

## CAPÍTULO 9

### FATORES NUTRICIONAIS E METABÓLICOS DE VACAS LEITEIRAS EM LACTAÇÃO QUE ALTERAM A COMPOSIÇÃO E A ESTABILIDADE DO LEITE

**Cristian Marlon de Magalhães Rodrigues Martins<sup>1</sup>, Marcos André Arcari<sup>1</sup>, Aline Gerato Dibbern<sup>1</sup>, Juliana Regina Barreiro<sup>1</sup>, Juliano Leonel Gonçalves<sup>1</sup>, Marcos Veiga dos Santos<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Nutrição e Produção Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Av. Duque de Caxias Norte, 225. CEP 13635-900. Pirassununga-SP. Brasil. mveiga@usp.br

#### RESUMO

A baixa estabilidade das proteínas do leite ao etanol (teste do álcool) e durante o processamento térmico industrial causa prejuízos econômicos em todos os elos da cadeia agroindustrial do leite. No Brasil, e em demais países que ainda utilizam o teste do álcool como um método de avaliação da qualidade do leite cru, foi relatada alta frequência de leite instável ao etanol, porém sem acidez resultante de ação microbiana (leite instável não ácido – LINA). Na última década, estudos se intensificaram em busca das causas da elevada ocorrência de LINA no Brasil, e fatores ambientais, genéticos, nutricionais e metabólicos das vacas leiteiras foram associados com a ocorrência de LINA. Estudos demonstraram que a deficiência nutricional das vacas leiteiras pode reduzir a estabilidade do leite por meio de alterações na composição da micela de caseína e do aumento do espaço intercelular (junções firmes) do epitélio alveolar mamário. Por outro lado, alterações no equilíbrio ácido-base do sangue, como acidose metabólica resultante da acidose ruminal ou de alterações no balanço cátion-aniônico da dieta, também podem reduzir a estabilidade do leite devido ao aumento das concentrações de cátions bivalentes, principalmente cálcio iônico. Desta forma, estudos sugerem que para prevenir a ocorrência de LINA, a elevada exigência nutricional de vacas leiteiras em lactação deve ser atendida, porém, distúrbios digestivos e metabólicos devem ser prevenidos e controlados.

#### INTRODUÇÃO

O termo “estabilidade do leite” refere-se à resistência relativa das proteínas em suportar o tratamento térmico industrial e/ou à reação com o etanol (estabilidade do leite ao etanol) sem sofrer coagulação (Singh, 2004). A estabilidade das proteínas é um fator importante para o processamento

industrial do leite, especialmente para a fabricação de derivados que necessitam tratamentos térmicos intensos, como o leite longa vida (UAT) e leite em pó. Desta forma, em vários países, antes da coleta de leite na fazenda e/ou nas plataformas de recebimento dos laticínios, ainda é utilizada a estabilidade do leite ao etanol (teste do álcool ou alizarol) como uma forma de estimar a estabilidade térmica das proteínas.

A instabilidade das proteínas do leite ao etanol causa prejuízos aos produtores, devido à penalidade no preço e ou rejeição do leite quando o mesmo coagula no teste do álcool, às indústrias, pois o leite de baixa estabilidade tem menor capacidade em resistir o tratamento térmico sem formar coágulos, e aos consumidores, pois o leite de baixa estabilidade após os processamentos térmicos pode ter maior facilidade de formar coágulos durante a estocagem (McMahon, 1995; Fisher et al., 2012; Holt et al., 2013). Em diversas regiões do Brasil (Zanela et al., 2006; Marques et al., 2007; Botaro et al., 2009; Fisher et al., 2012; Oliveira et al., 2013) e em outros países que utilizam a estabilidade do leite ao etanol como um critério de qualidade do leite (Barros et al., 1999; Molina et al., 2001; Negri et al., 2003; Chaves et al., 2004) foi relatada alta frequência de leite de baixa estabilidade, no entanto, sem acidez resultante de ação microbiana. Desta forma, fatores não microbiológicos, como predisposição genética e condições nutricionais e metabólicas das vacas leiteiras, foram relatados como as principais causas da instabilidade do leite ao etanol (Marques et al., 2011; Barbosa et al., 2011; Fisher et al., 2012).

O leite instável ao etanol com valores normais de pH e acidez titulável foi denominado no Brasil como leite instável não ácido (LINA) (Zanela et al., 2006). Tal situação foi associada a alterações nas micelas de caseína, equilíbrio salino e concentração de cátions bivalentes no leite (Marques et al., 2011; Barbosa et al., 2012; Fisher et al., 2013). Ainda há poucos estudos que avaliaram o efeito isolado de cada fator que pode alterar a estabilidade do leite, o que dificulta a implementação de medidas de prevenção e correção do LINA nas fazendas leiteiras. Desta forma, neste capítulo serão apresentadas informações sobre definições e ocorrência de LINA, alterações na composição do leite que facilitam a coagulação das proteínas, fatores que podem alterar a composição e a estabilidade do leite e medidas de prevenção da ocorrência de LINA.

### **LEITE INSTÁVEL NÃO ÁCIDO: CONCEITO E OCORRÊNCIA**

A crescente demanda por qualidade e segurança dos produtos de origem animal durante a produção, impôs maior exigência sobre os produtores rurais com relação à produção de leite de alta qualidade. Desta forma, em 2005, entrou em vigor a Instrução Normativa 51 do Ministério da Agricultura (MAPA) (Brasil, 2002), cujo objetivo foi controlar e padronizar a

qualidade do leite cru no Brasil. Esta normativa estabeleceu padrões mínimos de qualidade do leite cru para o recebimento pelas indústrias, com base na composição química ( $\geq 3,0\%$  de gordura,  $\geq 2,9\%$  de proteína e  $\geq 8,4\%$  de extrato seco desengordurado) e critérios de higiene, saúde da vaca e de segurança alimentar (contagem de células somáticas - CCS, contagem bacteriana total - CBT, resíduos contaminantes e adulterantes do leite). Os critérios de qualidade higiênica e sanitária do leite (CCS e CBT) foram alterados pela Instrução Normativa MAPA Nº 62 (IN 62/2011), com o objetivo de até o ano de 2017, o leite comercializado no Brasil apresentar limites de CCS  $\leq 400$  mil Células/mL e de CBT  $\leq 100$  mil UFC/mL (Brasil, 2011). Outro importante critério de qualidade do leite regulamentado pela IN 62 foi a estabilidade do leite.

O termo “estabilidade do leite” refere-se à resistência relativa das proteínas (caseínas) em suportar o tratamento térmico industrial (estabilidade térmica) sem sofrer coagulação, ou então, não formar coágulos durante a reação com o etanol (teste do álcool) utilizado antes da coleta do leite nas fazendas (Brasil, 2011). O teste do álcool ou alizarol ainda é utilizado para estimar a estabilidade térmica do leite antes de ser captado na fazenda ou logo após a chegada na indústria, com o objetivo de destinar o leite para o processamento térmico mais adequado com base no resultado de estabilidade ao etanol. De acordo com a IN MAPA 62/2011, o teste do álcool consiste na mistura das mesmas proporções (v/v) de leite e etanol (mínimo de 72% de etanol), e o resultado é baseado na visualização da formação de coágulos, cujo resultado deve ser negativo para concentração de etanol na mistura  $\leq 72\%$  (Figura 1) (Brasil, 2011).

