000 (*Thermo Scientific*<sup>TM</sup>, Wilmington, DE, USA) (Malacarne *et al.*, 2015).

#### **4.4.3 Análise de Dados**

Os dados foram analisados utilizando o pacote estatístico SAS® (SAS, 2002), e foram padronizados para médias igual a 0 e variâncias igual a 1 por meio do procedimento STANDARD. Os dados de CCS foram transformados para ECS, pela equação  $ECS = \log_2(CCS/100) + 3$ . Para fins de análise, os dados de DEL foram delimitados em subgrupos até

100 dias (0) de 101 a 200 (1) de 201 a 300 (2) e acima de 301 (3) para melhorar a normalidade uma vez que havia muita variação nos dias em lactação os dados de DEL.

Foi realizada uma análise fatorial multivariada para explorar as relações entre as variáveis e reduzir o conjunto original de dados em um número menor de fatores. A análise foi realizada utilizando o procedimento FACTOR do pacote estatístico SAS®, com a rotação da matriz Promax, as variáveis foram agrupadas nos fatores mais correlacionados, e a adequação do modelo foi avaliada pelo índice KMO, que compara a magnitude dos coeficientes de correlação observados com os coeficientes de correlação parciais.

A seleção das variáveis que compuseram os fatores baseou-se na comunalidade, que representa a proporção da variância explicada pelo fator comum. O número de fatores foi determinado com base no autovalor, considerando-se aqueles superiores a um. Cargas fatoriais iguais ou superiores a 0,65 foram consideradas significativas, conforme Costa (2008), que indica que essa carga é apropriada para bancos de dados com 70 observações. Gráfico dos fatores com maior comunalidade foi gerado para facilitar a interpretação dos resultados comparativos.

Complementarmente, a relação do teor de fósforo no leite sobre a acidez titulável foi avaliada através de regressão linear, utilizando o procedimento REG do pacote estatístico SAS.

#### 4.5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Tabela 1 é apresentada a estatística descritiva dos dados de OP, DEL, produção, composição e parâmetros físicos do leite. A acidez titulável média foi relativamente elevada, acima dos 18°D preconizados pela IN 76 (Brasil, 2018a).

O teor médio de fósforo total encontrado nas amostras está acima dos valores médios comumente reportados na literatura. O teor médio de fósforo no presente estudo equivalente a 111 mg/100g, muito acima ao que é reportado na literatura. Tunick (2022) reportou um teor de fósforo de 84 mg/100g, Klop *et al.* (2013) em uma meta-análise encontrou valor médio de 89 mg/100g, enquanto Formaggioni *et al.* (2001a) reportaram teores variando de 85,0 a 90,8 mg/100g em amostras de tanque.



Tabela 1. Estatística descritiva do banco de dados das amostras individuais de vacas com dados zootécnicos (N = 70).

Variável	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
OP	2,35	1,08	1	5
DEL	1,4	0,99	0	3
Produção (Kg/dia)	16,98	5,19	7,6	38,3
Gordura (%)	4,64	0,74	2,75	7,18
Proteína (%)	3,76	0,49	2,51	4,76
Lactose (%)	4,75	0,22	3,98	5,21
ST (%)	13,93	1,03	11,26	16,61
NUL (%)	13,42	2,62	8,4	23,7
Prot Verdadeira (%)	3,54	0,47	2,31	4,62
Caseína (%)	2,76	0,44	1,46	3,93
Rel_cas_prot (%)	0,74	0,04	0,53	0,82
Rel_gor_prot (%)	0,82	0,13	0,48	1,266
CCS	485,66	826,65	18	4611
ECS	3,82	2,11	0,6	8,52
Álcool (%)	72,17	7,01	58	82
Acidez ( <sup>o</sup> D)	18,06	2,23	14,3	23,9
Fósforo (g/L)	1,11	0,17	0,68	1,53

Dias em lactação (DEL), ordem de parto (OP), produção de leite (produção), estabilidade ao teste do álcool (álcool), acidez titulável (acidez), sólidos totais (ST) nitrogênio ureico do leite (NUL), escore de célula somática (ESC), contagem de células somáticas (CCS), relação caseína proteína (rel\_cas\_prot), relação gordura proteína (rel\_gor\_prot) e proteína verdadeira (Prot Verdadeira). Fonte: Elaborada pela autora (2024)

A análise fatorial criou três fatores que, em conjunto, explicaram 63,90% da variância total. O modelo fatorial foi considerado adequado para o conjunto de variáveis utilizadas, conforme indicado pelo índice de KMO de 0.5774. Todas as variáveis apresentaram elevada comunalidade (Tabela 2): DEL (0,7496), produção de leite (0,6588), gordura (0,7326), proteína (0,4446), lactose (0,5606), ECS (0,6268), acidez (0,4258), álcool (0,4067), fósforo (0,6230) evidenciando a contribuição de todas as variáveis para os fatores resultantes da qualidade da análise. As comunalidades obtidas por variável reforçaram a importância de cada variável incluída na análise, com valores superiores a 50%, indicando que as variáveis desempenharam um papel fundamental na explicação da variância dos dados (Tabela 2).

O Fator 1 evidenciou uma relação positiva entre os teores de gordura, proteína, a acidez titulável e a concentração de fósforo no leite. O Fator 2 demonstrou uma associação entre DEL e teor de lactose. No Fator 3, apenas a variável resistência ao teste do álcool apresentou uma

carga fatorial superior a 0,65 sendo, portanto, a principal responsável pela variação desse fator, sem apresentar uma relação significativa com as demais variáveis analisadas (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de Fator das variáveis relacionadas à qualidade de leite.

