

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**FATORES NUTRICIONAIS E NÃO NUTRICIONAIS QUE AFETAM A
COMPOSIÇÃO DO LEITE BOVINO**

Alexandre Süsenbach de Abreu
Médico Veterinário (UFSM)
Mestre Em Zootecnia (UFRGS)

Tese apresentada como um dos requisitos à obtenção do grau de Doutor em
Zootecnia
Área de Concentração Produção Animal
(Nutrição e Alimentação de Ruminantes)

Porto Alegre (RS), Brasil
Abril, 2015

CIP - Catalogação na Publicação

Abreu, Alexandre Susenbach de
Fatores nutricionais e não nutricionais que
afetam a composição do leite bovino / Alexandre
Susenbach de Abreu. -- 2015.
215 f.

Orientadora: Vivian Fischer.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Qualidade do leite bovino. 2. Estresse
calórico. 3. Estresse oxidativo. 4. Estabilidade do
leite . I. Fischer, Vivian, orient. II. Título.

ALEXANDRE SOSENBACH DE ABREU
Médico Veterinário e
Mestre em Zootecnia

TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

DOUTOR EM ZOOTECNIA

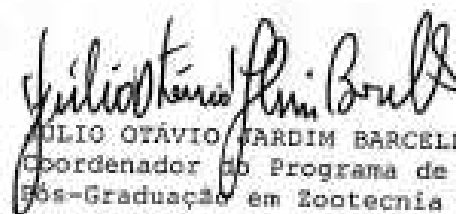
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 29.04.2015
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 05.08.2015
Por



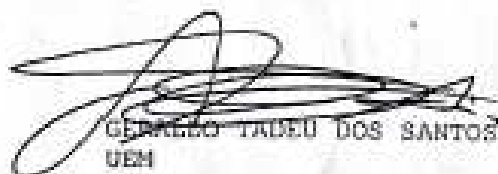
VIVIAN FISCHER
PPG Zootecnia/UFRGS
Orientador



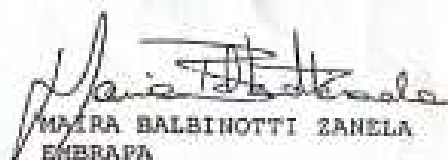
JULIO OTÁVIO JARDIM BARCELLOS
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia



FÉLIX HILARIO DÍAZ GONZÁLEZ
Faculdade de Veterinária/UFRGS



GERALDO TADEU DOS SANTOS
UEM



MAIRA BALBINOTTI ZANELA
EMBRAPA



PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade de Agronomia

AGRADECIMENTOS

Senhor Deus, hoje eu não quero pedir nada, porque eu já pedi tanto e tanta coisa me foi dada. Eu só quero agradecer: muito obrigado.

Ao meu Pai (Eurico) e minha Mãe (Inalda) sou muito grato por tudo que fizeram e continuam fazendo para eu alcançar a felicidade.

A meus irmãos Mauro e Maurício que me incentivaram, nessa longa caminhada.

A minha namorada Jéssica que acompanhou minha trajetória e sabe muito bem o quanto foi difícil chegar até aqui.

A minha orientadora, Prof. Dra. Vivian Fischer. É admirada pela sua sabedoria, guiando meus passos nessa busca pelo conhecimento, com paciência, dedicação e até pelos "puxões de orelha", mas tua humildade, simplicidade e transparência a torna especial.

Ao Professor Sandro Charopen e meus ex-alunos da FAI Faculdades: Ramiro, Guilherme, Tiago, Daniel, Mirtes, Angela, Caroline, Luciane, Franciele e Rodrigo.

Aos alunos da UNISUL, Angela, Jéssica, Giovani, Éder, Letícia, Ivânio e Júlio que foram fundamentais para que os experimentos se realizassem da melhor maneira possível na região sul de Santa Catarina

A Fundação de Amparo a Pesquisa e a Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro para a execução das pesquisas.

Ao Prof. Dr. André Thaler Neto pela sua generosidade, sempre pronto a ajudar, dedicado e impecável na burocracia dos projetos, muito obrigado e pode ter certeza que foi um grande prazer trabalhar contigo.

A UDESC-CAV e todos os alunos que aceitaram o desafio para realizarmos um experimento.

Aos laticínios Lac Lelo, D'Nona, Languiru, Tangará e Della Vita que contribuíram para a realização de experimentos,

Aos colegas da UFRGS, integrantes do grupo NUPLAC pela contribuição incansável na condução dos trabalhos de pesquisa como Marcelo Stumpf, Elissa Vizzotto, Daíse Werncke.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos de Doutorado.

A UFRGS e aos Professores do Programa de Pós Graduação em Zootecnia.

A Professora Ma Nicole Hlavac, pela parceria na condução de maneira brilhante o experimento sobre estresse calórico.

Aos colegas e amigos Elio Ravazi Oliveira, Cassiano Klagenberg e Olávio pela ajuda, troca de experiências e conhecimento.

Ao Kurth Griebeler, Jacó Eidt e suas famílias e principalmente as suas queridas vaquinhas que aguentaram firmes e não desistiram de nos ajudar para alcançarmos nossos objetivos.

Aos Professores Peter J. Bürger e Ester Blazius, pela paciência, compreensão pelos momentos de minha ausência na Instituição em virtude do meu doutorado.

FATORES NUTRICIONAIS E NÃO NUTRICIONAIS QUE AFETAM A PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE BOVINO¹

Autor: Alexandre Süsenbach de Abreu

Orientadora: Prof. Dra. Vivian Fischer

RESUMO - Foi conduzido um experimento para caracterizar as unidades de produção leiteira de duas regiões do Estado de Santa Catarina (Oeste e Sul), quanto ao rebanho, à infraestrutura para ordenha e conservação do leite, estratégias de alimentação e características físico-químicas do leite. Foram aplicados questionários aos produtores e realizadas coletas mensais de leite durante 11 meses, totalizando 1034 observações. Posteriormente foi realizado um experimento para avaliar a inclusão de níveis crescentes de feno de tifton 85 (*Cynodon dactylon*) em substituição à silagem de milho nas proporções feno: silagem de 80:20; 60:40 e 40:60, respectivamente sobre a produção leiteira e as características físico-químicas do leite de 21 vacas Jersey durante 28 dias. Complementarmente foram realizados três experimentos na estação quente para avaliar o efeito do provimento de sombra sobre as características produtivas, fisiológicas e metabólicas das vacas leiteiras e os atributos físico-químicos do leite. Foi realizado um experimento em um laticínio da região sul de Santa Catarina para avaliar a produção de queijos tipo prato quanto as características físico-químicas e rendimento utilizando leite cru com baixa, média e alta estabilidade ao teste do álcool. A análise estatística dos dados foi efetuada com o programa SAS (2001), usando análise descritiva, avaliando a frequência de ocorrência das observações, correlação, análise de variância e regressão. O nível de produção das propriedades das regiões oeste e sul foi relacionado às características de área, número de animais no rebanho, produtividade das vacas, uso de salas de ordenha. Entretanto, existe variabilidade nas características ligadas à infra-estrutura e manejo das unidades de produção como alimentos usados, práticas de ordenha e instalações além da proporção das categorias do rebanho e raça entre as regiões. De modo geral as diferenças quanto à composição físico-química do leite foram maiores entre as regiões que entre as escalas de produção. A inclusão de 20 a 60% de feno de tifton 85 em substituição à silagem de milho não modificou o peso e escore corporal, produção leiteira e as características físico-químicas do leite. No estresse calórico moderado a severo, a privação de sombra diminuiu a produção leiteira, a estabilidade do leite, a densidade e os teores de proteína bruta, mas aumentou acidez titulável e os teores de gordura e nitrogênio ureico. Houve efeitos positivos do provimento de sombra sobre os aspectos fisiológicos, hematológicos, sobretudo em estresse moderado a severo, mas mesmo em estresse leve, o acesso à sombra manteve melhor as condições metabólicas como equilíbrio ácido-básico e reduziu o dano ao DNA. A estabilidade no teste do álcool de 72 a 76% não alterou as características físico-químicas e de rendimento do queijo tipo prato.

Palavras-chave: sistemas de produção, estresse térmico, estabilidade, queijos

¹ Tese de Doutorado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (254p) Abril, 2015.

NUTRITIONAL AND NON-NUTRITIONAL FACTORS AFFECTING THE BOVINE MILK YIELD AND COMPOSITION²

Author: Alexandre Süsenbach de Abreu

Adviser: Prof. Dra. Vivian Fischer

ABSTRACT - An experiment was conducted to characterize the dairy farms in two regions of the State of Santa Catarina (West and South), in relation to the aspects related to herd, total area, milking parlour, feeding strategies and physicochemical characteristics of milk. Questionnaires were applied to producers and raw bulk milk was collected monthly for 11 months, totaling 1034 observations. Afterwards, we conducted a trial to evaluate the increasing levels of Tifton 85 hay (*Cynodon dactylon*) replacing corn silage in the proportions hay:silage 80:20; 60:40 and 40:60 respectively on milk production and the physicochemical characteristics of the 21 Jersey cows fed for 28 days. In addition trials were carried out on the hot season to evaluate the effect shade provision on milk production, physiological and metabolic traits of dairy cows and the physico-chemical characteristics of milk. Finally an experiment was conducted in a dairy industry at the southern region of Santa Catarina to assess the production of dish type cheese as well as the physico-chemical characteristics using raw milk with low, medium and high stability the test of alcohol. Statistical analysis was performed with SAS (2001), evaluating descriptively the frequency of occurrence of observations, linear correlation, variance and regression. The production level of the properties of the western and southern regions were related to the area characteristics, number of animals in the herd, cows' productivity, use of milking parlors. However, there is variability in characteristics related to the infrastructure of production units used as food, milking practices and facilities and the proportion of the categories of the herd and breed. Overall variation among observation revealed greater differences among regions than among production scales. The inclusion of 20 to 60% of Tifton 85 hay replacing corn silage did not change the weight and body condition, milk production and the physicochemical characteristics of milk. In moderate to severe heat stress, shade deprivation decreased milk production, milk stability, density and crude protein but increased titratable acidity, fat and urea nitrogen contents. Positive effects of shade provision were detected on the physiological, hematological aspects, especially in moderate to severe stress. But even in mild stress, access to shade allow cows keep better metabolic conditions such as adequate values for acid-base balance and reduced DNA damage. Stable milk from 72 to 76% of ethanol did not change the physico-chemical and yield of cheese plate.