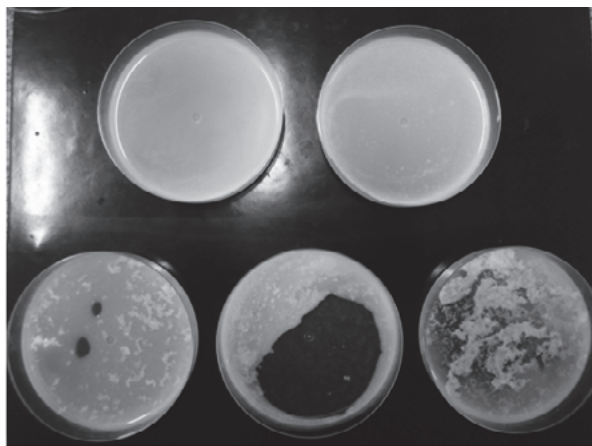


Figura 1 - Leite estável e diferentes níveis de coagulação do LINA ao etanol 72%.  
Fonte: Martins, C. M. M. R. (2014).

A utilização do teste do álcool para estimar a estabilidade térmica do leite é baseada na resistência das micelas de caseína em manter-se estável em contato com o etanol. A adição de etanol a uma solução aquosa diminui a constante dielétrica do fluido, favorecendo as interações eletrostáticas (Mikheeva et al., 2003). Desta forma, a adição de etanol no leite resulta em colapso da região C-terminal da  $\kappa$ -caseína, aumento do pKa dos resíduos glutamato e aspartato e redução da solubilidade do cálcio e dos fosfatos da micela, fatores estes que contribuem para reduzir a força de repulsão eletrostática entre as micelas, o que facilita a coagulação. Ao expor o interior hidrofóbico da micela ao contato com a água e com íons, as caseínas se aglomeram formando um tipo de “gel” na superfície do leite, caracterizado como o processo de coagulação (O’Connell et al., 2006).

Problemas com baixa estabilidade do leite ao etanol ocorrem em diversas regiões do Brasil e de demais países que utilizam o teste do álcool como uma forma de estimar a qualidade do leite (Barros et al., 1999; Chaves et al., 2004; Fisher et al., 2012). Primeiramente, problemas de baixa estabilidade do leite foram associados à acidificação do leite resultante de ação microbiana (leite ácido), principalmente devido à deficiência de higiene durante a ordenha e/ou de armazenamento do leite. Neste caso, a baixa estabilidade do leite poderia ser resultante da fermentação bacteriana da lactose do leite, com produção de ácido láctico e redução do pH, resultando em leite ácido. A acidificação reduz a carga e a hidratação das proteínas do leite, o que aumenta a atração eletrostática entre as moléculas de caseína e reduz a distância entre elas, facilitando a coagulação (O’Connell et al., 2006; Santos e Fonseca, 2007). De outra forma, a ação enzimática resultante da elevada contaminação microbiana do leite pode agir sobre a  $\kappa$ -caseína e contribuir para a menor estabilidade do leite (Santos e Fonseca, 2007). A hidrólise enzimática da  $\kappa$ -caseína reduz a estabilização esférica das micelas de caseína, bem como a repulsão eletrostática intermicelar, o que resulta em coagulação do leite (Fox et al., 1996). Adicionalmente, microrganismos psicrotóxicos, que se multiplicam no leite sob baixas temperaturas, produzem proteases termoestáveis que agem sobre a  $\kappa$ -caseína, o que reduz o tempo de prateleira do leite pela formação de coágulos proteicos (Fairbairn e Law, 1986).

Estudos realizados no Brasil (Zanela et al., 2006; Marques et al., 2007; Oliveira et al., 2013) relataram alta frequência de leite instável, no entanto sem acidez resultante de ação microbiana. O leite instável com valores normais de pH e acidez titulável foi denominado no Brasil como leite instável não ácido (LINA), e de acordo com Fisher et al. (2012) apresenta qualidade adequada para o consumo humano (Tabela 1), sendo que a única limitação é a baixa capacidade de resistir ao tratamento térmico industrial sem sofrer coagulação, gerando prejuízos em todos os elos da cadeia agroindustrial do leite. Marques

et al. (2007) avaliaram 9.892 amostras de leite coletadas no período de abril de 2002 a setembro de 2003 e relataram que 58% das amostras avaliadas foram instáveis ao etanol 76%, porém com valores normais de pH e acidez titulável. A alta ocorrência de LINA foi observada em alguns estados do Brasil, como Rio Grande do Sul (Marques et al., 2007; Zanela et al. 2009), Paraná (Marx et al., 2011) e São Paulo (Botaro et al., 2009; Oliveira et al., 2013), resultando em grandes prejuízos aos produtores, pela penalização no preço ou descarte do LINA; às indústrias, uma vez que quando processado o LINA pode coagular durante o processamento e resultar em descarte de leite e gastos adicionais de limpeza; e aos consumidores, pois após os processos de aquecimento, secagem e refrigeração o leite instável pode ter tempo de prateleira reduzido devido a maior facilidade de precipitação durante a estocagem.

Tabela 1 - Composição físico-química do leite normal e instável não ácido\*.

Variável	Leite estável	LINA	P
Gordura, %	3,48	3,60	0,0001
Proteína Bruta, %	3,03	3,04	NS
Lactose, %	4,39	4,28	0,0001
EST, %	10,90	10,93	NS
Crioscopia (°H)	-0,544	-0,544	NS
Redutase (Class., 1, 2 e 3)	1,08	1,08	NS
CCS (Cél/mL de leite)	425	454	NS

\*Adaptado de Marques et al. (2007). NS = Não significativo.

No Brasil, durante a última década, a produção de leite e as exigências por qualidade em busca da maior segurança alimentar dos derivados lácteos foram elevadas significativamente. Atualmente, o leite processamento por Ultra Alta Temperatura (UAT) representa a grande maioria do leite fluído comercializado no Brasil, além de ser um dos principais derivados exportados, atrás apenas do leite em pó e do leite concentrado (MDIC, 2014). A produção destes derivados exige alta estabilidade das proteínas do leite, uma vez que ocorrem intensos tratamentos térmicos durante o processo de fabricação. Desta forma, recentes estudos foram desenvolvidos em busca dos fatores associados com a estabilidade do leite não ácido, e das principais medidas de prevenção e correção da instabilidade do leite nas fazendas (Zanela et al., 2006; Marques et al., 2011; Barbosa et al., 2012; Martins et al., 2013a; Martins et al., 2014). Os principais estudos indicam que estabilidade das proteínas esta associada com a composição da micela de caseína, equilíbrio salino e interações iônicas entre cátions bivalentes livres no leite e complexados na micela de caseína.

## FATORES ASSOCIADOS COM A ESTABILIDADE DO LEITE

### PROTEÍNAS DO LEITE

A função nutricional básica das proteínas do leite é fornecer aminoácidos essenciais ao neonato e proteínas bioativas (anticorpos). A síntese de proteína nas células secretoras do alvéolo mamário ocorre no retículo endoplasmático rugoso a partir de aminoácidos do sangue. Após a síntese, as proteínas são transportadas para o aparelho de Golgi e posteriormente secretadas na forma de vesículas para o lúmen alveolar. Algumas proteínas presentes no leite são oriundas do sangue, sendo transportadas e secretadas para o lúmen alveolar. De forma semelhante, as imunoglobulinas são transportadas a partir do sangue e vasos linfáticos para o leite. As proteínas do leite podem ser classificadas em dois grupos: as proteínas do soro e as caseínas. A definição para distinguir estes dois grandes grupos é baseada na coagulação e precipitação das proteínas do leite: as caseínas são as proteínas que precipitam em pH= 4,6; enquanto que as proteínas do soro não sofrem esta precipitação. Além destes grupos, o leite apresenta uma fração de compostos nitrogenados não-protéicos (NNP) (principalmente ureia, creatinina e creatina), originários do sangue, que podem representar cerca de 5% da proteína bruta do leite (Santos e Fonseca, 2007).