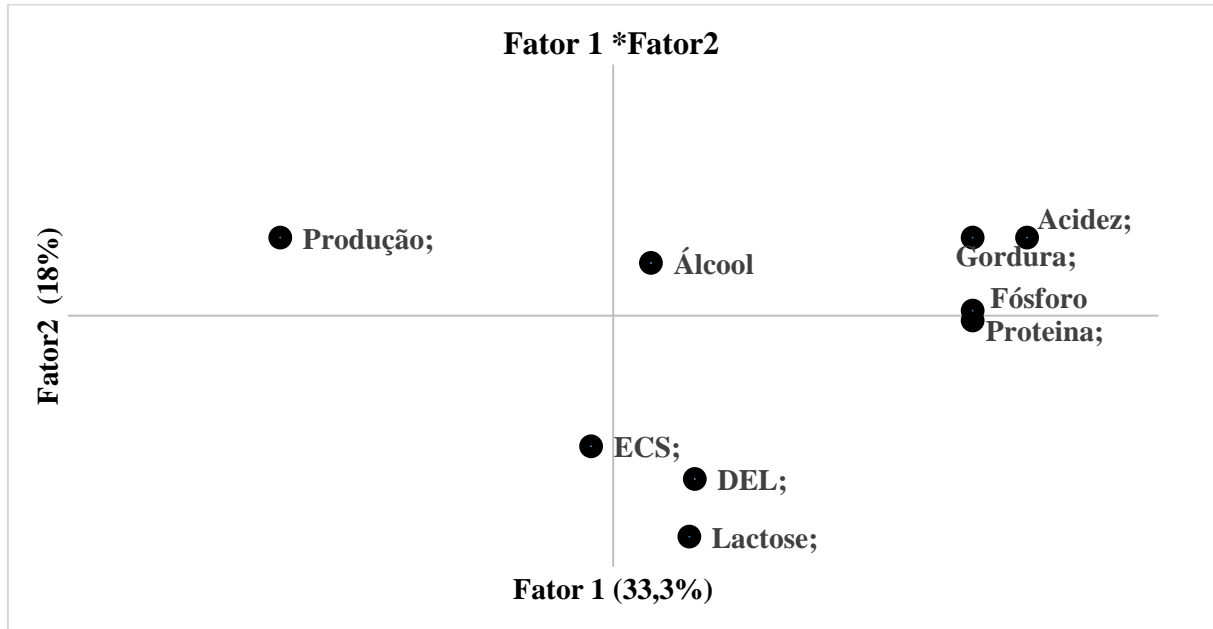
Variável	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
OP	2,8	1,21	1	7
Produção (Kg/dia)	35,54	13,82	10	69,1
DEL	20,11	8,6	4	35
Álcool (%)	69,69	6,24	58	84
Acidez ( <sup>o</sup> D)	18,15	3,7	11,6	30
pH	6,48	0,42	5,2	7
Gordura_(%)	3,47	0,97	0,7	7,23
Proteína_(%)	3,26	0,45	2,34	5,14
Lactose_(%)	4,53	0,31	2,94	5,18
ST_(%)	12,23	1,18	9,05	16,73
SNG_(%)	8,74	0,51	7,39	10,11
CCS x1000	474,56	1016,06	2	9998
ECS	3,32	2,45	-2,05	9,64
Caseína_(%)	2,59	0,38	1,94	4,17
Cloretos (g/L)	0,86	0,19	0,28	1,78
Fósforo_(g/L)	0,14	0,05	0,015	0,033

Dias em lactação (DEL) produção de leite (Produção), estabilidade ao teste do álcool (álcool), acidez titulável (acidez) e escore de célula somática (ESC). Fonte: Elaborada pela autora (2024)

A Figura 1, apresenta graficamente a análise fatorial representando os dois primeiros fatores extraídos, no eixo X consta o Fator 1 explicando 33,30% da variância dos dados, e no eixo Y consta o Fator 2 explicando 18,00%, totalizando aproximadamente 51% da variância explicada. Esta figura mostra a relação entre a acidez do leite, concentração de fósforo e teores de gordura e proteína no leite, porém sem associação com as demais variáveis analisadas.

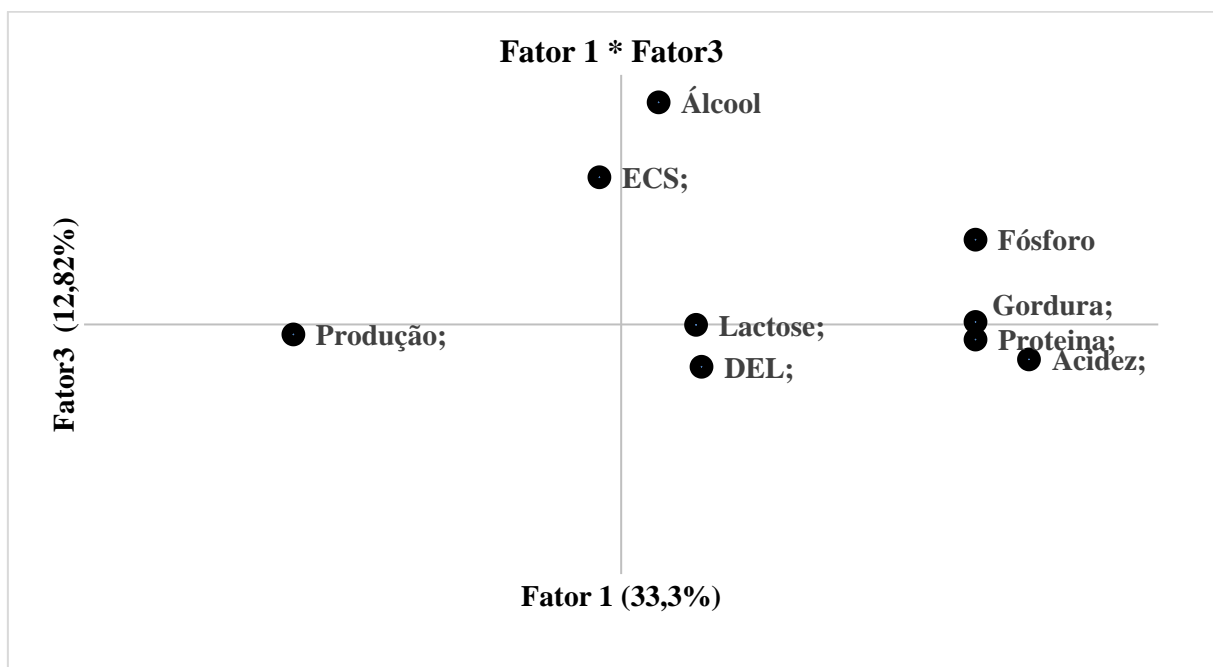
A Figura 2, apresenta graficamente a análise fatorial representando o Fator 1 no eixo X explicando 33,30% da variância dos dados e o Fator 3 no eixo Y, explicando 12,8% da referida variância, totalizando aproximadamente 46% da variância explicada. Esta figura reafirma a relação entre a acidez do leite, concentração de fósforo e teores de gordura e proteína no leite, e plota a variável estabilidade ao teste do álcool no eixo Y, porém sem associação com as demais variáveis analisadas.

Figura 1. Análise do Fator 1 e 2 para as variáveis dias em lactação (DEL) produção de leite (Produção), estabilidade ao teste do álcool (álcool), acidez titulável (acidez), escore de célula somática no logaritmo de base 2 (ESC\_Log2), fósforo, lactose, proteína e gordura.