Keywords: production systems, heat stress, stability, cheese

² Doctoral Thesis in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (254p) April, 2015.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. Fatores nutricionais	17
2.1.1 Proporção Volumoso x Concentrado	17
2.1.1.1 Proporção de diferentes volumosos	18
2.1.2. Fibra efetiva	18
2.1.3 Tipo de concentrado e seu processamento.....	19
2.1.4 Gordura na dieta.....	19
2.1.5 Aditivos.....	20
2.1.6 Proteína na dieta	21
2.1.7 Energia na dieta.....	22
2.2 Fatores não nutricionais	22
2.2.1 Estresse por calor.....	22
2.2.2 Idade e Número de partos.....	25
2.2.3 Práticas de ordenha	25
2.2.4 Dias de Lactação, ordem de lactação e tempo de ordenha.....	25
2.2.5. Contagem bacteriana total (CBT)	26
2.2.6 Contagem de Células Somáticas (CCS) e mastite.....	26
2.2.7 Raças e genética.....	27
2.3 Estabilidade	27
3 HIPÓTESES E OBJETIVOS	29
3.1 Hipóteses	29
3.2 Objetivos	29
CAPÍTULO II.....	41
Perfil das propriedades leiteiras das regiões do Extremo Oeste e Sul do estado de SC.....	41
CAPÍTULO III	74
Proporções de silagem e feno em dietas de vacas lactantes e as características físico-químicas do leite	74
CAPÍTULO IV.....	93
Intensidade do estresse por calor influencia distintamente o efeito benéfico do provimento de sombra sobre a produção e as características físico-químicas do leite	93
CAPÍTULO V	131
Intensidade do estresse por calor influencia distintamente os benefícios do provimento de sombra sobre os atributos fisiológicos e sanguíneos em vacas holandesas.....	131
CAPÍTULO VI.....	162
Acesso à sombra modifica o equilíbrio ácido básico, gasometria e reduz dano ao DNA em vacas holandesas sob estresse térmico leve	162
CAPÍTULO VII.....	186
Produção de queijo prato a partir de leite com diferentes estabilidades ao teste do álcool.....	186
CAPÍTULO VIII.....	205
8.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS	206
8.2 CONCLUSÃO GERAL.....	209

8.3 APÊNDICES	210
8.4 VITA	251

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Composição química do leite em várias raças bovinas.....	27
---	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Escore numérico de variáveis qualitativas no levantamento de propriedades rurais do extremo oeste catarinense, Brasil.....	50
---	----

Tabela 2. Coeficiente de determinação, probabilidade F e probabilidade do quadrado médio da correlação canônica (QMCC) dos atributos para classificação dos agrupamentos em análise discriminante.....	Erro! Indicador não definido. 56
---	---

Tabela 3. Valores médios dos atributos de infra-estrutura e escala de produção das UPLs e das características do leite e seus desvios padrão de acordo com o seu agrupamento	57
---	----

Tabela 4. Coeficiente de determinação, probabilidade F e probabilidade do quadrado médio da correlação canônica (QMCC) dos atributos para classificação dos agrupamentos em análise discriminante.....	62
---	----

Tabela 5. Valores médios dos atributos de infra-estrutura e escala de produção das UPLs e das características do leite e seus desvios padrão de acordo com o seu agrupamento.....	63
--	----

CAPÍTULO III

Tabela I. Valores percentuais da comp. bromatológica dos alimentos	79
---	----

Tabela II. Quantidades diárias dos alimentos consumidos por vacas leiteiras de acordo com a proporção de concentrado na dieta (valores em kg matéria seca/vaca/dia e % da MS)	80
--	----

Tabela III. Resultados médios de acordo com a proporção de silagem:feno na dieta e sua significância sobre a composição físico-química do leite.....	84
---	----

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Composição bromatológica dos alimentos	100
---	-----

Tabela 2. Valores de temperatura do ar (TA), umidade relativa (UR) e índice de temperatura e umidade (ITU) medidos nos piquetes com e sem sombra às 9h, 15h e 21h	106
--	-----

Tabela 3. Valores da probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade dos efeitos de dia, tratamento hierarquizado dentro de dia e do ajuste por covariância da produção de leite e características produtivas de vacas com e sem acesso à sombra sob estresse térmico moderado à severo	107
--	-----

Tabela 4. Valores médios da produção leiteira e atributos físico-químicos de vacas com (CS) e sem acesso à sombra (SS) sob estresse térmico moderado à severo.....	108
---	-----

Tabela 5. Temperatura do ar, umidade relativa e ITU medidos nos piquetes com e sem sombra às 9h, 15h e 21h.....	110
--	-----

Tabela 6. Valores da probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade dos efeitos de dia, tratamento hierarquizado dentro de dia e do ajuste por covariância da produção de leite e características produtivas de vacas com e sem acesso à sombra em estresse térmico leve.....	111
---	-----

Tabela 7. Valores médios da produção leiteira e atributos físico-químicos de vacas com (CS) e sem acesso à sombra (SS) sob estresse térmico leve.....	113
--	-----

CAPÍTULO V

Tabela 1. Composição percentual dos ingredientes dos alimentos.....	138
Tabela 2. Temperatura do ar, umidade relativa e ITU medidos nos piquetes com e sem sombra as 9h, 15h e 21h (experimento 1)	144
Tabela 3. Valores da probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade dos efeitos de dia, tratamento hierarquizado dentro de dia e do ajuste por covariância dos fatores fisiológicos de vacas com e sem acesso à sombra em estresse térmico moderado a severo (experimento 1)	145
Tabela 4. Valores médios dos atributos fisiológicos e hematológicos de vacas com e sem acesso à sombra sob estresse moderado à severo (experimento 1)	146
Tabela 5. Temperatura do ar, umidade relativa e ITU medidos nos piquetes com e sem sombra as 9h, 15h e 21h (experimento 2).....	148
Tabela 6. Valores da probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade dos efeitos de dia, tratamento hierarquizado dentro de dia e do ajuste por covariância dos fatores fisiológicos de vacas com e sem acesso à sombra em estresse térmico leve (experimento 2).....	149
Tabela 7. Valores médios dos atributos fisiológicos e hematológicos de vacas com e sem acesso à sombra sob estresse por calor leve (experimento 2).....	150

CAPÍTULO VI

Tabela 1. Temperatura do ar, umidade relativa e ITU medidos nos piquetes com e sem sombra as 9h, 15h e 21h.....	172
Tabela 2. Valores da probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade dos efeitos de dia, tratamento hierarquizado dentro de dia e do ajuste por covariância dos sanguíneos de vacas com e sem acesso à sombra em estresse térmico	173
Tabela 3. Valores médios de dano ao DNA e atributos oxidativos de acordo com o acesso à sombra (com sombra = CS ou sem sombra = SS) nos períodos estresse e recuperação.....	174
Tabela 4. Valores médios dos atributos do equilíbrio ácido-básico e gasometria de acordo com o acesso à sombra (com sombra = CS ou sem sombra = SS) nos períodos estresse e recuperação.....	175
Tabela 5. Valores médios de lactose plasmática de acordo com o acesso à sombra (com sombra = CS ou sem sombra = SS) nos períodos estresse e recuperação	177

CAPÍTULO VII

Tabela 1. Valores dos atributos físicos-químicos do leite cru, conforme a estabilidade no teste do álcool.....	193
Tabela 2. Valores dos atributos físicos-químicos do leite pasteurizado, conforme a estabilidade no teste do álcool	194

Tabela 3. Valores dos atributos físicos-químicos do leite com cloretos, conforme a estabilidade no teste do álcool	194
Tabela 4. Evolução dos valores de pH do leite, soro e queijo durante o processo de fabricação conforme a estabilidade do leite cru no teste do álcool.....	195
Tabela 5. Valores referentes a algumas etapas do processo de fabricação conforme a estabilidade do leite cru no teste do álcool.....	195
Tabela 6. Valores referentes produção, rendimento e atributos dos queijos conforme a estabilidade do leite cru no teste do álcool.....	196

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Plano ortogonal com fatores principais de levantamento de produção leiteira no Extremo Oeste de Santa Catarina, Brasil..... 54
- Figura 2.** Plano ortogonal com fatores principais sobre aspectos do manejo de ordenha nas unidades de produção leiteira no Extremo Oeste de Santa Catarina, Brasil..... 55
- Figura 3.** Plano ortogonal com fatores principais de levantamento de produção leiteira na região sul de Santa Catarina, Brasil 60
- Figura 4.** Plano ortogonal com fatores principais sobre aspectos do manejo de ordenha nas unidades de produção leiteira na região Sul de Santa Catarina, Brasil 61

CAPÍTULO IV

- Figura 1.** Produção de leite diária de vacas com e sem acesso à sombra sob stress moderado a severo, nos períodos pré-estresse (dias 1 a 14), estresse (dias 15 a 24) e pós-estresse (dias 25 a 38).....108
- Figura 2.** Produção de leite diária de vacas com e sem acesso à sombra em estresse térmico leve, nos períodos pré-estresse (dias 1 a 5), estresse (dias 6 a 9) e pós-estresse (dias 10 a 15)..... 111

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	Alto Feno
BF	Baixo Feno
BPP	Boas Práticas de Produção
BST	Somatotropina
CAV	Centro de Ciências Agroveterinárias
CBT	Contagem Bacteriana Total
CBT _c	Contagem Bacteriana Total transformada por logaritmo
CCS	Contagem de Células Somáticas
CCS _c	Contagem de Células Somáticas transformada por logaritmo
CLA	Ácido linoleico conjugado
CMT	California Mastitis Test
CNF	Carboidrato não fibroso
CS	Com acesso à sombra
ECC	Escore de Condição Corporal
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
ESD	Extrato Seco Desengordurado
FDN _{pe}	Fibra em detergente neutro parcialmente efetiva
GMT	Greenwich Mean Time
ITU	Índice de Temperatura e Umidade
Lina	Leite Instável Não Ácido
MAPA	Ministério Agricultura Pecuária e Abastecimento
MF	Médio Feno
MS	Massa Seca
NUL	Nitrogênio Ureico no Leite
PBS	Tampão fosfato salino
PDR	Proteína Degradável no Rúmen
PNDR	Proteína não degradável no rúmen
SS	Sem Acesso à Sombra
TBARS	Substância reativa ao ácido tiobarbitúrico
TBS	Temperatura de Bulbo Seco
TCT	Tempo de Coagulação do Tanque

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a cadeia produtiva do leite tem passado por uma significativa transformação, cujo setor vem atravessando momentos de dificuldades. Para poder competir dentro do setor leiteiro, os produtores devem atentar para gestão da propriedade rural, compromisso com a qualidade do produto, adesão de novas tecnologias, preocupação com meio ambiente.