A caseína é a principal proteína encontrada no leite, pois forma 80% das proteínas lácteas (Cheftel et al., 1989). O leite de vaca contém diferentes subunidades de caseína:  $\alpha$  (S1 e S2),  $\beta$  e  $\kappa$ -caseína (Fonseca e Santos, 2000). As subunidades  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$ , e  $\kappa$  são encontradas no leite nas proporções 4:1:4:1, respectivamente (Walstra, 1999; Santos e Fonseca, 2007). A caseína é sintetizada na glândula mamária e secretada no leite na forma de micelas (Fonseca e Santos, 2000). Portanto, a caseína do leite é um agrupamento em micelas (associação em coloides) das subunidades proteicas  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$ , e  $\kappa$ -caseínas, interligadas por fosfato de cálcio (Walstra, 1999; Oliveira e Timm, 2007).

As micelas de caseína variam quanto à composição de submicelas em dois tipos principais: 1) formado por  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseína; e 2) formado por  $\alpha$  e  $\kappa$ -caseína. As submicelas são interligadas por íons até formar por completo a micela de caseína propriamente dita. Durante a formação da micela, o arranjo dimensional das ligações entre submicelas aloja a  $\kappa$ -caseína na parte externa da micela, onde o C-terminal da  $\kappa$ -caseína se projeta para fora da micela, o que resulta em aspecto de camada esponjosa (Walstra, 1999). A  $\kappa$ -caseína é projetada na parte externa por ser hidrofílica e estável na presença de íons de cálcio, e, desta forma, protege o interior micelar hidrofóbico e cálcio sensível (composto por  $\alpha$  e  $\beta$ -caseína) do contato com a água e da ionização com o cálcio. Adicionalmente, a  $\kappa$ -caseína reage com a água e impede a agregação das micelas por repulsão eletrostática (Creamer et al., 1998; Walstra, 1999). As caseínas  $\alpha$  e  $\beta$  são as frações em maior proporção entre as caseínas do

leite, porém são hidrofóbicas e sensíveis a presença de cálcio, e, portanto, são projetadas no interior da micela de caseína (Figura 2) (Swaisgood, 2003). A  $\beta$ -caseína é considerada a caseína mais hidrofóbica encontrada no leite por apresentar um largo C-terminal hidrofóbico dominante, baseado na estrutura primária (Swaisgood, 2003). Desta forma, a presença de  $\kappa$ -caseína e a concentração de cálcio iônico foram os principais fatores associados com a estabilidade das micelas de caseína, uma vez que a  $\kappa$ -caseína é a única caseína hidrofílica e estável à presença de cálcio livre.

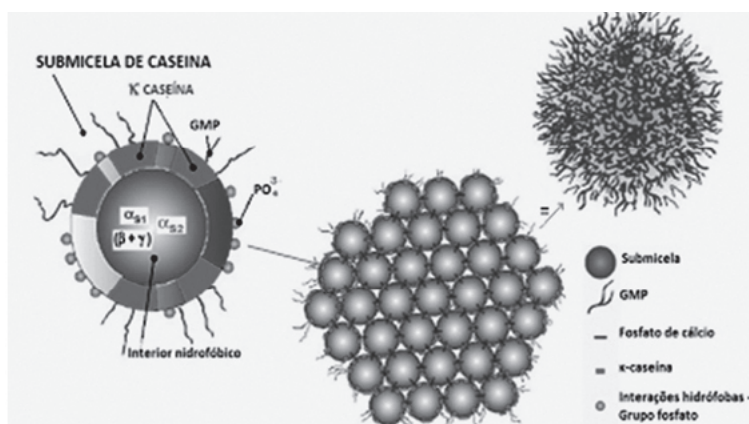


Figura 2 - Figura esquemática da micela de caseína do leite. Fonte: adaptado de Di Martins, A (2009).

O arranjo micelar das subunidades de caseína confere à micela resistência aos tratamentos térmicos industriais e estabilidade aos derivados lácteos durante a armazenagem nas prateleiras do comércio varejista, uma vez que precipitados poderiam ocorrer se houvesse alterações principalmente na concentração de  $\kappa$ -caseína e de cálcio iônico do leite (Fisher et al., 2012). Além de manter as caseínas estáveis ao etanol e ao aquecimento térmico, a organização micela das subunidades de caseína facilita a ação da enzima quimosina para a clivagem na ligação peptídica Phe105 – Met106 da  $\kappa$ -caseína no estômago humano e/ou no abomaso do bezerro, o que contribui para a adequada nutrição e maior aproveitamento dos aminoácidos contidos na caseína durante os processos de digestão e absorção. A estrutura aberta das micelas de caseína, resultantes da clivagem da  $\kappa$ -caseína, permite o acesso de proteínases. Esta clivagem expõe o interior hidrofóbico da micela de caseína, resultando em susceptibilidade das micelas de caseína em formar um gel (coalho). Adicionalmente, o fosfato de cálcio se dissolve a medida que o pH decresce, as caseínas são liberadas para reorganizar-se e formar uma rede mais



extensa de interações do que era possível na micela, o que aumenta o tempo de retenção da micela no estômago e facilita a digestão das proteínas e absorção dos aminoácidos no intestino (Holt et al., 2013).

As proteínas do soro também podem contribuir para alterar a estabilidade das micelas de caseína. Dentre as 4 principais proteínas do soro, apenas duas são sintetizadas na glândula mamária ( $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina), enquanto que as demais são originadas do sangue (albumina sérica e imunoglobulinas). Em condições normais, a  $\beta$ -lactoglobulina é a proteína do soro presente em maior concentração no leite (representa cerca de 50% das proteínas do soro). A função biológica da  $\beta$ -lactoglobulina ainda não é totalmente conhecida, mas está associada com o metabolismo do fosfato na glândula mamária, e no transporte da vitamina A e outras moléculas hidrofóbicas, como os ácidos graxos no trato gastrointestinal de neonatos (Kontopidis; Holt e Sawyer, 2004). A  $\beta$ -lactoglobulina é uma proteína termolábil e apresenta certa capacidade de sequestrar o cálcio em um dado pH; e os níveis de cálcio determinam as interações da  $\beta$ -lactoglobulina com demais proteínas do leite (Singh e Fox, 1987). A  $\beta$ -lactoglobulina apresenta reatividade com a  $\kappa$ -caseína (localizada na região externa da micela), e as interações entre estas duas proteínas pode contribuir para reduzir a estabilidade das micelas (Figura 3) (Martins et al. – submetido para publicação).

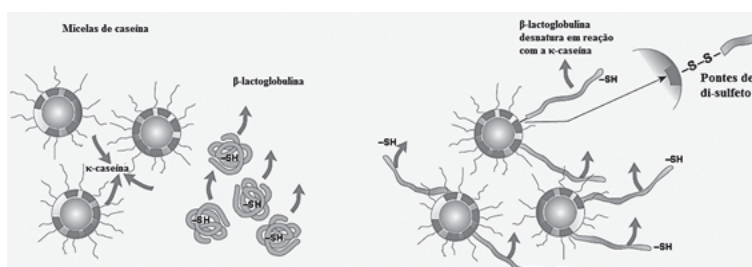


Figura 3 - Reação da  $\beta$ -lactoglobulina com a  $\kappa$ -caseína na micela durante o tratamento térmico do leite. Fonte: Adaptado de Bylund, G. (1995).