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

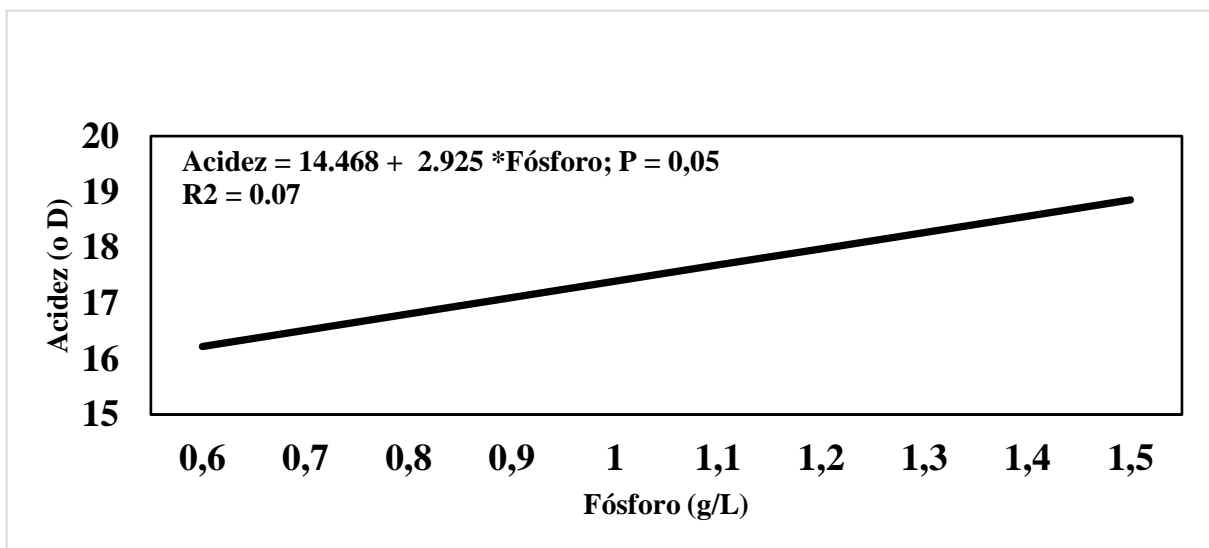
Figura 2. Análise do Fator 1 e 3 para as variáveis dias em lactação (DEL) produção de leite (Produção), estabilidade ao teste do álcool (álcool), acidez titulável (acidez), escore de célula somática no logaritmo de base 2 (ESC\_Log2), fósforo, lactose, proteína e gordura.



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

Considerando que o objetivo deste estudo foi entender quais as principais variáveis associadas a elevada acidez titulável de leite proveniente de um rebanho que historicamente vinha apresentando problemas de elevada acidez titulável, vamos focar em discutir apenas o Fator 1, o qual evidenciou que a acidez titulável ao leite está relacionada positivamente à concentração de fósforo, assim como os teores de gordura e a proteína, conferindo maior acidez titulável ao leite.

Figura 03. Análise de regressão da acidez titulável em função do Fósforo Total do leite.



Fonte: Elaborado pela autora (2024)

Altos teores de proteína no leite podem estar associados ao aumento da acidez titulável. De acordo com Schmidt *et al.* (1996), o leite possui um nível básico de acidez, atribuído principalmente às proteínas, mas também influenciado por minerais e gases dissolvidos. Estes autores avaliaram amostras de leite contendo teores inferiores a 2,8% e superiores a 3,8% de proteína, sendo observado que a acidez titulável aumentou conforme houve o aumento no teor de proteínas. Toffanin *et al.* (2015) observaram correlação altamente significativa entre acidez titulável e teores de proteína e caseína ( $P < 0,001$ ) e significativas com os teores de gordura ( $P < 0,05$ ). Os autores observaram ainda correlação altamente significativa ( $P < 0,001$ ) entre os teores de fósforo e acidez titulável, associado aos teores de gordura, proteína e caseína. A correlação entre teores de fósforo e caseínas se dá principalmente pela associação do fósforo às caseínas para formação micelar (Oliveira; Rosa; Silva, 2019; Silva *et al.*, 2019). Em outro estudo, Toffanin *et al.* (2015) observaram forte correlação (0,82) entre a concentração de

fósforo e acidez titulável. Muller *et al.* (2021) observaram uma correlação positiva ( $r=0,689$ ;  $P < 0,001$ ) entre teor de fósforo e gordura do leite e gordura do leite, o que foi explicado pelo fato de que o fósforo também é secretado via fosfolipídios do leite, revestindo gotículas de gordura. Os autores evidenciaram que como os teores de proteína e gordura aumentaram simultaneamente, o aumento do valor de acidez titulável era esperado. Formaggioni *et al.* (2001b) observaram que a maior acidez titulável foi associada a maiores teores de fósforo, sem associação aos teores de gordura e caseína, no entanto, as avaliações foram realizadas em amostras de tanque de resfriamento.

Vacas em pastejo estão mais sujeitas a variações nos componentes químicos da dieta, pela grande variação da composição das plantas durante os diferentes estados fenológicos das mesmas e inclusive pelo tipo de forragem ofertada, o que poderia impactar sobre os níveis de fósforo no leite e conseqüentemente na acidez titulável. No entanto, o fósforo dietético não parece ter efeito sobre o teor de fósforo no leite. Wu; Satter; Sojo, (2000) testaram três doses diferentes de fósforo na dieta de vacas (0.31, 0.40 e 0.49% de fósforo na base da MS) e observaram que as vacas que receberam maiores doses (0,40 e 0,49%) tiveram maiores concentrações séricas do mineral inorgânico no sangue. Os autores não observaram relação entre as concentrações totais de fósforo no leite e a concentração de fósforo inorgânico no soro ( $r^2 = 0,02$ ). Porém, novamente as concentrações de fósforo no leite foram relacionadas aos teores de proteína no leite ( $r^2 = 0,37$ ). Isso acontece, pois cerca da metade do fósforo total no leite está ligado às caseínas e a outra metade existe como íons livres. Ou seja, vacas com elevado teor de proteína do leite terão maiores teores de fósforo no leite (Wu; Satter; Sojo, 2000). Klop *et al.* (2013) em sua meta-análise não observou efeito significativo entre o fósforo dietético, fósforo total ingerido e o teor de fósforo no leite. Toffanin *et al.* (2015) observaram maior teor de fósforo e maior acidez titulável no leite de vacas primíparas quando comparado às vacas múltíparas. Os autores observaram também variações ao longo da lactação, com uma redução acentuada nos teores de fósforo nos primeiros dois meses de lactação, aumentando posteriormente até o final da lactação, mesmo comportamento observado para a acidez titulável. No mesmo trabalho, os autores observaram uma correlação genética entre a acidez titulável e o teor de fósforo de 0,92 ( $P < 0,05$ ). Houve ainda uma correlação entre acidez titulável e gordura (0,35;  $P < 0,05$ ) e proteína (0,91;  $P < 0,05$ ). No entanto, no presente estudo, a OP nem foi considerada na análise pela baixa comunalidade e o estágio de lactação não apresentou relação com os teores de fósforo ou acidez titulável.