Diante dessa nova realidade, o conhecimento dos fluxos da cadeia produtiva é de suma importância para a viabilidade da propriedade rural, visando à garantia de mercado e comercialização da produção. É importante que o produtor saiba como trilhar esses fluxos, pois é pelo exame dos segmentos da cadeia que se pode identificar as limitações e os gargalos da atividade.

A atividade leiteira em Santa Catarina possui notoriedade, destacando-se pelo seu expressivo crescimento nos últimos anos, constituindo-se numa importante atividade econômica e social que permite um aporte financeiro regular aos pequenos produtores, contribuindo para sua manutenção no campo e reduzindo o êxodo rural.

As regiões do Brasil e de Santa Catarina diferem entre si na quantidade de leite produzido e dentro da mesma região, assim como as raças, manejo de ordenha, estratégias de alimentação, com menor variabilidade das características físico-químicas do leite.

A caracterização dos sistemas de produção de leite é uma ferramenta importante para direcionar futuras pesquisas levando conhecimento para o campo, explorando vacas especializadas, manejo sanitário adequado, bom manejo nutricional e oferecer condições adequadas de conforto para os animais com sustentabilidade ambiental. Contudo, o Brasil por ser um País com dimensões continentais, acaba ficando mais exposto aos riscos provocados pelo aquecimento global, afetando diretamente a bovinocultura de leite.

Valores elevados de temperatura, umidade e radiação solar são os principais fatores ambientais que impõe estresse aos animais provocando reduções na produção e composição do leite, no desempenho reprodutivo e na saúde dos animais, inclusive causando dano no DNA das células. Entretanto o acesso a sombra a estes animais diminui os efeitos deletérios do estresse calórico.

O conhecimento da interação do animal e ambiente é importante para traçarmos estratégias que suportam a produção de leite e que também combatem distúrbios fisiológicos e metabólicos induzidos por condições de estresse calórico, ajudando as vacas a manter um metabolismo normal gerando leite de qualidade.

A partir de um consumidor mais exigente por produto de melhor qualidade, saudável, inócuo e que traga benefícios a saúde humana, as indústrias tem aprimorado as formas de diminuir os riscos, passando por um controle de qualidade interno, como no caso das boas práticas de fabricação. Dessa forma, a legislação brasileira, revogou a então instrução normativa nº 51/2002 para a instrução normativa nº 62/2011 que passa a requerer do setor

produtivo novos padrões de qualidade, implicando melhoria da qualidade da matéria prima.

Além dos fatores normais de estrangulamento da atividade laticinista, acrescenta-se a eles os problemas relacionados com a estabilidade do leite, sendo que essa questão vem sendo amplamente discutida a vários anos e em várias regiões do mundo relacionado a leite fluido, demonstrando a importância de sua influência na atividade mas poucas pesquisas na área de derivados lácteos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Fatores nutricionais e não nutricionais que afetam a composição do leite bovino

O conhecimento dos fatores que afetam a composição e a qualidade do leite é importante para que se possam adotar medidas para interferir sobre a cadeia produtiva do leite, garantindo assim que o produto final possa chegar ao mercado consumidor com as características físico-químicas exigidas. A padronização de critérios de monitoramento de qualidade do leite por meio da Instrução Normativa 62 (IN 62) torna as regras de exigências como referências no controle da qualidade.

A composição do leite é essencial para a determinação de sua qualidade, pois define diversas propriedades sensoriais e industriais. Os parâmetros de qualidade são cada vez mais utilizados para detecção de falhas nas práticas de manejo, servindo como referência na valorização da matéria-prima (DÜRR, 2004). Os constituintes do leite sofrem alterações pela dieta fornecida aos animais assim como também se modificam por fatores não nutricionais, influenciando no padrão desejável dos constituintes do leite (ANDRADE et al., 2014).

2.1. Fatores nutricionais

2.1.1 Proporção Volumoso x Concentrado

A modificação da proporção de volumoso e concentrado é uma das ferramentas mais usadas pelos produtores para modificar a produção e/ou composição do leite. Usualmente o aumento da proporção de concentrado leva a maiores produções de leite e menores teores de gordura, podendo elevar o teor de proteína. Peres (2001) salientou que o limite mínimo de volumoso na dieta é de 40%. Entretanto, Mühlbach (2004) afirmou que a relação volumoso:concentrado deve ser de, no mínimo, 50:50. Contudo, Kargar (2012) obteve uma diminuição da proteína do leite quando alterou a proporção volumoso:concentrado de 34:66 para 45:55, mas não obteve diferença no conteúdo de gordura do leite.

O aumento de concentrado eleva a produção de ácidos voláteis, concorrendo para a redução do pH ruminal. Sob pH ruminal menor do que 6,0 a degradação da fibra é prejudicada, diminuindo a proporção de ácido acético em relação ao ácido propiônico (TABELA 1). A biohidrogenação incompleta nessas condições leva à produção de ácidos graxos C18:1 trans 10, os quais reduzem a atividade enzimática na glândula mamária, diminuindo a formação de ácidos graxos de cadeia curta. O processo de biohidrogenação consiste na saturação dos ácidos graxos livres no rúmen, podendo ocorrer também à formação de alguns ácidos graxos “trans” como intermediários desse processo. Entre esses estão isômeros de C18:1 (trans) e ácido linoleico conjugado (CLA) trans-10, cis-12. Esses intermediários podem passar do rúmen ao intestino para absorção, e ocasionar a depressão na gordura do leite (PALMQUIST et al., 1993); (BAUMAN et al., 2006).

A redução na gordura do leite ocorre principalmente quando a relação acetato:propionato baixa de 2,2:1, a medida que aumenta a quantidade de concentrado da dieta, ocorre um decréscimo da gordura do leite (SILVA & NEUMANN, 2012).

O estudo de relações volumoso:concentrado (70:30, 50:50 e 30:70 na massa seca - MS) de feno de capim coast-cross de melhor e pior qualidade mostrou que rações com relação volumoso:concentrado de 30:70 reduziram as proporções de metano comparando as demais (GASTALDI, 2008). O aumento na relação volumoso:concentrado da dieta também resultou em aumento na porcentagem de gordura no leite (SANTINI et al., 1983; ROBINSON, 1991).

2.1.1.1 Proporção de diferentes volumosos

Couderc (2006) utilizou inclusão de feno nas proporções de 10% com a dieta que continha silagem picada com 6 mm e 5% de feno com a dieta em que a partícula era cortada com 23 mm e segundo os autores, o consumo com 10% de feno foi reduzido de 25 para 21,7 kg/dia enquanto o consumo aumentou com 5% de feno (22,7 para 27,1kg/dia). O pH ruminal foi 5,9 contra 5,7 para as dietas contendo 10 e 5% de feno, respectivamente. Não foi alterada a produção leiteira diária, o escore de condição corporal (ECC) nem as características físicas do leite. Por outro lado, Villeneuve et al. (2013) relataram que a produção de leite foi maior para animais que recebem maior proporção de silagem quando comparadas com feno, em que Win et al. (2015) ressaltam que as dietas com fibra efetiva suficiente proporcionam um adequado ambiente ruminal.

2.1.2. Fibra efetiva

A fibra fisicamente efetiva de um alimento corresponde às propriedades do alimento que estimulam a mastigação, principalmente tamanho de partículas. Sendo assim, quanto maior o tamanho da partícula do alimento, maior estímulo à mastigação, e, conseqüentemente, maior estímulo à produção de saliva, a qual contém substâncias (tamponantes) capazes de evitar redução do pH ruminal. Estabelece-se que cerca de 20% das partículas de fibra tenham, pelo menos, 4cm de comprimento (SILVA & NEUMANN, 2012) e o restante não deve ser moído em partículas menores que 0,6 a 0,8cm (KNORR, 2002; PERES, 2001).

Segundo Noro et al. (2006), o fornecimento de forragens finamente moídas resulta em fermentação ruminal que produz maior proporção de ácido propiônico e, conseqüentemente, menor porcentagem de gordura no leite. Segundo Robinson (1991), para manter a gordura no leite as vacas necessitam, em média, de 600 minutos de ruminação diária. Contudo, as dietas devem conter, no mínimo, 28% de Fibra em Detergente Neutro (FDN), sendo 75% deste proveniente de forragens não finamente moídas (KNORR, 2002).

Em trabalho recente, Rico et al. (2014) induziram vacas a produzirem 30% menos gordura no leite, sem alterar a produção total, através de uma dieta pobre em fibra (26,5% de FDN) e com alto teor de ácidos graxos insaturados (5,8%), porém mantendo as exigências nutricionais da dieta, não ocorrendo diferenças na produção de leite. Segundo Yang e Beauchemin

(2005) o conteúdo baixo, médio e alto de Fibra em Detergente Neutro parcialmente efetiva (FDNpe) na dieta de vacas não alteraram a produção, gordura, proteína e lactose do leite.

2.1.3 Tipo de concentrado e seu processamento

O tipo (composição) de concentrado é mais decisivo do que o teor deste na dieta. Concentrados com elevado teor de amido de elevada degradabilidade tendem a deprimir mais a gordura do leite do que concentrados com elevado teor de fibra digestível (SILVA & NEUMANN, 2012).

Farelo de glúten de milho, polpa cítrica, casca de soja e farelo de trigo possuem carboidratos de alta digestibilidade, mas não reduzem o pH em função do tipo de fermentação que geram, conseqüentemente, não diminuem o teor de gordura do leite. Os concentrados que possuem alto teor de amido (milho, sorgo e cevada) promovem redução do pH ruminal, prejudicando o desenvolvimento das bactérias celulolíticas do rúmen e reduzindo a digestão da fibra contida nas forragens, o que promove diminuição do teor de gordura do leite (KNORR, 2002).

O aumento da degradação ruminal do amido proporcionada pelo processamento aumenta a disponibilidade de energia rapidamente fermentável no rúmen, podendo aumentar a produção de proteína microbiana e ácido propiônico, favorecendo o aumento da produção de leite e conseqüentemente mais aminoácidos disponíveis para síntese da proteína do leite (MOURA, 2013).