Alterações nas proteínas  $\kappa$ -caseína e  $\beta$ -lactoglobulina foram sugeridas como fatores que podem contribuir para a ocorrência de LINA. As soroproteínas são desnaturadas durante o tratamento térmico, e, como resultado, reagem com a  $\kappa$ -caseína na micela e podem reduzir a estabilidade do leite. A intensidade de interações da  $\kappa$ -caseína com a  $\beta$ -lactoglobulina depende da concentração de cálcio livre no leite (Martins et al., 2014). Adicionalmente, segundo Jeurnink e De Kruif (1995), a concentração de cálcio livre do leite também determina se o complexo  $\beta$ -lactoglobulina/ $\kappa$ -caseína permanece na superfície da micela ou dissocia-se para o soro; e quando este último ocorre, o interior hidrofóbico



composto pelas caseínas cálcio-sensíveis ( $\alpha$  e  $\beta$ ) pode ficar exposto ao contato com a água e a ionização com o cálcio iônico, o que pode facilitar a coagulação da micela.

### **MINERAIS E CÁTIONS BIVALENTES**

Os principais elementos minerais encontrados no leite são: cálcio, fósforo, magnésio, sódio, potássio e cloretos. Normalmente, o potássio é o mineral mais abundante no leite, seguido pelo cálcio. O cálcio (Ca) e o fósforo (P) podem estar ligados às micelas de caseínas e são fatores importantes que interferem na estabilidade do leite. Já o sódio, o potássio e os cloretos, juntamente com a lactose, assumem papel importante na regulação da produção do leite, por meio da pressão osmótica exercida por estes constituintes. Os elementos minerais do leite são originários do sangue, porém, a concentração mineral do leite pode chegar a dez vezes mais do que a do sangue (Santos e Fonseca, 2007).

Os minerais estão presentes no leite na forma coloidal (como os fosfatos de cálcio ligados a micelas de caseínas) ou na fase solúvel. No entanto, na fase solúvel os minerais não estão totalmente “livres”, e diferentes associações iônicas podem ocorrer. Estas associações são dependentes da força eletrostática (catiônica ou aniônica) exercida pelo mineral, e, também, pela solubilidade dos sais iônicos. Globalmente, o cálcio pode ser encontrado no leite na fase iônica (livre), estabilizado com o citrato (como citrato trivalente), complexado com os fosfatos (mistura de  $H_2PO_4$  e  $HPO_4$ ) e associado aos cloretos (Gaucheron, 2005).

Barros et al. (1999) relacionaram a redução da estabilidade da proteína do leite com o aumento da concentração de cálcio iônico. Da mesma forma, Oliveira e Timm (2007) relataram que amostras de leite com menor estabilidade ao teste do álcool sem acidez adquirida apresentaram diminuição no teor de caseína e aumento das concentrações de íons, particularmente cálcio, em épocas de carência alimentar. Marques et al. (2011) observaram resultados semelhantes, uma vez que com o aumento da concentração de cálcio iônico no leite, a estabilidade ao etanol foi reduzida. As cargas elétricas das micelas dependem da concentração de cálcio ligado e, conseqüentemente, pelo nível de cálcio livre no leite. Com o aumento da concentração de cálcio total no leite, aumenta a quantidade de cálcio ligado e reduz as cargas negativas das micelas, diminuindo a barreira energética para a coagulação. Inversamente, reduzindo-se o teor de cálcio, aumentam as cargas negativas das micelas, aumentando a repulsão entre elas, dificultando a coagulação (Barros et al., 1999; O’Connell et al., 2006; Marques et al., 2011). Adicionalmente, o aumento na concentração de cálcio iônico no leite pode potencializar a associação da  $\beta$ -lactoglobulina com a  $\kappa$ -caseína na micela, o que pode facilitar a coagulação da micela de

caseína ao etanol ou durante o aquecimento térmico (Holt et al., 2013; Martins et al., 2013a; Martins et al. – submetido para publicação).

#### **DEMAIS COMPONENTES ASSOCIADOS COM A ESTABILIDADE DO LEITE**

Além da concentração de íons e da relação de proteínas no leite, outros fatores foram associados com a estabilidade do leite ao etanol. O nitrogênio ureico do leite pode inibir a formação de ácidos e atuar sobre os grupos tiol das proteínas, contribuindo para dificultar a coagulação do leite ao etanol e/ou durante o aquecimento térmico. Adicionalmente, a uréia pode ser convertida em cianeto, que reage com a proteína e, contrariamente ao cálcio livre, aumenta às cargas negativas das micelas e a força de repulsão entre elas, e, conseqüentemente, a estabilidade do leite (Sweetsur e Muir, 1981). De forma semelhante, aumento da concentração de citrato também pode contribuir para o aumento da estabilidade do leite (Machado, 2010), pois pode sequestrar o cálcio livre e aumentar a força de repulsão entre as micelas de caseína (Varnam e Sutherland, 1995). Os fosfatos, de forma semelhante ao citrato, também podem atuar para manter a estabilidade do leite (Horne e Muir, 1990), pois contribuem para reduzir o cálcio iônico no leite. Porém, o citrato se mantém por mais tempo solúvel no leite, além de ser mais efetivo para reagir com o cálcio livre, em comparação com o fosfato (Singh, 2004). De outra forma, a ação dos fosfatos também está associada ao pH do leite, uma vez que quando o pH do leite é reduzido, o fosfato coloidal passa à fase solúvel e desestabiliza as proteínas do leite (Machado, 2010; Santos e Fonseca, 2007). Desta forma, fatores como o tempo de lactação, mastite, ambiente, genética e nutrição das vacas lactantes estão associados com as alterações nas propriedades físico-químicas e no equilíbrio salino do leite, o que pode alterar a estabilidade do leite durante ao etanol e/ou durante o tratamento térmico.

#### **EFEITO DO TEMPO DE LACTAÇÃO E DA MASTITE SOBRE A COMPOSIÇÃO E A ESTABILIDADE DO LEITE**

O leite de vacas acometidas por mastite ou em estágio final de lactação tem três vezes mais probabilidade de ser instáveis do que leites de vacas no início ou meio da lactação. Este efeito é resultante do aumento do pH do leite, devido à maior permeabilidade do epitélio mamário a pequenas partículas e íons (Holt, 2004). O estágio avançado de lactação foi um fator associado com a ocorrência de leite de baixa estabilidade (Marques et al., 2010; Fisher et al., 2012). Da mesma forma, vacas em estágio inicial de lactação também apresentaram maior frequência de leite instável não ácido, em comparação com estágio intermediário de lactação (Tsioulpas et al., 2007). A baixa estabilidade do leite nas fases inicial e final de lactação foi atribuída

aos elevados teores de cálcio iônico do leite, devido a maior passagem destes íons pelo espaço intercelular (junções firmes) da glândula mamária (Tsioulpas et al, 2007; Lewis, 2011).

De outra forma, segundo Fisher et al. (2012), a mastite subclínica não apresenta efeitos diretos sobre a estabilidade do leite ao etanol. No entanto, ao estudar amostras de leite na região nordeste do estado de São Paulo, Oliveira et al. (2013) verificaram que o leite estável apresentou menor contagem de células somáticas (CCS) que o leite instável. De forma semelhante, Feagan; Griffin e Lloyd (1966) estudaram os efeitos da mastite subclínica sobre a estabilidade do leite durante o aquecimento térmico a 140° C. Os autores coletaram amostras de leite oriundas de quartos mamários saudáveis e infectados de vacas primíparas e múltíparas nas diferentes fases de lactação, e, posteriormente, submeteram estas amostras ao aquecimento térmico a 140° C. Como resultado, os autores observaram que o leite coletado de quartos infectados apresentou estabilidade térmica menor do que o leite oriundo dos quartos saudáveis da mesma vaca coletado na mesma ordenha. Desta forma, a divergência de resultados de estudos sobre os efeitos da mastite subclínica sobre a estabilidade do leite pode ser associado à ausência de identificação dos microrganismos causadores de mastite, uma vez que as espécies de microrganismos podem agir de forma diferente sobre os constituintes do leite, em especial sobre as caseínas.