Outro fator que pode explicar a maior acidez titulável média, no caso deste trabalho, é a composição genética do rebanho, com maior proporção de vacas Jersey e mestiças Holandês x Jersey, embora tal avaliação não tenha sido considerada na análise. González *et al.* (2006) em um estudo com vacas da raça Jersey reportaram acidez titulável média acima de 18°D, e atribuem esse achado ao maior teor de sólido produzido pela raça.

Considerando que a acidez está relacionada ao maior teor de proteína e que as vacas Jersey produzem leite com maior teor da mesma, cuja relação é compreensível. Embora no estudo de Hauser *et al.* (2023), não houve diferença entre a acidez titulável do leite de vacas Holandês (16,27°D) e Jersey (16,30°D), Kappes *et al.* (2022) observaram maior acidez titulável para vacas mestiças  $\frac{3}{4}$  holandês x  $\frac{1}{4}$  Jersey ( $16.11 \pm 0.1$ ), menor acidez para mestiças F1 Holandês x Jersey ( $14.63 \pm 0.2$ ) e valores intermediários para vacas Holandês ( $15.27 \pm 0.2$ ), porém todas dentro da faixa considerada normal, embora os teores de proteína e caseína tenham sido maiores para vacas mestiças F1. Porém, todos esses estudos não avaliaram os teores de fósforo no leite. No entanto, no estudo de Lim *et al.* (2020), avaliando o dia 3 e 30 de lactação, observaram que as vacas Jersey tendem a apresentar menor teor de fósforo no dia 3 e maior teor de fósforo no dia 30 de lactação, embora o teor de proteína não tenha diferido e a acidez titulável não tenha sido avaliada. A relação positiva entre acidez titulável e teor de fósforo com o teor de gordura possivelmente não seja causal, mas devida ao fato da relação muito próxima entre os teores de gordura e proteína, assim como possivelmente, a elevada acidez titulável ao leite observada no rebanho em estudo não ocorra devido a um, mas sim, uma complexa interação entre fatores ambientais, genéticos, produtivos, bioquímicos e metabólicos, que por hora, fogem de nossa compreensão. Portanto, mais estudos para determinar esses fatores e suas interações são necessários para melhor compreender esse fenômeno da elevada acidez titulável.

#### 4.7 CONCLUSÃO

A concentração de fósforo total no leite está positivamente associada à proteína e à gordura do leite, gerando um aumento da acidez titulável. Os resultados deste estudo demonstram que, devido a elevada acidez titulável do leite observada neste estudo e sua relação com a concentração de alguns sólidos do leite em amostras individuais de vacas, a identificação de amostras de leite ácido não pode ser atribuída unicamente à problemas de qualidade microbiológica e/ou conservação do leite, exigindo análises complementares para determinar a adequação do leite para o consumo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A. S. De. *et al.* Access to shade reduces DNA damage of Holstein cows under mild heat stress. **Animal Production Science**, [s. l.], v. 60, n. 12, p. 1539–1546, 2020.

AKKERMAN, M. *et al.* Natural variations of citrate and calcium in milk and their effects on milk processing properties. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 102, n. 8, p. 6830–6841, 2019.

ALESSIO, Dileta Regina Moro *et al.* Lactose and its relationship with other milk constituents, somatic cell count, and total bacterial count. **Livestock Science**, [s. l.], v. 252, 2021.

ALESSIO, Dileta Regina Moro *et al.* Multivariate analysis of lactose content in milk of Holstein and Jersey cows1. **Semina: Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 2641–2652, 2016.

ALHUSSIEN, Mohammed Naif; DANG, Ajay Kumar. **Milk somatic cells, factors influencing their release, future prospects, and practical utility in dairy animals: An overview**. [S. l.]: Veterinary World, 2018.

ARRUDA JUNIOR, Carlos Luis *et al.* **Variation in the content of defatted dry extract in cooling tanks milk samples of dairy farms** Variáveis relacionadas ao teor de extrato seco desengordurado em amostras de leite de tanques de resfriamento de estabelecimentos rurais. [s. l.], p. 203–216, 2019.

ARRUDA JÚNIOR, Luís Carlos. **Variáveis relacionadas a não conformidades em qualidade do leite: baixa acidez titulável e baixo teor de extrato seco desengordurado**. 2018. 1–184 f. PhD Thesis - Tese do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade de Santa Catarina, [s. l.], 2018.

ARSLAN, Ayşenur *et al.* Bovine Colostrum and Its Potential for Human Health and Nutrition. **Frontiers in Nutrition**, [s. l.], v. 8, n. June, p. 1–12, 2021.

BARBOSA, Rosângela Silveira *et al.* Efeito do Período de Lactação e Estabilidade do Leite sobre as Características Físico- Químicas. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal Print**, [s. l.], v. 5, n. August, p. 12–42, 2009.

BARROS, L.; *et al.* Prueba del alcohol en leche y relación con calcio iónico. **Revista Prácticas Veterinarias**, [s. l.], v. 3, p. 315–318, 1999.

BELOTI, Vanerli. **Leite: obtenção, inspeção e qualidade**. 1. ed. Londrina: Planta, 2015.

BERNABUCCI, Umberto. *et al.* Effect of summer season on milk protein fractions in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 98, n. 3, p. 1815–1827, 2015.

BERNABUCCI, Umberto *et al.* Effects of the hot season on milk protein fractions in Holstein cows. **Animal Res**, [s. l.], v. 51, n. June, p. 25–33, 2002.

BERNABUCCI, U. *et al.* Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. **Animal**, [s. l.], v. 4, n. 7, p. 1167–1183, 2010.

BERTOCCHI, L. *et al.* Seasonal variations in the composition of Holstein cow's milk and temperature-humidity index relationship. **Animal**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 667–674, 2014a.

BISUTTI, V. *et al.* Effect of intramammary infection and inflammation on milk protein profile assessed at the quarter level in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 107, n. 3, p. 1413–1426, 2023.