San Emeterio et al. (2000) compararam os efeitos da granulometria do milho moído (3,28 e 1,11mm) na alimentação de vacas confinadas e observaram aumento na digestibilidade do amido, produção de leite e proteína, e redução no nitrogênio amoniacal e nitrogênio ureico do leite para o milho moído mais fino. Estes dados indicam que menores granulometrias aumentam a eficiência de utilização do amido e nitrogênio. Moura (2013) também afirma que a moagem muito fina de grãos aumenta a digestão, entretanto reduz o teor de gordura do leite. Segundo Silva e Neumann (2012), práticas como a floculação a vapor e o armazenamento na forma de silagem de grãos úmidos tendem a elevar a taxa de digestão do amido deprimindo a gordura do leite.

A polpa cítrica possui em torno de 85-90% do valor energético do milho e teor de proteína bruta (PB) em torno de 7,1%, cujo produto final da fermentação é o ácido acético. Este ácido é um dos precursores da gordura do leite, por isso, sugere-se que a polpa cítrica pode auxiliar na manutenção de altas porcentagens de gordura no leite em condições onde o volumoso é escasso ou de baixa qualidade (ROCHA FILHO, 1998). O grão de milheto é um bom substituto, total ou parcial, do grão de milho, em dietas de vacas produzindo 25 kg/dia de leite, sem alterar produção de leite e consumo de alimentos pelos animais (RIBEIRO et al., 2004).

2.1.4 Gordura na dieta

Os tipos de lipídeos empregados nas dietas podem influenciar a fermentação e a digestibilidade ruminal da fibra, por meio da supressão das bactérias celulolíticas e metanogênicas (DUARTE et al., 2005). Objetivando

aumentar a energia de dietas, principalmente de vacas de alta produção, Carvalho (2002) propôs a inclusão de lipídios ao redor de 5 a 7% na MS da dieta, com isso obteve aumento na produção de leite em 8% em função da elevação no teor de energia da dieta, porém gera resultados negativos no teor de gordura do leite.

Gorduras saturadas tendem a causar leve aumento, enquanto similar quantidade de gordura insaturada causa diminuição de até um ponto percentual no conteúdo de gordura do leite (NORO et al., 2006). Os alimentos que apresentam maior efeito supressor no teor de gordura do leite são as gorduras poli-insaturadas ou ricas em ácidos graxos do tipo “trans”, óleos vegetais de milho, soja, girassol e canola e também o óleo de peixe (PERES, 2001).

O fornecimento de sementes de soja e algodão, apesar de conter alto teor de ácidos graxos insaturados, apresenta poucos riscos à saúde ruminal, se respeitados os limites de uso. A razão disto, de acordo com Fontaneli (2001), é que o óleo tem sua taxa de degradação reduzida por estar contido na semente. Por esta razão, recomenda-se não moer a soja em grão, apenas quebrá-la em três ou quatro partes e fornecer o caroço integralmente (KNORR, 2002; FONTANELI, 2001; PERES, 2001).

Gorduras protegidas, sob forma de sabões de cálcio ou tratadas com formaldeído, são inertes no rúmen passando de forma intacta por este, resultando em um menor efeito depressor nos níveis de gordura do leite (KNORR, 2002).

A adição de gordura na dieta geralmente leva a uma redução no teor de proteína do leite em torno de 0,1 a 0,3 unidades percentuais (BACHMAN, 1992). Uma explicação encontrada para tal fato é que os microrganismos do rúmen não são aptos para utilização da gordura como fonte de energia para seu desenvolvimento, afetando a síntese de proteína microbiana e conseqüentemente o fornecimento de aminoácidos para composição da proteína do leite (NORO et al., 2006).

O uso de glicerina bruta em dietas que atendam as exigências protéicas e energéticas dos animais, não interfere na composição e qualidade do leite de vacas da raça Holandesa (PIMENTEL et al., 2014).

2.1.5 Aditivos

Os aditivos alimentares alcalinizantes (óxido de magnésio) e tamponantes (bicarbonato de sódio), segundo Carvalho (2002), evitam a redução do teor da gordura do leite através da manutenção ou elevação do pH ruminal. Entretanto, Russel & Chow (1993) creditam o efeito positivo do bicarbonato de sódio e outros sais tamponantes ao aumento no fluxo de passagem dos alimentos concentrados pelo rúmen.

O uso do bicarbonato de sódio em vacas de alta lactação aumentou os níveis de gordura e sólidos do leite e melhora nas propriedades de industrialização, o que reflete o efeito benéfico desse regulador sobre o pH e ambiente ruminal (DELAQUIS & BLOCK, 1995). O uso do bicarbonato na dieta de vacas leiteiras eleva o pH ruminal, aumenta a relação acetato/propionato no

rúmen e incrementa a digestibilidade da fibra em detergente ácido (LE RUYET & TUCKER, 1992).

O fornecimento de 6 a 12 gramas de niacina por animal/dia, a partir das duas últimas semanas que precedem o parto até o pico de consumo de alimentos (80 a 120 dias após o parto), aumentou a ingestão de MS, aumentando a produção de proteína bacteriana e diminuindo a concentração de nitrogênio ureico no leite, reduzindo assim o balanço energético negativo, contribuindo totais para o aumento da proteína do leite, conseqüentemente os teores de sólidos (PERES, 2001).

Segundo Oliveira et al. (2005), ionóforos diminuem o consumo de MS devido ao aumento do tempo de permanência do alimento no trato digestivo, ocasionando melhoria na eficiência alimentar. A monensina expressa maiores efeitos, se fornecida em dietas com altos níveis de carboidratos, por propiciar mais substrato para produção de glicose (POSSATTI, 2015). Conforme Andrighetto et al. (2005), a monensina não aumenta a produção de leite no início de lactação, pois ocorrem mudanças no peso corporal que interferem na produção, comprovado por Possatti (2015), mas quando avaliada a composição do leite, apenas apresentou diferença na quantidade de sólidos totais no leite.

O fornecimento de somatotropina bovina (BST) leva a um aumento na quantidade de leite fluido produzido, como resultado da síntese de lactose, contendo teores elevados ou normais de gordura, causando, em contrapartida, uma depressão na quantidade de proteína produzida em função do desbalanceamento na quantidade dos precursores (aminoácidos) em proporção correta (FONTANELI, 2001).

2.1.6 Proteína na dieta

A suplementação com aminoácidos protegidos, como a metionina e a lisina, aumentam os níveis de aminoácidos no intestino para absorção e, conseqüentemente, aumento da caseína (SCHWAB et al., 1992). Entretanto, estes aminoácidos associados ao óleo de soja reduziram a gordura do leite e aumentaram a proteína, enquanto que a suplementação isolada de lisina e metionina sem óleo não resultou em elevação do teor de proteína (FROTA, 2014).

Dietas com baixa concentração de proteína resultam em menores teores de proteína no leite. O contrário não ocorre ao fornecer proteína em excesso. É preciso fornecer quantidades equilibradas de proteína degradável no rúmen (PDR) e proteína não degradável no rúmen (PNDR). Tanto a produção de leite, como a produção de proteína do leite serão maximizadas se a quantidade de PDR na ração ficar em torno de 12% da MS total, valor considerado ótimo para a síntese de proteína microbiana (PMic), desde que o suprimento energético também seja adequado (Pedroso, 2006). Com a estimativa de que para cada 1,0 Mcal de energia líquida há um aumento de 0,015% de proteína no leite (SUTTON, 1989).

Cada 1% de PB incrementado no teor de proteína na dieta, contribui para 0,02% na proteína do leite. A utilização de dietas com alto teor de proteína, com grande fração de rápida degradação ruminal, sem o adequado

suporte de energia, faz com que haja um aumento do nitrogênio não proteico (NNP) no leite, o que pode ser aferido pela presença elevada de ureia no leite (FONTANELI, 2001).

Mayer et al. (1997) utilizaram diferentes degradabilidades da proteína (70; 60; 52; 45) bruta na dieta de vacas leiteiras, e a dieta com 60% de proteína degradável apresentou maior porcentagem de proteína no leite. Além disso, a porcentagem de gordura no leite decresceu numericamente com a diminuição da degradabilidade da PB nas rações.

Quanto ao perfil de aminoácidos, os mais limitantes à síntese de proteínas do leite são a lisina e a metionina. Schwab (1992) e Rulquin et al. (1993) apresentaram valores ótimos de fluxo desses aminoácidos, onde sugerem uma relação ideal de 3:1, entre lisina e metionina, para obter uma boa síntese de proteína no leite. Contudo, a utilização de metionina protegida e não protegida para vacas em lactação não afetou a produção e o teor de proteína do leite (SANCANARI et al. 2001).

A ureia pode ser usada como suplementação, sendo uma alternativa para atender as exigências proteicas (LOPEZ, 1984). Silva et al. (2001) avaliaram níveis de ureia na MS e à medida que aumentava o percentual de ureia, diminuía o farelo de soja, observando que com 0,7% de ureia, aumentou proteína do leite, mas a gordura foi maior para o grupo controle, sem uso de ureia.

2.1.7 Energia na dieta

Aumentos nos teores de energia da dieta resultam em maior síntese e maior concentração de proteína no leite. Porém, nem todas as fontes de energia são capazes de aumentar a síntese de proteína, como a gordura, por exemplo, cujo fornecimento, geralmente, causa redução da proteína do leite (WU & SATTER, 2000). Entretanto Vargas et al. (2002) não encontraram diferenças na composição do leite quando comparou três alimentos na dieta de vacas em lactação, farelo de soja, grão de soja e óleo de soja, mas para os três grupos estudados a dieta estava atendendo as exigências nutricionais dos animais, apenas alterou o tipo de alimento.

O caroço de algodão também tem sido uma alternativa bastante estudada para a suplementação energética, pois é considerado fonte de energia, sendo relativamente rico em proteína (24% PB), além disso, não requer nenhum processamento (VILLELA et al., 1996).

Diets deficientes em energia podem reduzir o teor de proteína do leite em 0,1 a 0,3 unidades percentuais. Mesmo com a necessidade de maximizar o consumo de carboidratos não fibrosos (CNF), é preciso atender às necessidades de fibra (PEDROSO, 2006).