#### **EFEITOS SAZONAIS, GENÉTICOS E NUTRICIONAIS DAS VACAS LEITEIRAS QUE PODEM ALTERAR A ESTABILIDADE DO LEITE**

Botaro et al. (2009) conduziram estudos na região sudeste do Brasil com um total de 879 amostras de leite de tanque, oriundas de 603 vacas da raça Holandesa e 276 da raça Girolando, coletadas nas estações chuvosas e seca. Neste estudo foi observado frequência dos genótipos AA, AB e BB da  $\kappa$ -caseína de 66,31, 31,84 e 1,33% para vacas da raça Holandês e 71,38, 27,90 e 0,72% para as da raça Girolando, respectivamente. No entanto, os autores não observaram associação entre a estabilidade do leite e os genótipos de  $\kappa$ -caseína, mas as vacas da raça Holandesa apresentaram maior estabilidade do leite ao etanol do que vacas Girolando, e, adicionalmente, o leite foi mais estável na estação chuvosa do que na estação seca. De outra forma, Robitaille (1995) relataram que o polimorfismo da expressão do gene da  $\kappa$ -caseína afeta a estabilidade do leite ao etanol. No estudo de Robitaille (1995), o leite obtido de vacas que apresentaram predominância na expressão do alelo B em relação ao alelo A do gene da  $\kappa$ -caseína precipitou com maiores concentrações de etanol na mistura do que o leite de vacas com expressão similar para os alelos A e B.

Botaro et al. (2007) estudaram seis rebanhos leiteiros de vacas da raça Girolando e cinco da raça Holandês localizados na região sudeste do Brasil, dos quais foram coletadas um total de 953 amostras de leite, distribuídas em

dois períodos do ano: chuvoso e seca. Os autores não observaram efeito do polimorfismo da  $\beta$ -lactoglobulina sobre a estabilidade do leite. Porém, Botaro et al. (2007) relataram que o leite oriundo de vacas da raça Holandês foi menos estável na estação seca. Os efeitos sazonais observados por Botaro et al. (2007) e Botaro et al. (2009) são similares aos resultados relatados por Fisher et al. (2012), que descreveram que os efeitos sazonais sobre a ocorrência de LINA podem ser atribuídos a escassez de alimentos, devido a deficiência de pastagens durante o período de vazio forrageiro, compartilhamento de áreas para a produção de cereais, e deficiência de chuva para a produção de volumoso, no caso das regiões Sudeste, Central e Norte do Brasil.

Marques et al. (2007) relataram maior ocorrência de LINA na região sul do Brasil em março (82% das amostras analisadas instáveis ao etanol 76%), e valores mínimos em janeiro (33% das amostras instáveis ao etanol 76%). De forma semelhante, Zanela et al. (2009) também relataram alta ocorrência de LINA (55% das amostras analisadas instáveis ao etanol), sendo que os valores médios de instabilidade variaram de acordo com o tempo de avaliação durante 1 ano. Desta forma, Marques et al. (2007) e Zanela et al. (2009) associaram a alta ocorrência de LINA com épocas de escassez de forragens, devido ao final de ciclo das pastagens de verão, associado à falta de pastagens de inverno (que ainda não se encontraram aptas para utilização), e ao compartilhamento de áreas de pastagem com a semeadura de cereais, como a soja que ocorre no verão, respectivamente.

O efeito da deficiência nutricional sobre a estabilidade do leite foi confirmado por Barbosa et al. (2012), pois ao induzir a ocorrência de leite instável não ácido por meio da restrição alimentar, observaram que as amostras instáveis apresentaram maiores concentrações de  $\beta$ -caseína e proteína total, e apresentaram tendência ( $P=0,068$ ) em reduzir o teor de  $\kappa$ -caseína do leite. Como resultado, Barbosa et al. (2012) relataram que a deficiência de nutrientes é um fator que reduz a estabilidade do leite ao etanol. Stumpf et al. (2013) conduziram um estudo com o objetivo de avaliar o efeito da restrição alimentar sobre a estabilidade do leite, e descreveram que a deficiência de nutrientes aumentou a permeabilidade das células mamárias “Tight Junctions”, o que resultou em menor estabilidade do leite ao etanol. Desta forma, a deficiência de nutrientes pode reduzir a estabilidade do leite possivelmente por meio de alterações nas subunidades de caseína, e, adicionalmente, por alterações na concentração de cátions bivalentes, como o cálcio, uma vez que o espaço intercelular é aumentado em resposta a restrição alimentar (Barbosa et al., 2012; Stumpf et al., 2013).

Além do aporte de nutrientes, alterações digestivas e metabólicas foram relacionadas à ocorrência de leite instável não ácido (Fisher et al., 2012). Fagnani; Beloti e Battaglini (2014) coletaram amostras de sangue e de

leite de 96 vacas leiteiras em lactação, e observaram distúrbios no equilíbrio ácido-base do sangue em 50 % das vacas estudadas. Como principal resultado, os autores relataram que a frequência de amostras de leite com instabilidade alcoólica foi maior nas vacas que apresentaram algum distúrbio metabólico. Estudos demonstraram que a estabilidade do leite foi reduzida em resposta à acidose metabólica, resultante da acidose ruminal (Ponce e Hernandez, 2005) ou pela adição de sais aniônicos à dieta durante a lactação (Marques et al., 2011; Martins et al., 2013a). Mellau et al. (2004) demonstraram que a adição de sais aniônicos e a alta concentração de carboidratos não fibrosos na dieta estimularam o metabolismo do cálcio de forma semelhante, uma vez que ao induzir hipocalcemia em vacas não lactantes pela infusão intravenosa de EDTA, os autores observaram que a inclusão de carboidratos não fibrosos (10Kg/vaca/diadeceuada) na dieta ou a suplementação com sais aniônicos (cloreto e sulfato de amônio) recuperaram a homeostase do cálcio de forma semelhante.

A acidose metabólica pode aumentar a concentração de cálcio iônico no leite, devido à ação dos hormônios da paratireoide (PTH) e do 1,25 dihidroxicoliciferol, e reduzir a estabilidade do leite ao etanol e/ou ao aquecimento térmico (Marques et al., 2011; Martins et al., 2013a). A acidose metabólica em vacas leiteiras é um distúrbio bastante comum nos atuais sistemas de produção de leite, pois pode ocorrer por diferentes meios: alta taxa metabólica de vacas lactantes; decorrente da acidose ruminal; e resultante da redução do balanço cátion-aniônico da dieta (BCAD). Martins et al. (submetido para publicação) relataram que a redução do BCAD, de 290 para -71 mEq/Kg de MS, aumenta a concentração de cálcio iônico e de  $\kappa$ -caseína no leite, e, contrariamente, reduz a concentração de  $\beta$ -lactoglobulina e de nitrogênio ureico, o que resulta em redução linear da estabilidade do leite ao etanol e ao aquecimento térmico a 140° C (Figura 4). Portanto, além de atender a demanda nutricional, o controle de alterações metabólicas que ocorrem em vacas leiteiras em lactação para manter o equilíbrio iônico sanguíneo também é um importante fator para manter o leite estável à reação com o etanol e ao aquecimento térmico.