BRASIL. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. 2002.

BRASIL. Instrução Normativa n. 76 de 26 de novembro de 2018. **Diário Oficial da União**, [s. l.], n. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, p. Brasília, DF, 2018a.

BRASIL. Instrução Normativa n. 77, de 26 de novembro de 2018. **Diário Oficial da União**, [s. l.], n. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, p. Brasília, DF, 2018a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA)**. Brasília: MAPA, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2018. Instrução Normativa nº76, de 26 de novembro de 2018. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado. **Diário Oficial da União, Brasília, D**, [s. l.], v. Seção 1, p. 1–9, 2018.

BRASIL, Rafaella Belchior; NICOLAU, Edmar Soares; DA SILVA, Marco Antônio Pereira. Leite Instável Não Ácido e Fatores Que Afetam A Estabilidade Do Leite. **Ciência Animal**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 15–26, 2015.

BEHMER, M.L.A. **Tecnologia do leite: produção, industrialização e análise**. 15ed. São Paulo: Nobel, 1987.

BRITO, Maria Aparecida Vasconcelos Paiva; BRITO, José Renaldi Feitosa. Qualidade Do Leite. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 56, p. 61–74, 2000.

BUTLER, Stephen T. *et al.* Review: Use of assisted reproduction in seasonal-calving dairy herds. **Animal**, [s. l.], v. 17, p. 100775, 2023.

CARDOZO, L. L. *et al.* Risk factors for the occurrence of new and chronic cases of subclinical mastitis in dairy herds in southern Brazil. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 98, n. 11, p. 7675–7685, 2015.

CHAVEZ, Mónica S. *et al.* Bovine milk composition parameters affecting the ethanol stability. **Journal of Dairy Research**, [s. l.], v. 71, n. 2, p. 201–206, 2004.

DA LUZ KUNZ, Shaeen Inaê *et al.* Ionic calcium variation in normal, acidic, alkaline and unstable non-acidic bovine milks and its relationship with alcohol stability. **International Journal of Dairy Technology**, [s. l.], v. 77, n. 3, p. 843–852, 2024.

DA SILVA, Denize Cristina. **Pesquisa de resíduos de neutralizantes de acidez em leites longa vida (UHT) integral comercializados na cidade de Ariquemes, Rondônia, Brasil**. 2011. 1–41 f. PhD Thesis[s. l.], 2011. Disponível em: Monografia apresentada ao curso de



Graduação em Farmácia da Faculdade de Educação e Meio Ambiente – FAEMA, como.

DA SILVEIRA GARCIA, Lisiane *et al.* Seasonal stability of raw bovine milk: a systematic review and meta-analysis. **Biological Rhythm Research**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 30–44, 2024.

DADOUSIS, Christos *et al.* Genome-wide association and pathway-based analysis using latent variables related to milk protein composition and cheesemaking traits in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 100, n. 11, p. 9085–9102, 2017.

DANIELI, Beatriz. **Fatores de risco associados à elevada contagem de células somáticas em rebanhos leiteiros e sua relação com qualidade do leite Lages 2024**. 2024. 162 f. Pós-graduação em Ciência Animal no Centro de Ciências Agroveterinárias. Universidade do Estado de Santa Catarina - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2024.

DE VARGAS, Diego Prado *et al.* Physical-chemical and microbiological quality of bovine milk in different production systems and seasons. **Ciencia Animal Brasileira**, [s. l.], v. 20, p. 1–11, 2019.

DE VliegHER, S. *et al.* Impact of early lactation somatic cell count in heifers on milk yield over the first lactation. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 88, n. 3, p. 938–947, 2005.

DIAZ GONZÁLEZ, F.H.; DÚRR, J.W.; FONTANELI, R.S. **Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação**. In: Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo em vacas leiteiras. [S. l.: s. n.], 2001. p. 5–21.

DILLON, P. *et al.* The effect of calving date and stocking rate on the performance of spring-calving dairy cows. **Grass and Forage Science**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 286–299, 1995.

DOS SANTOS, Marcos Veiga; DA FONSECA, Luiz Fernando Laranja. **Controle da Mastite e qualidade do leite - Desafios e soluções**. Pirassunungaed. Pirassununga: [s. n.], 2019. v. 1

FADILLAH, Achmad *et al.* Evaluation of factors associated with bulk milk somatic cell count and total plate count in Indonesian smallholder dairy farms. **Frontiers in Veterinary Science**, [s. l.], v. 10, n. November, p. 1–10, 2023.

FAGNANI, Rafael *et al.* Alcohol Stability of Milk from the Perspective of X-Ray Diffractometry. **Food Biophysics**, [s. l.], p. 198–205, 2016.

FAULKNER, Anne; PEAKER, Malcolm. Reviews of the progress of Dairy Science: Secretion of citrate into milk. **Journal of Dairy Research**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 159–169, 1982.

FERRERO, F. J.; VALLEDOR, M.; CAMPO, J. C. Screening method for early detection of mastitis in cows. **Measurement: Journal of the International Measurement Confederation**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 855–860, 2014.

FISCHER, Viviam *et al.* Leite instável não ácido: um problema solucionável?. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 838–849, 2012b.

FORMAGGIONI, P. *et al.* Milk With Abnormal Acidity. Vi. the Role of Phosphorus Content and the Rennet-Coagulation Properties of Italian Friesian Herd Milks. **Annali della Facolta di**

**Medicina Veterinaria - Universita di Parma (Italy)**, [s. l.], v. 21, n. January, p. 261–268, 2001a.

FOX, P. F. *et al.* Production and Utilization of Milk. *In: Dairy Chemistry and Biochemistry*. [S. l.]: **Springer International Publishing**, 2015. p. 1–19.

FOX, L. K.; SHOOK, G. E.; SCHULTZ, L. H. Factors Related to Milk Loss in Quarters with Low Somatic Cell Counts. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 68, n. 8, p. 2100–2107, 1985.

FRANZOI, Marco *et al.* Variation of detailed protein composition of cow milk predicted from a large database of mid-infrared spectra. **Animals**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 1–14, 2019.

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

GARGOURI, Ahmed *et al.* Evaluation of Tunisian milk quality in dairy herds: Inter-relationship between chemical, physical and hygienic criteria. **Animal Science Journal**, [s. l.], v. 85, n. 6, p. 714–721, 2014.

GARNSWORTHY, P. C. *et al.* Variation of milk citrate with stage of lactation and de novo fatty acid synthesis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 89, n. 5, p. 1604–1612, 2006.