2.2 Fatores não nutricionais

2.2.1 Estresse por calor

Uma das primeiras respostas do animal ao ambiente estressante é a redução no consumo de alimentos na busca de reduzir a produção de calor pelos processos digestivos (CASTANHEIRA, 2009), alterando assim a

composição do leite (COLLIER, 2005), diminuição do volume total e dos teores de sólidos totais, de proteína e de gordura (GONZÁLEZ & CAMPOS, 2003). Neste sentido, Noro et al. (2006) recomendam que a dieta fornecida aos animais contenha maior concentração energética. Durante o estresse médio e severo as exigências nutricionais podem-se elevar entre 7 a 25% (NRC, 2001) ou mesmo até 30% (FOX & TYLUKI, 1998).

Altas temperaturas provocam queda na produção de leite, de gordura e nos componentes do leite (RODRIGUEZ et al., 1985; HEAD, 1989). A porcentagem de gordura e proteína em animais sob estresse por calor é menor que em animais resfriados, 4,2 e 3,5%, respectivamente (DU PREEZ, 2000). Embora Smith et al. (2013) não encontraram diferenças nos níveis de gordura em vacas com estresse calórico. Segundo Wheelock et al. (2010), 40 a 50% dessa redução se deve ao menor consumo de alimentos (efeito indireto), sendo o restante em virtude de outros mecanismos induzidos pelo estresse (efeitos diretos). Somado ao efeito de menor consumo, Head (1989) atestou, ao dispor vacas Holandesas em ambiente passando de 18°C a 30°C, redução de até 35% na eficiência de utilização de energia para fins produtivos.

Segundo Sevi & Caroprese (2012), a exposição ao sol em altas temperaturas promove o aumento da permeabilidade dos capilares, elevando a quantidade de enzimas proteolíticas no leite, que podem reduzir a concentração proteica. Por outro lado Bernabucci et al. (2002) consideraram que a redução nos níveis de α e β -caseínas foi o fator que causou a redução do teor proteico do leite, provavelmente em virtude do menor aporte de energia e proteína.

Os efeitos negativos do estresse térmico sobre os níveis de lactose no leite são decorrentes do uso da glicose como fonte de energia ao animal, reduzindo o aporte à glândula mamária e posterior síntese desse componente, além do efeito direto da queda no consumo de alimentos (FISCHER, 2014). Wheelock et al. (2010) indicaram que durante o estresse calórico vacas secretam 200-400g a menos de lactose no leite quando comparado com vacas em conforto térmico, devido à utilização elevada de glicose por tecidos extramamários, além da diminuição da lactose em virtude do uso da glicose como fonte de energia (STUMPF et al., 2013).

Vacas que sofreram de estresse calórico diurno podem compensar parcialmente a ingestão de MS devido ao efeito de resfriamento durante a noite (KADZERE et al., 2002; SILANIKOVE et al., 2009). A gravidade do estresse calórico depende de flutuações diurnas e noturnas de temperaturas. Se a temperatura ambiente tem valores inferiores a 21°C durante a noite para 3 a 6 horas, o animal tem a oportunidade de dissipar o calor adquirido durante o dia (IGONO et al., 1992; MULLER et al., 1994; WEST, 2003; SILANIKOVE et al., 2009).

O estresse oxidativo avaliado pela técnica de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), carbonil e relação nitrito/nitrato mostrou aumento quando vacas em lactação foram submetidas ao estresse calórico agudo (BERNABUCCI et al., 2002). Os efeitos citotóxicos de TBARS são bem conhecidos (HALLIWELL & CHIRICO, 1994). Em particular, TBARS podem

induzir uma redução da fluidez da membrana (CHEN & YU, 1994) e aumentar a fragilidade das membranas celulares (SPEIT et al., 1996).

A concentração de TBARS no sangue indica a magnitude da pré-oxidação lipídica e influencia a síntese de hormônios esteróides (BERNABUCCI et al., 2002; Appasamy et al., 2008). Portanto, a medição destes marcadores é muito importante para avaliar o efeito de temperaturas ambientais elevadas sobre os níveis de estresse oxidativo de vacas. Estes TBARS e outros marcadores antioxidantes estão correlacionados com a condição metabólica de vacas leiteiras (BERNABUCCI et al., 2002; CASTILLO et al., 2005). Pode-se avaliar a gravidade do estresse oxidativo pela medição de marcadores. TBARS e outros marcadores antioxidantes estão correlacionados com a condição metabólica de vacas leiteiras (BERNABUCCI et al., 2002; CASTILLO et al., 2005). Além disso, foi relatado que o estresse oxidativo pode prejudicar a função hepática (VENDEMIALE et al., 2001).

O estresse oxidativo resultante do aumento da produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio e/ou uma diminuição da defesa antioxidante, conduz a danos de macromoléculas biológicas e perturbação do metabolismo normal e fisiologia (TREVISAN et al., 2001). Os mecanismos através dos quais ocorre morte celular em resposta ao estresse calórico ainda não estão completamente elucidados, no entanto alguns estudos têm demonstrado que ocorre morte programada das células germinativas através de apoptose. Este tipo de morte celular também ocorre em função da ação de substâncias oriundas do estresse oxidativo, embora não seja bem conhecida a origem das espécies reativas de oxigênio (EROs) nos casos de estresse calórico, mas se sabe que estão aumentadas nestes casos (KUMAGAI et al., 2002). Quando EROs são produzidos mais rápido do que podem ser neutralizados de forma segura por mecanismos antioxidantes ocorre o estresse oxidativo (SIES, 1991). Estas condições podem contribuir e/ou levar ao aparecimento de problemas de saúde nos bovinos (MILLER et al., 1993). Ostling & Johnson (1984) desenvolveram um teste em que células, após tratamento com agentes físicos ou químicos em estudo, são fixadas em lâmina previamente preparada com agarose e deixadas em solução de lise. Essas lâminas são submetidas à eletroforese, e posteriormente observadas em microscópio de fluorescência, onde se quantifica lesões produzidas no seu DNA. Com este método, a indução de quebras no DNA pode ser avaliada (SINGH, 2004). As alíquotas contendo células do sangue são retiradas e imediatamente processadas, ao abrigo da luz, a fim de que não ocorram novas lesões no DNA. A observação em microscópio é basicamente de linfócitos e monócitos. Quando os núcleos são submetidos à eletroforese, todo DNA sofre a ação das forças de atração e de repulsão. As partes lesionadas se dividem em pequenos fragmentos, os quais se deslocam com maior facilidade, se destacando do DNA intacto, formando um rastro semelhante à cauda de um cometa, dando origem ao nome do teste (Teste Cometa). Quantifica-se o teste cometa de acordo com o tamanho e intensidade da cauda. Para tanto, um total de cinquenta núcleos escolhidos aleatoriamente, em cada lâmina, são avaliados e as lesões classificadas desde zero, não lesado; até três, o máximo lesado.

Uma resposta fisiológica ao estresse por calor é o aumento na taxa respiratória, resultando em perdas excessivas de dióxido de carbono (CO_2), provocando inicialmente alcalose respiratória. Assim, a pressão parcial de CO_2 ($p\text{CO}_2$) diminui, levando à queda na concentração de ácido carbônico (H_2CO_3) e hidrogênio (H^+). Em resposta, os rins aumentam a excreção de HCO_3^- e reduzem a excreção de H^+ na tentativa de manter o equilíbrio ácido-básico (SOUZA et al., 2002). O menor teor de bicarbonato promove uma subsequente queda no pH sanguíneo, levando ao quadro de acidose metabólica compensatória (BAUMGARD & RHOADS, 2009).

2.2.2 Idade e Número de partos

Teixeira et al. (2003) observaram que a média de produção de leite aumentou de 20,8 kg para 24,8 kg com o aumento da idade da vaca ao parto de 2 para 4,5 anos, cresceu à taxa decrescente até 5,5 a 6 anos. As porcentagens de gordura e proteína permaneceram relativamente constantes com o aumento da idade ao parto. Entretanto, Noro et al. (2006) relataram que a idade ao parto afetou o teor de proteína do leite, obtendo-se maior valor nas vacas com partos de 33 a 45 meses de idade e menor nas vacas de primeiro parto de 20 a 32 meses.

A porcentagem de gordura do leite apresentou valores mais baixos nas vacas com menor idade ao parto, apresentando maior teor nos animais com idade ao parto acima de 7 anos e a lactose reduz a medida que aumenta a idade da vaca (NORO et al., 2006).

2.2.3 Práticas de ordenha

Os percentuais de gordura, sólidos totais, produção de leite corrigido para 3,5% de gordura e corrigido para sólidos totais foram mais elevados nos grupos com 4 ordenhas (LIMA et al., 2011). O leite que é removido primeiro contém menos gordura (sendo o teor até 2% mais baixo) que o leite removido no final da ordenha (até 7-9% mais alto). O motivo dessa distribuição dos glóbulos de gordura não é completamente conhecido. Postula-se que os glóbulos de gordura se agregam nos alvéolos e são retardados na sua passagem em direção ao teto, ao passo que a porção fluida passa ao redor dos glóbulos de gordura mais prontamente, em direção à base do úbere e do teto. Portanto, o leite dos maiores dutos da glândula possui menos gordura que o leite dos alvéolos (SOUTO et al., 2006).

2.2.4 Dias de Lactação, ordem de lactação e tempo de ordenha

O leite contém, em média, 87,4% de água e os maiores constituintes sólidos são gordura, proteína e lactose, com menores níveis de minerais e vitaminas. Quanto maior o período da lactação, maiores são os teores de gordura encontrados no leite (AGANGA et al., 2002; NORO et al., 2006). Embora Birgel (2006) encontraram valores de gordura, proteína e lactose menores durante os três primeiros meses. Dukes (1993) comenta que o estágio de lactação influi na composição do leite, havendo aumento nos conteúdos de gordura, proteína e lactose à medida que a lactação avança. Isto significa que a curva de gordura é inversamente proporcional à produção de leite, uma vez

que a produção de leite cresce até o pico e diminui durante a lactação, enquanto que próximo ao pico o teor de gordura atinge valores mínimos (BEHMER, 1987).

Vacas primíparas possuem teores de gordura, proteína e lactose maiores que vacas múltiparas. Contudo, na segunda e terceira lactações, os teores desses sólidos do leite são mais baixos, elevando-se a partir da quarta lactação (QUEIROGA, 2007).