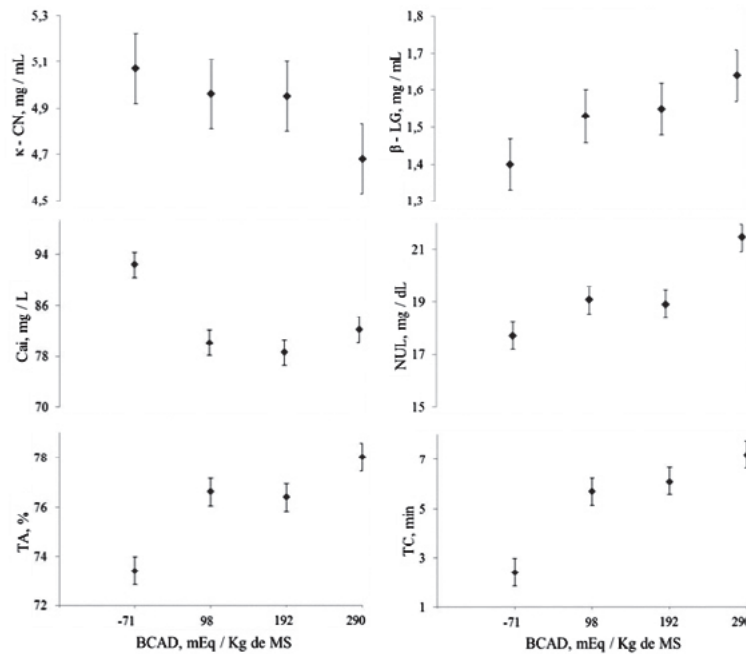


Figura 4 – Efeito do balanço cátion-aniônico da dieta (BCAD, mEq/Kg de MS) sobre:  $\kappa$  - CN - concentração de  $\kappa$  - caseína no leite:  $Y = 5,02 (EP = 0,30) - 0,00098 (EP = 0,0004) \times BCAD$  (mEq/Kg de MS);  $\beta$  - LG - concentração de  $\beta$  - Lactoglobulina no leite:  $Y = 1,46 (EP = 0,15) + 0,00065 (EP = 0,0002) \times BCAD$  (mEq/Kg MD); Cai - concentração de cálcio iônico no leite:  $Y = 85,78 (EP = 4,98) - 0,08 (EP = 0,01) \times BCAD$  (mEq/Kg de MS) +  $0,000237 (EP = 0,00008) \times BCAD^2$  (mEq/Kg MS<sup>2</sup>); NUL - concentração de nitrogênio ureico no leite:  $Y = 18,22 (EP = 1,36) + 0,0094 (EP = 0,0026) \times BCAD$  (mEq/Kg de MS); TA - Teste do álcool (nível de etanol na solução alcoólica necessária para provocar coagulação do leite):  $Y = 74,87 (EP = 0,87) + 0,01174 (EP = 0,0025) \times BCAD$  (mEq/Kg de MS); TC - Tempo de coagulação (tempo necessário para coagular o leite durante o aquecimento a 140° C):  $Y = 3,95 (EP = 1,02) + 0,01234 (EP = 0,0032) \times BCAD$  (mEq/Kg de MS). Fonte: Martins et al. (submetido para publicação).

Vacas em lactação que consomem altas quantidades de carboidratos não-fibrosos (rapidamente fermentáveis no rúmen) também podem desencadear processo de acidose metabólica em decorrência da acidose ruminal (Mutsvangwa et al., 2004). Desta forma, tanto o excesso, por meio da acidose metabólica decorrente da acidose ruminal, quanto à deficiência de nutrientes podem alterar a estabilidade do leite (Fisher et al., 2012). Portanto, para prevenir a ocorrência de leite de baixa estabilidade sem acidez resultante de ação microbiana, a elevada demanda nutricional das vacas em lactação deve ser atendida com a utilização de alimentos concentrados; porém, medidas como o adequado fornecimento de FDN e/ou uso de tamponantes e/ou alcalinizantes

na dieta das vacas leiteiras, devem ser considerados para evitar acidificação no fluido ruminal que podem resultar em desequilíbrio do sistema ácido/base do sangue. Adicionalmente, alterações de ingredientes volumosos e/ou concentrados e/ou de suplementos minerais sem adaptação prévia também devem ser evitadas para prevenir problemas digestivos (Fisher et al., 2012), alterações no BCAD, e, conseqüentemente, problemas de leite instável não ácido.

### **ASSOCIAÇÃO ENTRE ESTABILIDADE DO LEITE AO ETANOL E AO AQUECIMENTO TÉRMICO**

De acordo com Molina et al. (2001), Negri et al. (2001), Chavez et al. (2004) e Martins et al. (submetido para publicação) a estabilidade do leite ao etanol apresenta limitada capacidade em estimar a estabilidade do leite durante o tratamento térmico, uma vez que o teste do álcool apresentou baixa ou média correlação com demais métodos de avaliação da estabilidade térmica do leite, como o teste da fervura e o tempo de coagulação a 140° C. Em busca de leite com elevada estabilidade térmica para a crescente produção de derivados lácteos, como o leite UAT e o leite em pó, alguns laticínios aumentam o teor de etanol (de 72 para 78, 80 e até 82%) na solução alcoólica para a seleção de matéria-prima com elevada estabilidade. No entanto, o uso da estabilidade do leite ao etanol para destinar o leite para o processamento térmico mais adequado pode não apresentar resultados satisfatórios, uma vez que o leite que coagula durante a reação com o etanol pode resistir o aquecimento térmico sem formar coágulos, o que apenas aumentaria o descarte de leite e/ou a penalização no preço pago aos produtores pelo leite de “baixa” estabilidade ao etanol (<78 ou até mesmo <82%) (Fisher et al., 2012). Assim, pesquisas são necessárias para estudar e propor métodos acurados e precisos para a estimativa da estabilidade térmica do leite, o que pode melhorar a eficiência da cadeia agroindustrial do leite, uma vez que o leite de baixa estabilidade sem acidez resultante de ação microbiana poderia ser devidamente identificado e destinado a processamentos térmicos menos intensos de aquecimento, como o de pasteurização.

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Problemas com a baixa estabilidade do leite sem acidez resultante de ação microbiana ocorrem em várias regiões do Brasil e do mundo, mas as causas ainda não estão totalmente elucidadas, o que contribui com os prejuízos que o leite instável não ácido causa à cadeia agroindustrial do leite. Os resultados dos estudos sugerem que o atendimento da exigência nutricional das vacas leiteiras em lactação é um importante fator para manter o leite estável ao etanol. Nesta situação, em vacas com deficiência nutricional, o aumento do espaço intercelular (junções firmes) e alterações na composição das micelas de



caseína (alterações na concentração de  $\beta$  e  $\kappa$ -caseína) foram sugeridos como os principais fatores associados com a baixa estabilidade do leite não ácido. No entanto, em busca do atendimento da elevada exigência energética de vacas leiteiras em lactação, o uso de altas quantidades de concentrado associado à deficiência ou inadequado fornecimento de FDN efetivo e de alcalinizantes ou tamponantes na dieta pode resultar em leite instável não ácido por meio da acidose metabólica resultante de acidose ruminal. A acidose metabólica aumenta a concentração de cálcio iônico no leite, que reduz as cargas negativas das micelas de caseína e a força eletrostática de repulsão entre elas, o que facilita a coagulação do leite ao etanol e/ou durante o processamento industrial. Desta forma, o controle de alterações metabólicas que ocorrem em vacas leiteiras em lactação para manter o equilíbrio iônico sanguíneo é um importante fator para manter o leite estável à reação com o etanol e ao aquecimento térmico, pois alterações na concentração de cálcio iônico e nas interações da  $\beta$ -lactoglobulina com a  $\kappa$ -caseína na micela podem ocorrer e reduzir a estabilidade das micelas em vacas acometidas por acidose metabólica.