GAUR, Vikas; SCHALK, Jos; ANEMA, Skelte G. Sedimentation in UHT milk. **International Dairy Journal**, [s. l.], v. 78, p. 92–102, 2018.

GIOMBELLI, Cristiane Jaci *et al.* Avaliação da qualidade microbiológica, físico-química e dos parâmetros enzimáticos de leite pasteurizado e leite tipo B, produzidos no Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 1539–1546, 2011.

GONÇALVES, Juliano L. *et al.* Milk losses associated with somatic cell counts by parity and stage of lactation. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 101, n. 5, p. 4357–4366, 2018.

GONZÁLEZ, F. H. D. *et al.* **Qualidade do leite bovino, variação no trópico e subtropico**. UPF edited. [S. l.: s. n.], 2011.

GONZÁLEZ, Felix Diaz *et al.* Qualidade do leite bovino: variações no trópico e no subtropico. **Fundo, Universidade de Passo**, [s. l.], v. 1999, n. December, p. 1–6, 2006.

HARRIS, B; BACHMAN, K C. **Nutritional and Management Factors Affecting Solids-Not-Fat, Acidity and Freezing Point of Milk 1 Solids-Not-Fat**. [S. l.: s. n.], 2003. Disponível em: <http://edis.ifas.ufl.edu>. .

HAUSER, A. *et al.* Effect of heat stress and solar radiation on dry matter intake, biochemical indicators, production, and quality of Holstein and Jersey cows' milk. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, [s. l.], v. 75, n. 4, p. 721–734, 2023.

HEBISHY, Essam *et al.* Influence of calcium-binding salts on heat stability and fouling of whey protein isolate dispersions. **International Dairy Journal**, [s. l.], v. 91, p. 71–81, 2019.

HEISLER, Guilherme *et al.* Avaliação das características físico químicas do leite nos primeiros 21 dias de lactação. *In:* , 2017, Curitiba. **Anais do VII Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite**. Curitiba: [s. n.], 2017. p. 221–221.

HENNO, M. *et al.* Factors affecting the freezing point stability of milk from individual cows. **International Dairy Journal**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 210–215, 2008.

HOLT, Carl. Casein and casein micelle structures, functions and diversity in 20 species. **International Dairy Journal**, [s. l.], v. 60, p. 2–13, 2016.

HOLT, C. *et al.* Invited review: Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods1. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 96, n. 10, p. 6127–6146, 2013.

HOLT, Carl; DALGLEISH, Douglas G.; JENNESS, Robert. Calculation of the ion equilibria in milk diffusate and comparison with experiment. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 113, n. 1, p. 154–163, 1981.

HORNE, D. S. Ethanol Stability and Milk Composition. **Advanced Dairy Chemistry**, [s. l.], v. 1, p. 225–246, 2016.

HORNE, David S.; MUIR, D. Donald. Alcohol and Heat Stability of Milk Protein. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 73, n. 12, p. 3613–3626, 1990.

HORNE, David S.; PARKER, Thomas G. Factors affecting the ethanol stability of bovine milk IV. Effect of forewarming. **Journal of Dairy Research**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 405–415, 1981.

JAMALI, Hossein *et al.* Invited review: Incidence, risk factors, and effects of clinical mastitis recurrence in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 101, n. 6, p. 4729–4746, 2018.

JÕUDU, Ivi *et al.* The effect of milk protein contents on the rennet coagulation properties of milk from individual dairy cows. **International Dairy Journal**, [s. l.], v. 18, n. 9, p. 964–967, 2008.

JÚNIOR, L C Roma *et al.* Sazonalidade do teor de proteína e outros componentes do leite e sua relação com programa de pagamento por qualidade [Seasonability of protein and others milk components related with quality payment program] **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** [S. l.: s. n.], 2009.

KAPPES, Roberto *et al.* Cow's functional traits and physiological status and their relation with milk yield and milk quality in a compost bedded pack barn system. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s. l.], v. 49, 2020.

KAPPES, Roberto *et al.* Rumination time, activity index, and productive performance of Holstein and crossbred Holstein × jersey cows exposed to different temperature-humidity indexes. **International Journal of Biometeorology**, [s. l.], v. 66, n. 4, p. 791–801, 2022.

KEDZIERSKA-MATYSEK, Monika *et al.* The effects of breed and other factors on the composition and freezing point of cow's milk in Poland. **International Journal of Dairy Technology**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 336–342, 2011.

KENNEDY, B. W. *et al.* Environmental Factors Influencing Test-Day Somatic Cell Counts in Holsteins. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 65, n. 2, p. 275–280, 1982.

KINDSTEDT, Paul. **American Farmstead Cheese**. [S. l.: s. n.], 2005.

KLOP, G. *et al.* Meta-analysis of factors that affect the utilization efficiency of phosphorus in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 96, n. 6, p. 3936–3949, 2013.

KOLING, Giovani Jacob. **Influência da mastite na qualidade do leite e leite instável não ácido em diferentes quartos mamários**. 2012. DISSERTAÇÃO - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, Porto Alegre, 2012.

KUL, Ertuğrul *et al.* The effects of somatic cell count on milk yield and milk composition in Holstein cows. **Veterinarski Arhiv**, [s. l.], v. 89, n. 2, p. 143–154, 2019.

LAI, C. Y. *et al.* Physico-chemical and microbiological qualities of locally produced raw goat milk. **International Food Research Journal**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 739–750, 2016.

LEWIS, Michael J. The measurement and significance of ionic calcium in milk – A review. **International Journal of Dairy Technology**, [s. l.], 2011.

LI, N. *et al.* **Role of somatic cells on dairy processes and products: A review**. [S. l.]: Springer-Verlag France, 2014.

LI, Siqi; YE, Aiqian; SINGH, Harjinder. Seasonal variations in composition, properties, and heat-induced changes in bovine milk in a seasonal calving system. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 102, n. 9, p. 7747–7759, 2019.

LINHARES, Julia Cosati; Landin, Ana Paula Miguel; Ribeiro, Laryssa Freitas. Avaliação das boas práticas agropecuárias (bpa's) na ordenha em relação à qualidade do leite. **GETEC**, [s. l.], v. 10, n. 32, p. 10–36, 2021.

MACCIOTTA, N. P.O. *et al.* Of Multivariate Factor Analysis To Define New Indicator Variables For Milk Composition And Coagulation Properties In Brown Swiss Cows. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 95, p. 7346-7354, 2012.

MACCIOTTA, N. P.P.; VICARIO, D.; CAPPIO-BORLINO, A. Detection of different shapes of lactation curve for milk yield in dairy cattle by empirical mathematical models. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 88, n. 3, p. 1178–1191, 2005.