Os teores de gordura também sofrem modificações de acordo com o tempo da ordenha e com o período do dia, há uma tendência de que as vacas produzam leite com menor teor de gordura no período da manhã (STELWAGEN, 2001; CERVANTES, 2005). Além disso, na prática de uma ordenha observa-se maior conteúdo percentual de gordura e proteína que em 2 ou mais ordenhas (SOBERÓN et al., 2010).

2.2.5. Contagem bacteriana total (CBT)

Cavalcanti (2010) citou que o leite, ao ser sintetizado e secretado para o lúmen alveolar, encontra-se livre de microrganismos. Porém, contamina-se durante seu percurso em direção ao exterior do úbere, com bactérias saprófitas, causando uma diminuição da lactose. Contudo, as leveduras e os fungos são mais raros de serem encontrados (TAFFAREL et al, 2010). Entretanto, os microrganismos presentes no leite de propriedades que possuem um deficiente sistema básico de higiene de ordenha e falhas na refrigeração atuam na fermentação da lactose, acidificando o leite, provocando a coagulação da caseína, limitando o uso deste leite pela indústria (FONSECA & SANTOS, 2000).

Os microrganismos psicrotróficos produzem enzimas como as proteases e lipases, que provocam sérios problemas tecnológicos e alterações organolépticas no leite (YAMAZI et al., 2013). Estas enzimas são termorresistentes, desta forma, mesmo após tratamento térmico continuam provocando alterações nos derivados do leite e até mesmo no próprio leite quando submetido à esterilização (TRONCO, 2003).

2.2.6 Contagem de Células Somáticas (CCS) e mastite

Contagem de células somáticas (CCS) próximos a 350.000 cel/mL promove uma redução na concentração de lactose, proteína total, gordura e, por conseguinte, sólidos totais do leite bovino, principalmente em condições de temperatura ambiental superior a 31°C (BUENO et al., 2005). Carvalho (2002) identificou em rebanhos expostos a períodos chuvosos uma redução nas concentrações de proteína do leite, isto devido à ação de enzimas proteolíticas que agem de forma simultânea, quando rebanho é sujeito a altas casuísticas de mastite.

A mastite reduz a produção de leite, bem como seus níveis de gordura e lactose. Entretanto, não há modificação do conteúdo de proteína total, embora o teor de caseínas se reduza (FREITAS, 2007), depreciando a qualidade do leite, com a diminuição dos teores de açúcares, proteínas e minerais como a lactose, caseína, gordura, cálcio, fósforo e aumento significativo de imunoglobulinas, cloretos e lipases (CARVALHO, 2002).

O leite com alta CCS apresenta um decréscimo de caseína, gordura e lactose. Com isso, ocorre uma redução do rendimento do produto na sua industrialização, bem como do tempo de estocagem do mesmo e seus derivados, razão pela qual os laticínios estão preferindo o leite com baixa CCS (SABEDOT et al., 2014). Os mesmos autores verificaram que quanto maior a CCS, menor o percentual de lactose, evidenciando o crescimento microbiano utilizando a lactose como fonte de carboidratos.

A magnitude do aumento da CCS e as mudanças na composição do leite estão diretamente relacionadas com a superfície do tecido mamário atingido pela reação inflamatória. Portanto, há uma relação direta entre a CCS e a concentração dos componentes do leite (SCHAELLIBAUM, 2000). A CCS no leite de animais individuais ou de tanque é uma ferramenta valiosa na avaliação do nível de mastite subclínica no rebanho, bem como indicativo da qualidade do leite na propriedade e para estabelecer medidas de prevenção e controle da mastite (LAFFRANCHI, 2006).

2.2.7 Raças e genética

Algumas raças naturalmente apresentam maiores teores de sólidos, com destaque para a raça Jersey (TABELA 3). A raça Holandesa apresenta menores percentuais, mas maiores produções totais de gordura e proteína. Já as raças Jersey e Pardo-Suíço, apesar dos altos percentuais de gordura e proteína, apresentam produções totais destes componentes inferiores aos encontrados na raça Holandesa (ALMEIDA, 2004).

A raça Holandesa em cruzamentos com animais zebuínos e com Jersey aumenta o rendimento e a composição do leite (LOPEZ et al., 1990).

TABELA 1. Composição química do leite em várias raças bovinas.

Raça	Gordura (%)	Proteína (%)	Relação			Sólidos Totais (%)
			Prot/ Gor (%)	Lactose (%)	Cinzas (%)	
Ayrshire	4,1	3,6	0,9	4,7	0,7	13,1
Pardo Suíço	4,0	3,6	0,9	5,0	0,7	13,3
Guernsey	5,0	3,8	0,8	4,9	0,7	14,4
Jersey	5,5	3,9	0,7	4,9	0,7	15,0
Zebu	4,9	3,9	0,8	5,1	0,8	14,7
Holandês	3,64	3,2	0,88	4,56	0,7	12,98

Fonte: González et al., (2001).

No caso de Cuba, onde a seleção genética da raça Holandesa foi baseada na produção de leite, condicionou a prevalecer a variante genética AA das proteínas lácteas, as quais são propensas a mostrar menor concentração protéica no leite (RODRIGUEZ, 2011).

2.3 Estabilidade

A prova do álcool avalia a estabilidade das proteínas lácteas submetidas à desidratação provocada pelo álcool e é usada para estimar a

estabilidade do leite (Marques et al., 2007). O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da IN 62 (BRASIL, 2011) determinou como critério inicial de aceitação do leite pela indústria, a realização do teste do álcool na concentração mínima de 72°GL, embora as indústrias utilizem graduações mais elevadas, como 78°GL no intuito de selecionar leite de melhor qualidade.

Existem dúvidas até o presente sobre as diferentes concentrações de etanol necessárias para estimar a estabilidade térmica, uma vez que a severidade do tratamento térmico varia conforme o produto, sendo elevada no caso do leite ultra high temperature (UHT) e leite em pó. O uso de soluções para o teste com concentração de etanol excessiva levaria ao aumento de falsos positivos, podendo contribuir para o descarte de leite (FISCHER et al., 2012).

Alguns estudos compararam leite com distintas estabilidades e verificaram variação quanto aos resultados da composição química, podendo haver redução, não alteração e mesmo aumento da concentração de seus componentes. Em alguns estudos, os autores verificaram que o teor de gordura foi superior para o leite instável não ácido (LINA) comparada com o leite normal (BARROS, 2001; MARQUES et al., 2007). Barros (2001) observou que aumentou a proteína do leite positivo ao teste do álcool. Entretanto, Lopez (2008) e Marquez et al., (2004) encontraram valores inferiores para o leite lina, quando comparado com o leite normal. Resultados semelhantes foram observados por Ponce & Hernández (2001).

Diversos fatores podem influenciar estabilidade do leite como o uso de suplementação, aporte alimentar e nutricional. Rodas et al. (2000), trabalharam com rebanhos suplementados e não suplementados com alimento concentrado, observaram que o leite proveniente de rebanho que não recebeu suplementação apresentou positividade no teste do álcool, com acidez variando entre 14 a 15°D.

Tem-se bem claro que a mobilidade dos sais nas distintas fases, são um dos principais fatores de interferência na estabilidade térmica do leite, principalmente pelo aumento do cálcio na fase solúvel e pela diminuição da atividade de fosfatos e citratos (SILVA, 2004). Há uma correlação direta entre a estabilidade do leite e as relações de equilíbrio entre os sais na forma solúvel e coloidal (ROSE, 1961). Chavez et al. (2001) analisaram os fatores que interferem na estabilidade do leite, constataram que o único parâmetro que reduz, tanto a estabilidade ao álcool quanto ao tratamento térmico, é o teor de Ca^{+2} .

O pH interfere na estabilidade térmica do leite, uma vez que em pH ácido (abaixo de 6,5), reduz força iônica para a manutenção da estrutura micelar o que determina um deslocamento do cálcio da fase coloidal para solúvel, aumentando o cálcio iônico (VAN BOEKEL, 1993). Em relação à estabilidade do leite, considera-se que o aumento de ureia aumenta a estabilidade do leite e isso pode ocorrer pela diminuição da acidez do leite (SINGH & CREAMER, 1992), ou pela transformação da ureia em cianato, que reage com a proteína aumentando as cargas negativas da micela dando maior força de repulsão e, por consequência, aumentando a estabilidade do leite

(SWEETSUR & MUIR, 1981). A lactose tende a ter um efeito redutor na estabilidade do leite por poder modificar rapidamente a faixa de pH do leite, por sua decomposição e conseqüente formação de ácidos (VAN BOEKEL et al., 1993).

As alterações da condição nutricional do rebanho parece ser um dos principais fatores etiológicos da instabilidade térmica do leite, sendo descrito por vários autores, sendo que se deve considerar sempre a capacidade de compensação do organismo o que pode reduzir o efeito direto dos desequilíbrios nutricionais sobre a estabilidade do leite (WALSTRA & JENNES, 1984).

Em trabalhos que avaliaram o efeito da restrição alimentar sobre a estabilidade ao álcool, observou-se que, a diminuição do aporte nutricional dos animais interferiu de forma negativa na estabilidade ao álcool e na composição do leite (STUMPF et al., 2013). No Chile, foi trabalhado com concentração de álcool e 75% v/v e, nessa faixa, encontrou 8,3% de incidência de lina (MOLINA et al., 2001). Na Argentina, trabalhou-se com concentração de 72% v/v e se obteve uma incidência de 33% (NEGRI, 2003). No Brasil, principalmente na região Sul, trabalhou-se com a concentração de 76% v/v – por ser a concentração utilizada pela indústria na região de estudo – e foram determinadas incidências de 55 a 58% (MARQUES et al., 2007; ZANELA et al., 2009).

3 HIPÓTESES E OBJETIVOS

3.1 Hipóteses

- ✓ As características físico-químicas do leite são modificadas pelo sistema de produção, pela proporção de silagem e feno na dieta e pelo acesso à sombra das vacas leiteiras durante a estação quente.
- ✓ As características físico-químicas do leite cru determinam a composição e o rendimento do queijo prato.

3.2 Objetivos

- ✓ Avaliar quais características físico-químicas são alteradas em função da escala de produção e da região leiteira.
- ✓ Avaliar o efeito do aumento da proporção de feno substituindo a silagem sobre as características físico-químicas do leite.
- ✓ Avaliar o efeito do acesso à sombra de vacas sob estresse por calor leve ou de moderado a severo sobre as características físico-químicas do leite, e atributos produtivos, fisiológicos e metabólicos das vacas leiteiras.
- ✓ Avaliar o efeito da estabilidade no teste do álcool do leite cru sobre a composição e rendimento do queijo tipo prato.