Problemas metabólicos são bastante comuns em vacas leiteiras, e além da acidose ruminal, fatores como a alta taxa metabólica, o estresse térmico e as alterações no BCAD também podem alterar o equilíbrio ácido-base do sangue. A variação no BCAD pode estar associada com alterações na composição mineral da dieta, como troca do tipo e/ou da quantidade de suplemento mineral fornecido, e alterações na composição química principalmente das forragens devido a alterações nas características do solo e do estágio de desenvolvimento da planta. Alterações de concentração de cátions e/ou ânions implicam na necessidade do metabolismo em se readaptar a cada nova condição de BCAD. Desta forma, alterações na composição mineral da dieta, mesmo que o BCAD permaneça com miliequivalência positiva, devem ser evitadas para prevenir a ocorrência de leite instável não ácido.

Por fim, para uma adequada estimativa da estabilidade térmica do leite ha necessidade de estudos sobre a utilização de testes alternativos ao teste do álcool, uma vez que a estabilidade do leite ao etanol apresenta baixa ou média correlação com o aquecimento térmico. Desta forma, a identificação adequada de leite de baixa estabilidade pode reduzir os prejuízos no setor primário e industrial, contribuindo para maior eficiência econômica e sustentável da cadeia agroindustrial do leite. Adicionalmente, com testes mais acurados e precisos, as tomadas de decisão para implementação de medidas de correção dos problemas de instabilidade do leite poderão ter maiores chances de sucesso.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, R.S.; FISHER, V.; RIBEIRO, M.E.R.; ZANELA, M.B.; STUMPF, M.T.; KOLLING, G.J.; SCHAFHÄUSER JÚNIOR, J.; BARROS, L.E.; EGITO, A.S. Caracterização eletroforética de proteínas e estabilidade do leite em vacas submetidas à restrição alimentar. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.47, n.4, p.621-628, 2012.
- BARROS, L.; DENIS, N.; GONZALEZ, A.; NÚÑEZ, A. Prueba del alcohol em leche y relación con calcio iónico. **Revista Prácticas Veterinarias**, v.9, n.2, p.315, 1999.
- BRASIL. Instrução Normativa nº51 de 18 de setembro de 2002. Aprova e oficializa o Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru e refrigerado. **Diário Oficial (da República Federativa do Brasil)**, Brasília, 20 set. 2002. Seção 1, p.13.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa Nº 62, De 29 De Dezembro De 2011. Alterar o caput, excluir o parágrafo único e inserir os §§ 1º ao 3º, todos do art. 1º, da Instrução Normativa MAPA nº 51, de 18 de setembro de 2002. **Diário Oficial (da República Federativa do Brasil)**, Brasília, Dez./2011.
- BYLUND, G. **Dairy Processing Handbook**. Tetra Pak® Processing Systems AB S-221 86 Lund, Sweden, 1995. 436p.
- BOTARO, B.G.; LIMA, Y.V.R.; AQUINO, A.A.; FERNANDES, R.H.R.; GARCIA, J.F.; SANTOS, M.V. Polimorfismo da beta-lactoglobulina não afeta as características físico-químicas e a estabilidade do leite bovino. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.42, n.5, p.747-753, 2007.
- BOTARO, B. G.; LIMA, Y.V.R.; CORTINHAS, C.S.; PRADA e SILVA, L.F.; RENNÓ, F.P.; SANTOS, M.V. Effect of the kappa-casein gene polymorphism, breed and seasonality on physicochemical characteristics, composition and stability of bovine milk. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.12, p.2447-2454, 2009.
- CHAVEZ, M.S.; NEGRI, L.M.; TAVERNA, M.A.; CUATRÍN, A. Bovine milk composition parameters affecting the ethanol stability. **Journal of Dairy Research**, v. 71, n. 2, p. 201-206, 2004.
- CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L.; LORIET, D. Proteínas Alimentarias: Bioquímica - Propriedades funcionales - Valor nutritivo - Modificaciones químicas. **Zaragoza: Acribia Editorial**, 1989. 346p.
- CREAMER, L.K.; PLOWMAN, J.E.; LIDDELL, M.J.; SMITH, M.H.; HILL, J.P. Micelle stability:  $\alpha$ -casein structure and function. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.3004-3012, 1998.
- DiMARTINS, A. Proteínas do leite na fabricação de queijos. Tecnologia de Fabricação de Queijos – UEG. Publicado online em 15 de março de 2009. Disponível em: <http://tecnologiadefabricacaodequeijo.blogspot.com.br/2009/03/proteinas-do-leite-na-fabricacao-de.html>. Acessado em: 03 de março de 2014.
- FAGNANI, R.; BELOTI, V.; BATTAGLINI, A.P. Acid-base balance of dairy cows and its relationship with alcoholic stability and mineral composition of milk. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.5, p.398-402, 2014.
- FAIRBAIRN, D.J.; LAW, B.A. Proteinases of phychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. **Journal of Dairy Research**, v.53, p.139-177, 1986.
- FEAGAN, J.T.; GRIFFIN, A.T.; LLOYD, G.T. Effects of Subclinical Mastitis on Heat Stability of Fluid Milk. **Journal of Dairy Science**, v.49, n.8, p.933-939, 1966.
- FISHER, V.; RIBEIRO, M.E.R.; ZANELA, M.B.; MARQUES, L.T.; ABREU, A.S.; MACHADO, S.C.; FRUSCALSO, V.; BARBOSA, R.S.; STUMPF, M.T. Leite instável não ácido: um problema solucionável? **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.13, n.3, p.838-849, 2012.