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

MADSEN, Birgitte D. *et al.* Physical properties of mammary secretions in relation to chemical changes during transition from colostrum to milk. **Journal of Dairy Research**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 263–272, 2004.

MALACARNE, Massimo *et al.* Minerals content and distribution in milk from red deer (*Cervus elaphus*), fallow deer (*Dama dama*) and roe deer (*Capreolus capreolus*). **Small Ruminant Research**, [s. l.], v. 130, p. 208–215, 2015.

MANSKE, Guilherme Augusto *et al.* Ocorrência de Leite Instável Não Ácido (LINA) em propriedades comerciais da região Extremo Oeste de Santa Catarina. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. e715974654, 2020.

MARÉCHAL, Caroline Le *et al.* **Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products-A review**. [S. l.: s. n.], 2011.

MARIANI, Elena *et al.* Effect of total and differential somatic cell count on yield, composition and predicted coagulation properties from individual dairy cows. **International Journal of Dairy Technology**, [s. l.], v. 75, n. 2, p. 298–307, 2022.

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

MARTINS, Fernanda Antunes *et al.* Characterization of variables related to high stability of raw cow milk. **Journal of Dairy Research**, [s. l.], v. 91, n. 1, p. 89–95, 2024.

MARTINS, Cristian Marlon de Magalhães Rodrigues *et al.* Subclinical intramammary infection does not affect bovine milk ethanol stability. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, [s. l.], v. 55, n. 2, 2019.

MATTIELLO, C. A. *et al.* Industrial yield, manufacturing efficiency and physical and chemical characteristics of colonial cheese produced from milk with two levels of somatic cells. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s. l.], v. 70, n. 6, p. 1916–1924, 2018.

MC SWEENEY, Paul L.H.; O MAHONY, James A. **Advanced dairy chemistry volume 1B: Proteins: Applied aspects: Fourth edition**. [S. l.: s. n.], 2016.

MCSWEENEY, P. L.H.; MCNAMARA, J. P. (Eds.). **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 3. ed. Cambridge: Elsevier, 2022. 4874p.

MELE, M. *et al.* Multivariate factor analysis of detailed milk fatty acid profile: Effects of dairy system, feeding, herd, parity, and stage of lactation. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 99, n. 12, p. 9820–9833, 2016.

MOSLEHISHAD, M.; EZZATPANAH, H; AMINAFSHAR, M. Chemical and electrophoretic properties of Holstein cow milk as affected by somatic cell count. **International Journal of Dairy Technology**, [s. l.], v. 63, 2010.

MÜLLER, Thaís; REMPEL, Claudete. Qualidade do leite bovino produzido no Brasil – parâmetros físico-químicos e microbiológicos: uma revisão integrativa. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 122–129, 2021.

NEGRÃO, Fagton de Mattos *et al.* Fatores que afetam a produção e a composição do leite – Proteína. **Dataset Reports**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 9–30, 2024.

NERO, Luis Augusto; CARVALHO, Antonio Fernandes. **Raw Milk Balance Between Hazards and Benefits**. 1. ed. [S. l.: s. n.], 2019. v. 1

NOGALSKA, Anna; MOMOT, Martyna; NOGALSKI, Zenon. The mineral composition of milk from high-yielding dairy cows depending on the month of lactation and udder health. **Applied Sciences (Switzerland)**, [s. l.], v. 10, n. 14, 2020.

NORMAN, H.D.; WALTON, L.M.; DÜRR, J. State and national standardized lactation averages by breed for cows calving in 2015. **Council on Dairy Cattle Breeding**, [s. l.], 2017.

NÖRNBERG, Maria F.B.L. *et al.* Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. **International Journal of Dairy Technology**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 41–46, 2010.

NORO, Giovani *et al.* Fatores ambientais que afetam a produção e a composição do leite em rebanhos assistidos por cooperativas no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s. l.], v. 35, n. 3 suppl, p. 1129–1135, 2006.

OLEJNIK, P. Variation of somatic cell counts in colostrum and milk of first and second lactation cows during ten days after calving. **Vet Med (Praha)**, [s. l.], 1994.

OLIVEIRA, Carlos Augusto Fernandes *et al.* Composição, contagem de células somáticas e frações de caseína em leites instáveis ao etanol. **Acta Scientiarum - Technology**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 153–156, 2013.

OLIVEIRA, I. C. Uma revisão sobre o efeito do hexametáfosfato de sódio na estrutura das micelas de caseína. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 11, n. 3, 2022.

OLIVEIRA FILHO, J. G.; AL., Et. **Cadernos de Agroecologia**. [S. l.]: v. 9, n. 4, 2014.

OLIVEIRA, Nucia Alexandra; ROSA, Helena Alpini; SILVA, Denize Aparecida. A História no Currículo base do Território Catarinense. **Fronteiras: Revista Catarinense de História.**, [s. l.], n. 2, 2019.

OLIVEIRA, D. S.; TIMM, C. D. Instabilidade da caseína em leite sem acidez adquirida. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, [s. l.], v. 102, p. 17–22, 2007.

PELIZZA, Angela. **Características de produção e composição do leite e do perfil metabólico de vacas da raça Holandês e mestiças Holandês x Jersey no período do periparto**. 2015. 1–126 f. PhD Thesis - Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, [s. l.], 2015.

PEREIRA, Alfredo Ribeiro *et al.* Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, [s. l.], 1999.

QIAO, Fulong *et al.* Kinetics of glucose transport and sequestration in lactating bovine mammary glands measured in vivo with a paired indicator/nutrient dilution technique. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 99, n. 3, p. 799–806, 2005a.

QIAO, Fulong *et al.* Kinetics of glucose transport and sequestration in lactating bovine mammary glands measured in vivo with a paired indicator/nutrient dilution technique. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 99, n. 3, p. 799–806, 2005b.

RAIMONDO, R. F.S. *et al.* Teores de cloretos, lactose e índice cloretos/lactose na secreção láctea de bovinos da raça Jersey no primeiro mês da lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. 259–265, 2009.

RUEGG, P L; PANTOJA, J C F. **Understanding and using somatic cell counts to improve milk quality**Source: **Irish Journal of Agricultural and Food Research**. [S. l.: s. n.], 2013.

SANTOS, MARCOS VEIGA DOS. Aspectos não microbiológicos afetando a qualidade do leite. *In*: Leite, Congresso Brasileiro de Qualidade do (org.). **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. [S. l.]: Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 2004. (, v. Passo Fundo. Anais... Passo Fundo). v. 1.