9. REFERÊNCIAS

- AGANGA, A. A.; AMARTEIFIO, J. O.; NKILE, N. Effect of stage of lactation on nutrient composition of Tswana sheep and goat's milk. **Journal of Composition and Analysis**, [London], v.15, n.5, p.533-543, 2002.
- ALMEIDA, R. **Como a genética pode alterar a composição do leite**. 2004. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br>. Acesso em: 22 fev. 2015.
- ANDRADE, K. D. et al. Qualidade do leite bovino nas diferentes estações do ano no estado do Rio Grande do Norte. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, Niteroi, v. 21, n. 3, p. 213-216, 2014.
- ANDRIGHETTO, C. et al. Efeito da Monensina Sódica sobre a Produção e composição do Leite, a Produção de Mozzarella e o Escore de Condição Corporal de Búfalas Murrah. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.34, n.2, p.641-649, 2005.
- APPASAMY, M. et al. Evaluation of the relationship between follicular fluid oxidative stress, ovarian hormones, and response to gonadotropin stimulation. **Fertility and Sterility**, New York, v. 89, p. 912–921, 2008.
- BACHMAN, K. C. Managing milk composition. In: VANHORN, H. H.; WILCOX, C. J. **Large dairy herd management**. Champaign: American Dairy Science Association, 1992. Cap. 35, p. 336-346,
- BARROS, L. Transtornos metabólicos que afetam a qualidade do leite. In: USO do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. Porto Alegre: UFRGS, 2001. p.46-60
- BAUMAN, D. E. et al. A conjugated linoleic acid supplement containing trans-10, cis-12 reduces milk fat synthesis in lactating sheep. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.89, p.1525–1532, 2006.
- BAUMGARD, L. H.; RHOADS, R. P. Effects of heat stress on postabsorptive metabolism and energetics. **Review of Animal Biosciences**, v. 1, p. 311-333, 2013.
- BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite**: produção, industrialização e análise. 15.ed. São Paulo: Nobel, 1987. 321p.
- BERNABUCCI, B. R.; LACETERA, N.; NARDONE, A. Markers of Oxidative Status in Plasma and Erythrocytes of Transition Dairy Cows During Hot Season. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.85, p.2173–2179, 2002.
- BIRGEL JR., E. H. **Características físico-químicas, celulares e microbiológicas do leite de bovinos das raças Holandesa, Gir e Girolando criados no Estado de São Paulo**. 2006. 335 f. Tese (Doutorado) – Faculdade

de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 31 dez. de 2011. Seção 1, p. 6.

BUENO, V. F. F. et al. Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, p.848- 854, 2005.

CARVALHO, G. F. Milk yield, somatic cell count and physicochemical characteristics of raw milk collected from dairy cows in Minas Gerais State. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DA MASTITE, 2002, Ribeirão Preto. **Anais**. Ribeirão Preto: Fepale, 2002. (CD-ROM)

CASTANHEIRA, M. **Análise multivariada de características que influenciam a tolerância ao calor de equinos, ovinos e bovinos**. 2009. 107f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 2009.

CASTILLO, C. et al. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. **Veterinary Journal**, London, v. 169, p. 286–292, 2005.

CERVANTES, A. P; FERNANDEZ, L; PONCE P. Caracterización de las curvas de lactancia en producción y componentes mayores de la leche en diferentes razas y cruzamientos en las condiciones del trópico mexicano. **Revista de Salud Animal**, La Habana, v.29, p. 49-60, 2006.

CHAVEZ, M.; NEGRI, L.; TAVERNA, M.A. Bovine milk composition parameters affecting the ethanol stability. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.71, p.201-206, 2004.

CHEN, J. J.; YU, B. P. Alteration in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products. **Free Radical Biology Medicine**, v. 17, p. 411–418, 1994.

COLLIER, R. J. et al. Physiological limitations, nutrient partitioning. In: **Yield of farmed species**. Constraints and opportunities in the 21st Century (ed. R Sylvester-Bradley and J Wiseman), pp. 351–377. 2005.

COUDERC, J. J. et al. Silage chop length and hay supplementation on milk yield, chewing activity, and ruminal digestion by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 9, p. 3599–3608, 2006.

COUDERC, J. J. et al. Silage chop length and hay supplementation on milk yield, chewing activity, and ruminal digestion by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 9, p. 3599–3608, 2006.

DU PREEZ, J. H. Parameters for the determination and evaluation of heat stress in dairy cattle in South Africa. **Journal of Veterinary Research**, Indore, v. 67, p. 263 – 271, 2000.

DUARTE, L. M. D. et al. Efeito de Diferentes Fontes de Gordura na Dieta de Vacas Jersey sobre o Consumo, a Produção e a Composição do Leite. **Revista Brasileira Zootecnia**, Viçosa, v. 34, n. 6, p. 2020-2018, 2005.

DUKES, H. H. **Fisiologia dos animais domésticos**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. p.652-658.

DÜRR, J. W. Programa nacional de melhoria da qualidade do leite: uma oportunidade única. In: O COMPROMISSO com a qualidade do leite no Brasil. Passo Fundo: Editora Universidade de Passo Fundo, 2004. p. 38-55.

FISCHER, V. Estresse calórico em vacas leiteiras: efeito sobre o metabolismo e a qualidade de leite. In: SIMPÓSIO NACIONAL DA VACA LEITEIRA, 2014, Porto Alegre. **Anais**. Porto Alegre, 2014. p. 223-235

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

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

FONTANELI, R.S. Fatores que afetam a composição e as características físico-químicas do leite. In: SEMINÁRIO de Bioquímica do Tecido Animal. Porto Alegre: UFRGS, 2001. 25 p. p.10-17

FOX, D. G.; TYLUTKI, T. P. Accounting for the effects of environment on the nutrient requirements of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, p. 3085-3089, 1998.

FREITAS, G. D. **Comparação entre o crescimento de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de Staphylococcus spp. e Klebsiella pneumoniae e a sensibilidade destas cepas ao processo de pasteurização lenta**. 2007. 88 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2007.

FROTA, H. N. et al. Suplementação de lisina e metionina em associação ou não com o óleo de soja na dieta de vacas leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.66, n.4, p.1121-1128, 2014.

GASTALDI, K. A. Produção “in vitro” de metano, dióxido de carbono e oxigênio utilizando líquido ruminal de bovinos alimentados com diferentes rações. 2008. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

GONZÁLEZ, F. H. D.; CAMPOS, R. Indicadores Metabólico-Nutricionais do Leite. In: SIMPÓSIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA DA REGIÃO SUL DO BRASIL, 2003, Porto Alegre, RS. **Anais do...** Porto Alegre, 2003. p. 70-91

GONZÁLEZ, F. H. D.; DÜRR, J. W.; FONTANELI, R. S. (Ed.). Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. Passo Fundo. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, p.58-68, 2001.

GONZÁLEZ, F. H. D.; DÜRR, J. W.; FONTANELI, R. S. **Uso do leite para monitorar a nutrição e metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2001. p. 77

HALLIWELL, B.; CHIRICO, C. E. Oxygen-derived Species: Their relation to human disease and environmental stress. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 102, p. 5-12, 1994.

HEAD, H. H. The strategic use of the physiological potential of the dairy cow. In: SIMPÓSIO LEITE NOS TRÓPICOS, 1989, Botucatu. **Anais**. Botucatu, 1989. p. 38-89.

IGONO, M. O.; BJOTDEDT, G., STANFORD-CRANE, H.T. Environmental profile and critical temperature effects on milk production of Holstein cows in desert climate. **Internacional Journal of Biometeorology**, New York, v.36, p.77-87, 1992.

KADZERE, C.T. et al. Heat stress in lactating dairy cows: a review. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 77, p. 59-91, 2002.

KARGAR, S. et al. Lactational performance and milk fatty acid profile of Holstein cows in response to dietary fat supplements and forage: Concentrate ratio. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 150, p. 274–283, 2012.

KUMAGAI, A. et al. Xanthine oxidase inhibitors suppress testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 118-123, 2002.

LAFFARANCHI, A. et al. Etiologia das Infecções Intramamárias em Vacas Primíparas ao Longo dos Primeiros Quatro Meses de Lactação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36. p1027- 1032, 2006.

LE RUYET, P.; TUCKER, W.B. Ruminal buffers: temporal effects on buffering capacity and pH of ruminal fluid from cows feed a hight concentrate diet. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 65. p. 161, 1992.

LIMA, J. A. M. et al. Efeito do aumento da frequência de ordenhas no início da lactação sobre produção, composição do leite e características reprodutivas de vacas mestiças Holandês-Zebu. Arquivo **Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 63, n. 5, p.1160-1166, 2011.

LOPES, L. C. Composição e Características Físico-químicas do Leite Instável Não Ácido (LINA) na Região de Casa Branca Estado de São Paulo. 2008. 64p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de pós-graduação em Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

LÓPEZ, J. Uréia em rações para produção de leite. In: URÉIA PARA RUMINANTES, 1984, Piracicaba. **Anais**. Piracicaba, 1984. p.171-194

MARQUES, L. T.; FISCHER, V.; ZANELA, M. B. Produção leiteira, composição do leite e perfil bioquímico sanguíneo de vacas lactantes sob suplementação com sal aniônico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, p. 1088-1094, 2011.

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 Agrociência**, Pelotas, v. 13, n. 1, p.91-97, 2007.

MAYER, L.R.R. et al. Rações com diferentes teores de proteína degradada no rúmen para vacas em lactação. 1. Consumo, produção e composição do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.26, n.4, p.813-823, 1997.

MILLER, J. K.; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E. E.; MADSEN, F. C. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, p. 2812–2823, 1993.

MOLINA, L. H. et al. Correlacion entre la termoestabilidad y prueba de alcohol de la leche a nivel de un centro de acopio lechero. **Archivos de Medicina Veterinária**, Valdivia, v. 33, n. 2, p. 8-11 2001.

MOURA, A. M. **Milho diferindo no processamento para vacas leiteiras em pastejo**. 2013. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

MÜHLBACH, P. R. F. **Produção e manejo de bovinos de leite**. Porto Alegre: UFRGS, 2004.119p.