- FOX, P.F.; O'CONNOR, T.P.; MCSWEENEY, P.L.H.; GUINEE, T.P.E.; O'BRIEN, N.M. Cheese: physical, biochemical and nutritional aspects. **Advance Food Nutrition Research**, v.39, p.163-328, 1996.
- GAUCHERON, F. The minerals of Milk. **Reproduction Nutrition Development**, v.45, p.473–483, 2005.
- HOLT, C. An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein micelles and its application to the calculation of the partition of salts in milk. **European Biophysics Journal**, v.33, n.5, p.421-434, 2004.
- HOLT, C.; CARVER, J.A.; ECROYD, H.; THORN, D.C. Invited review: Caseins and the casein micelle: their biological functions, structures, and behavior in foods. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n.10, p.6127-6146, 2013.
- HORNE, D. S.; MUIR, D. D. Alcohol and heat stability of milk protein. **Journal of Dairy Research**, v.46, n.3, p.433-439, 1990.
- JEURNINK, T.J.M.; DE KRUIF, C.G.: Calcium concentration in milk in relation to heat stability and fouling. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v.49, 139-138, 1995.
- KONTOPIDIS, G.; HOLT, C.; SAWYER, L. Invited review: betalactoglobulin: binding properties, structure and function. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.4, p.785-796, 2004.
- LEWIS, M.J. The measurement and significance of ionic calcium in milk – review. **International Journal of Dairy Technology**, v.64, n.1, p.1-13, 2011.
- MACHADO, S.C. Fatores que alteram a estabilidade do leite. 2010. 191p. **Tese (Doutorado) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, RS.
- MARQUES, L.T.; ZANELA, M.B.; RIBEIRO, M.E.R.; STUMPF JUNIOR, W.; FISCHER, V. Ocorrência do leite instável ao álcool 76% e não ácido (lina) e efeito sobre os aspectos físico-químicos do leite. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.13, n.1, p.91-97, 2007.
- MARQUES, L.T.; FISCHER, V.; ZANELA, M.B.; RIBEIRO, M.E.R.; STUMPF JUNIOR, W.; RODRIGUES, C.M. Produção leiteira, composição do leite e perfil bioquímico sanguíneo de vacas lactantes sob suplementação com sal aniônico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.5, p.1088-1094, 2011.
- MARTINS, C.M.M.R.; ARCARI, M.A.A.; CAVALCANTI, M.L.T.; LAVANHOLI, J. D.; SATTIN, W.; SANTOS, M.V. Efeito do balanço cátion-aniônico da dieta de vacas leiteiras em lactação sobre a estabilidade do leite e teor de cálcio iônico. **Veterinária e Zootecnia** 2013 jun.; 20(2 Supl 1): 206-207. 2013a.
- MARTINS, C.M.M.R.; ARCARI, M.A.; WELTER, K.C.; SHARTZAID, V.L.; FORTI, J.L.; SANTOS, M.V. efeito do balanço cátion-aniônico da dieta de vacas em lactação sobre as frações nitrogenadas do leite. **Veterinária e Zootecnia** 2013 jun.; 20(2 Supl 1): 206-207. 2013b.
- MARTINS, C.M.M.R.; ARCARI, M.A.; WELTER, K.C.; SHARZAID, V.L.; GONÇALVEZ, J.L.; SARAN NETO, A.; OLIVEIRA, C.A.F.; SANTOS, M.V. Effect of metabolic acidosis in lactating dairy cows on concentration of milk proteins. 2014 Joint Annual Meeting, American Dairy Science Association – ADSA. Anais... Joint Annual Meeting, ADSA - USDA - CDSA, Kansas City, Missouri, USA, 2014.
- MARTINS, C.M.M.R.; ARCARI, M.A.; WELTER, K.C.; SARAN NETO, A.S.; OLIVEIRA, C.A.F.; SANTOS, M.V. Effect of dietary cation-anion difference on the stability of milk proteins. Submitted to publication – **Journal of Dairy Science**.

MARX, I.G.; LAZZAROTTO, T.C.; DRUNKLER, D.A.; COLLA, E. Ocorrência do leite instável não ácido na região oeste do Paraná. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v.13, n.1, p.1-10, 2011.

McMAHON, D.J. Age-gelation of UHT milks: Changes that occur on storage, their effect on shelf life and the mechanism by which age-gelation occurs. In: Heat Treatments and Alternative Methods. **International Dairy Federation**, Brussels, Belgium. 1996. p.315-326.

MDIC - Ministério de Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior – AliceWeb Mercosul. Secretaria de Comércio Exterior, do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Disponível em: <http://aliceweb.mdic.gov.br/>. Acesso em: 20 de maio de 2014.

MELLAU, L.S.B.; JØRGENSEN, R.J.; BARTLETT, P.C.; ENEMARK, J.M.D.; HANSEN, A.K. Effect of Anionic Salt and Highly Fermentable Carbohydrate Supplementations on Urine pH and on Experimentally Induced Hypocalcaemia in Cows. *Acta veterinaria scandinavica*, v.45, p.139-147, 2004.

MIKHEEVA, A.L.M.; GRINBERG, N.V.; GRINBERG, V.Y.; KHOKHL, O.V.A.R.; De KRUIF, C.G. Thermodynamics of micellization of bovine  $\alpha$ -casein studied by high-sensitivity differential scanning calorimetry. *Langmuir*, v.19, p.2913-2921, 2003.

MOLINA, L.H.; GONZÁLES, R.; BRITO, C.; CARRILLO, B.; PITO, M. Correlation between heat stability and alcohol test of milks at a milk collection center. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.33, n.2, 2001.

MUTSVANGWA, T.; GILMORE, J.; SQUIRES, J.E.; LINDINGER, M.I.; McBRIDE, B.W. Chronic metabolic acidosis increases mRNA levels for components of the ubiquitin-mediated proteolytic pathway in skeletal muscle of dairy cows. **Journal of Nutrition**, v.134, p.558-561, 2004.

NEGRI, L.; CHAVES, M.; TAVERNA, M.; CUATRÍN, A.; RUBIOLO, A. Determination of variables affecting thermal milk stability using a capillary method for evaluation of thermal coagulation time. **Revista Argentina de Lactología**, n.22, p.33-44, 2003.

O'CONNELL, J.E.; SARACINO, P.; HUPPERTZ, T.; UNIAKE, T.; De KRUIF, C.G.; KELLY, A.L.; FOX, P.F. Influence of ethanol on the rennet- induced coagulation of milk. **Journal of Dairy Research**, v.73, n.3, p.312-317, 2006.

OLIVEIRA, D.S.; TIMM, C.D. Instabilidade da caseína em leite sem acidez adquirida. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.102, n.561-562, p.17-22, 2007.

OLIVEIRA, C.A.F.; LOPES, L.C.; ROSIM, R.E.; FERNANDES, A.M.; CORASSIN, C.H. Composition, somatic cell count and casein fractions of ethanol unstable milks. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 35, n. 1, p. 153-156, 2013.

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

ROBITAILLE, G. Influence of kappa-casein and beta-lactoglobulin genetic variants on the heat stability of milk. **Journal of Dairy Research**, v.62, n.4, p.593-600, 1995.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. Barueri, SP: Manole. 2007. 314p.

SINGH, H.; FOX, P. Heat stability of milk: role of  $\beta$ -lactoglobulin in the pH-dependent dissociation of micellar  $\kappa$ -casein. **Journal of Dairy Research**, n.54, p.509-521, 1987.

SINGH, H. Heat stability of milk. **International Journal of Dairy Technology**, v.57, n.2-3, p.111-119, 2004.

STUMPF, M.T.; FISHER, V.; McMANUS, C.M.; KOLLING, G.J.; ZANELA, M.B.; SANTOS, C.S.; ABREU, A.S.; MONTAGNER, P. Severe feed restriction increases permeability of mammary gland cell tight junctions and reduces ethanol stability of milk. **Animal**, v.7, n.7, p.1137-1142, 2013.

SWAISGOOD, H.E. Chemistry of the caseins. In: FOX, P.F. McSWEENEY, P.L.H. **Advanced Dairy Chemistry-1 Proteins Part A**. 3rd ed, 2003.

SWEETSUR, A.W.M.; MUIR, D.D. Role of cyanate ions in the urea-induced stabilization of the caseinate complex in skim-milk. **Journal of Dairy Research**, v.48, n.1, p.163-166, 1981.

TSIOULPAS, A.; GRANDISON, A.S.; LEWIS, M.J. Changes In Physical Properties of bovine milk from the colostrums period to early lactation. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.11, p.5012-5017, 2007.

VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P. Leche y productos lácteos: tecnología, química y microbiología. Editorial Acriia (Zaragoza), 1995. 474p.

WALSTRA, P. Casein sub-micelles: do they exist? **International Dairy Journal**, v.9, p.189-192, 1999.

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

ZANELA, M.B.; RIBEIRO, M.E.R.; FISCHER, V. Ocorrência do leite instável não ácido no noroeste do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p.1009-1013, 2009.