SANTOS, N.A.F. *et al.* Avaliação Da Composição E Qualidade Físico-Química Do Leite Pasteurizado Pradonizado Comercializado Na Cidade De São Luís, Ma. **Arquivos do Instituto Biológico**, [s. l.], v. 78, n. 1, p. 109–113, 2011.

SANTOS, Marcos Veiga dos; FONSECA, Luiz Fernando Laranja da. **Controle da Mastite e qualidade do leite - Desafios e soluções**. Pirassunungaed. Pirassununga: [s. n.], 2019. v. 1

SCHMIDT, Fernando André. **Efeito do Suprimento das Exigências de Energia e/ou Proteína na Recuperação da Instabilidade do Leite ao Teste do Álcool**. 2014. 78 f. PhD Thesis - Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages., [s. l.], 2014.

SCHMIDT, F.A. *et al.* Energy and protein levels in dairy cow diets to recover milk ethanol stability. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], 2024.

SCHMIDT, Karen A. *et al.* Factors affecting titratable acidity in raw milk (1996). **Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports**, [s. l.], n. 2, p. 60–62, 1996.

SCHMITZ, Bruna. **Características funcionais do leite bovino: efeitos do período de lactação e de grupos genéticos**. 2023. 103 f. PhD Thesis - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2023.

SCHMITZ, Bruna *et al.* Variation in bovine milk stability according to lactational stage and genetic group. **Journal of Dairy Research**, [s. l.], p. 1–6, 2024.

SCHROEDER, J W. Mastitis Control Programs Bovine Mastitis and Milking Management. [s. l.], 1997.

SILVA, Naaman Nogueira *et al.* Casein micelles: From the monomers to the supramolecular structure. **Brazilian Journal of Food Technology**, [s. l.], v. 22, p. 1–15, 2019.

SILVA, Livia Cavaletti Corrêa *et al.* Estabilidade térmica da caseína e estabilidade ao álcool 68, 72, 75 e 78% em leite bovino. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, [s. l.], v. 67, n. 384, p. 55–60, 2012.

STELWAGEN, K. *et al.* No Evidence for Basolateral Secretion of Milk Protein in the Mammary Gland of Lactating Goats. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 81, n. 2, p. 434–437, 1998.

STOCCO, Giorgia *et al.* Differential somatic cell count as a novel indicator of milk quality in dairy cows. **Animals**, [s. l.], v. 10, n. 5, 2020.

STOCCO, Giorgia *et al.* The mineral profile affects the coagulation pattern and cheese-making efficiency of bovine milk. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 104, n. 8, p. 8439–8453, 2021.

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

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

TACOMA, Rinske *et al.* TACOMA, Rinske *et al.* Characterization of the bovine milk proteome in early-lactation Holstein and Jersey breeds of dairy cows. *Journal of Proteomics*, v. 130, p. 200–210, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2015.09.024>>. Characterization. **Journal of Proteomics**, [s. l.], v. 130, p. 200–210, 2016.

TEKERLI, M. *et al.* Factors affecting the shape of lactation curves of Holstein cows from the Balıkesir Province of Turkey. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 83, n. 6, p. 1381–1386, 2000.

THALER NETO, André *et al.* Pontos Críticos Da Qualidade Do Leite. **Anais Do IV Simpósio Nacional Da Vaca Leiteira – Porto Alegre**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 246–255, 2017.

TIMLIN, Mark *et al.* The impact of seasonality in pasture-based production systems on milk composition and functionality. **Foods**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 1–32, 2021.

TOFFANIN, V. *et al.* Genetic parameters for milk mineral content and acidity predicted by mid-infrared spectroscopy in Holstein-Friesian cows. **Animal**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 775–780, 2015.

TOMAZI, T. *et al.* Bovine subclinical intramammary infection caused by coagulase-negative staphylococci increases somatic cell count but has no effect on milk yield or composition. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 98, n. 5, p. 3071–3078, 2015.

TOMMASONI, Chiara *et al.* Mastitis in Dairy Cattle: On-Farm Diagnostics and Future Perspectives. **Animals**, [s. l.], v. 13, n. 15, p. 1–15, 2023.

TÖPEL, A. **Chemie und Physik der Milch**. [S. l.]: Naturstoff – Rohstoff – Lebensmittel. Hamburg: Behr's Verlag, 2015.

TSIOULPAS, A. *et al.* Effects of stabiliser addition and in-container sterilisation on selected properties of milk related to casein micelle stability. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 122, n. 4, p. 1027–1034, 2010.

TSIOULPAS, Alexandros; LEWIS, Michael J.; GRANDISON, Alistair S. Effect of minerals on casein micelle stability of cows' milk. **Journal of Dairy Research**, [s. l.], v. 74, n. 2, p. 167–173, 2007.



URECH, E.; PUHAN, Z.; SCHÄLLIBAUM, M. Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 82, n. 11, p. 2402–2411, 1999.

VIDAL, Ana Maria Centola; SARAN NETTO, Arlindo. **Obtenção e processamento do leite e derivados**. Pirassuninga: Universidade de São Paulo. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, 2018. v. 1

VISENTIN, G. *et al.* Processing characteristics of dairy cow milk are moderately heritable. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 100, n. 8, p. 6343–6355, 2017.

WERNCKE, DAÍSE. **Relação Entre Restrição Nutricional e Acidose Ruminal Com As Alterações Na Produção e Composição Do Leite**. 2017. 6–18 f. PhD Thesis - Tese apresentada como um dos requisitos à obtenção do grau Doutor em Zootecnia, Porto Alegre, [s. l.], 2017.

WHEELOCK, J. B. *et al.* Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 93, n. 2, p. 644–655, 2010.

WU, Z.; SATTER, L. D.; SOJO, R. Milk production, reproductive performance, and fecal excretion of phosphorus by dairy cows fed three amounts of phosphorus. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 83, n. 5, p. 1028–1041, 2000.

YOON, J. T. *et al.* Effects of milk production, season, parity and lactation period on variations of milk urea nitrogen concentration and milk components of Holstein dairy cows. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 479–484, 2004.

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

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

ZANELA, Maira Balbinotti; RIBEIRO, Maria Edi Rocha. LINA - Leite instável não ácido qualidade do leite. **Embrapa**, [s. l.], n. 356, p. 19, 2018.

ZANELA, Maria Balbinotti; RIBEIRO, Maria Edi Rocha; FISCHER, Vivian. Leite instável não ácido (LINA): Do campo a indústria 1 Zanela. **VI Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite. Minicurso- Universidade Federal do Paraná (UFPR)**, [s. l.], n. 1, p. 1–16, 2015.