MULLER, C.J.C; BOTHA, J.A; SMITH, W.W. Effect of shade on various parameters of Friesian cows in Mediterraneo climate in South Africa. Fed an water intake, milk production an milk composition. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 24, p. 49 – 55, 1994.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition. **Nutrient requirements of dairy cattle**. Washington, DC: National Academy Press, 2001. 381p.

NEGRI, L.; CHAVEZ, M.; TAVERNA, M. Determinación de las variables que afectan la estabilidad térmica de la leche utilizando un método capilar para evaluar el tiempo de coagulación por calor. **Revista Argentina de Lactología**, Santa Fé, n. 22, p.33-44, 2003.

NORO, G. **Fatores que afetam a produção e a qualidade do leite em rebanhos ligados a cooperativas gaúchas**. 92 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 2004.

NORO, G.; GONZÁLEZ, F. H. D.; CAMPOS, R.. 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**, Viçosa, v. 35, n. 3, p.1129-1135, 2006.

NORO, G. 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**, Viçosa, v.35, n.3, p.1129-1135, 2006.

OLIVEIRA, R. P. S. **Condições microbiológicas e avaliação da pasteurização em amostras de leite comercializadas no município de Piracicaba- SP**. 2005. 81 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós - Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2005.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiationinduced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and biophysical research communications** , New York, v.123, p. 291-298, 1984.

PALMQUIST, D.L.; BEAULIEU, A.D.; BARBANO, D.M. Feed and animal factors influencing milk fat composition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.76, p.1753- 1771, 1993.

PEDROSO, A. M. **Como a nutrição afeta a proteína do leite - parte 1.** Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br>. Acesso em: 22/02/2015.

PERES, J. R. O leite como ferramenta do monitoramento nutricional. In: USO do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. Porto Alegre: UFRGS, 2001. p. 30-45.

PIMENTEL, L. R. et al. Inclusão da glicerina bruta na dieta de vacas da raça Holandesa sobre o consumo, produção e composição do leite. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 3, p. 1439-1446, 2014.

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

QUEIROGA, R. C. R. E. et al. Influência do manejo do rebanho, das condições higiênicas da ordenha e da fase de lactação na composição química do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.36, n.2, p.430-437, 2007.

RIBEIRO, C. V. M. et al. Substituição do grão de milho pelo milheto (*Pennisetum americanum*) na dieta de vacas holandesas em lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.35, n.5, p.1351- 1359, 2004.

RICO, D. E. et al. The effect of rumen digesta inoculation on the time course of recovery from classical diet-induced milk fat depression in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, p.3752-3760, 2014.

ROBINSON, P.H. et al. Influence of rumen undegradable protein levels on feed intake and milk production of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.74, n.5, p.1623-1631, 1991.

ROCHA FILHO, R. R. **Efeitos da polpa de cítrus e do milho sobre Itens ruminais**. 1998. 71p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1998.

RODAS, A. C. et al. Monitoramento na qualidade do leite "in natura" obtidos por diferentes tipos de manejo em Pereira Barreto-SP. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 54, p.19-29, 2000.

RODRIGUEZ, L. A. et al. Effects of relative humidity, maximum and minimum temperature, pregnancy and stage of lactation milk composition and yield. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.68, p.973-978, 1985.

RODRIGUEZ, R.H. Composição do leite: uma perspectiva desde o trópico. In: QUALIDADE do leite bovino, variações no trópico e no subtropical. Passo Fundo: Ed. Universidade de Passo Fundo, 2011. p. 115-140

ROSE, D. Variation in the heat stability and composition of milk from individual cows during lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, n. 44, p. 430-441, 1961.

RULQUIN, H.; PSULEWISKI, P.M.; VÉRITÉ, R. Milk production and composition as a function of postruminal lysine and methionine supply: a nutrient response approach. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 37, p. 69-90, 1993.

RUSSELL, J. B.; CHOW, J. M. Another theory for the action of ruminal buffers salts: decreased fermentation and propionate production. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.76, p. 826-830, 1993.

SABEDOT, M. A. et al. Isolamento de bactérias causadoras de mastite subclínica e correlação entre qualidade físicoquímica do leite e contagem de células somáticas. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, Umuarama, v. 1, n. 2, p. 99-106, 2014.

SAN EMETERIO, F. et al. Effect of coarse or fine grinding on utilization of dry or ensiled corn by lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 12, p. 2839-2848, 2000.

SANCANARI, J. B. D.; EZEQUIEL, J. M. B.; GALATI, R. L. Efeito da Metionina Protegida e Não Protegida da Degradação Ruminal sobre a Produção e Composição do Leite de Vacas Holandesas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.30, n.1, p.286-294, 2001.

SCHAELLIBAUM, M. Efeitos de altas concentrações de células somáticas sobre a produção e qualidade de queijos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 2, 2000, Curitiba. **Anais**. Curitiba, 2000. p. 21-26

SCHWAB, C.G.; BOZAK, C. K.; MESBAH, M. M. Amino acid limitation and flow to duodenum at four stages of lactation. 1. Sequence of lysine and methionine limitation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.75, n. 12, p.3486-3502, 1992.

SEVI, A.; CAROPRESE, M. Impact of heat stress on milk production, 59 immunity and udder health in sheep: A critical review. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 107, p. 1-7, 2012.

SIES, H. **Oxidative stress**: oxidants and antioxidants. San Diego, CA.: Academic Press, 1991.

SILANIKOVE, N. Acute heat stress brings down milk secretion in dairy cows by up-regulating the activity of the milk-borne negative feedback regulatory system. **BMC Physiology**, London, v. 9, n.13, p 1-9. 2009.

SILVA, M. R. H.; NEUMANN, M. Fibra efetiva e fibra fisicamente efetiva: conceitos e importância na nutrição de ruminantes. **FAZU**, Uberaba, n.9, p. 69-84, 2012.

SILVA, P. H. F. **Leite UHT: fatores determinantes para sedimentação e gelificação**. Juiz de Fora: Templo Gráfica e Editora, 2004. 128p.

SILVA, R. M. N. et al. Uréia para vacas em lactação. 1. Consumo, digestibilidade, produção e composição do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.30, n. 5, p.1639-1649, 2001.

SINGH H.; CREAMER L. K. Heat stability of milk. In: **ADVANCED dairy chemistry**. 1. proteins. London: Elsevier, 1992. p. 621-656

SINGH, H. Heat Stability of Milk. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 57, n. 2/3, p.111-119, 2004.

SMITH, D. L. et al. Short communication: comparison of the effects of heat stress on milk and component yields and somatic cell score in Holstein and Jersey COWS. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 96, n. 5, p. 3028-303, 2013.

SOBERÓN, F.; LUKAS, J. L.; VAN AMBURGH, M. E. Effects of increased milking frequency on metabolism and mammary cell proliferation in Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.93, p. 565-573, 2010.

SOUTO, L. I. M. **Associação entre o índice de mastite em rebanhos bovinos leiteiros e a qualidade microbiológica do leite cru no Estado de São Paulo**. 2006. 85 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SOUZA, B. B. et al. Efeito da suplementação de cloreto de potássio na dieta sobre o equilíbrio ácido básico no desempenho de frangos de corte no verão. **Ciência e Agrotécologia**, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1297- 1304, 2002.

SPEIT, G. et al. Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 88, p. 91-98, 1996.

STELWAGEN, K. Effect of milking frequency on mammary functioning and shape of the lactation curve. **Journal of Dairy Science**, Champaign, p. 204-211, 2001.

STUMPF, M. T.; FISCHER, V; MCMANUS, C. M. Severe feed restriction increases permeability of mammary gland cell tight junctions and reduces ethanol stability of milk. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 7, p. 1137-1142, 2013.

SUTTON, J. D. Altering milk composition by feeding. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 72, p. 2801-2814, 1989.

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**, Cambridge, v. 48, p. 163-166, 1981.

TAFFAREL, L. E. et al. Impactos de diferentes sistemas de ordenha sobre a contagem bacteriana do leite. **XX Congresso Brasileiro de Zootecnia**, p. 4-5 2010.

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

TREVISAN, M. et al. Correlates of markers of oxidative status in the general population. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 154, p. 348–356, 2001.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção e qualidade do leite**. Santa Maria: Ed. Da UFSM, 2003. 192p.

VAN BOEKEL, M. A. J. S. Mechanisms of heat coagulation of milk products. v.3 n.2, p. 205-215, 1993.

VARGAS, L. H. et al. Adição de lipídios na ração de vacas leiteiras: parâmetros fermentativos ruminais, produção e composição do leite. . **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.31, n.1, p.522- 529, 2002.

VENDEMIALE, G. et al. Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status. **Hepatology**, Baltimore, v. 33, p. 808–815, 2001.

VILLELA, S.D.J. et al. Carço de algodão para vacas leiteiras. 1. Consumo de nutrientes, produção e composição do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 25, n.2, p. 301-302. 1996.

VILLENEUVE, M. P. et al. Milk volatile organic compounds and fatty acid profile in cows fed timothy as hay, pasture, or silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 96, n. 11, p. 7181-94, 2013.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. Dairy Technology: principles of milk properties and processes. **Food Science and Technology**, Chichester, v. 727, p. 127-129 1999.

WEST, J. W.; MULLINIX, B. G.; BERNARD, J. K. Effects of hot, humid weather on milk temperature, dry matter intake, and milk yield of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, p. 232–242, 2003.

WHEELOCK, J. B. et al. Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, p. 644–55, 2010.

WIN, S. K.; UEDA, K.; KONDO, S. Effect of grass hay proportion in a corn silage-based diet on rumen digesta kinetics and digestibility in dairy cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.80, p. 1344-1352 2015.

WU, Z.; SATTER, L. D. Milk production during the complete lactation of dairy cows fed diets containing different amounts of protein. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.38, p.1042-1051, 2000.

YAMAZI, Y.; KOZIMA, T.; SHIBA, T.; ISHIZEKI, T.; HATTA, S.; Studies on pathogenic halophiles. Salt requirements for growth and survival. **Journal of Microbiology**, v. 3,n.1, p. 33–38, 2013.

YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A. Effects of physically effective fiber on digestion and milk production by dairy cows fed diets based on corn silage, **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. 1090-1098, 2005.

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**, Belo Horizonte, v.61, n.4, p.1009-1013, 2009.

CAPÍTULO II

Perfil das propriedades leiteiras das regiões do Extremo Oeste e Sul do estado de Santa Catarina³

³ Artigo escrito de acordo com as normas da Agricultural Systems

Perfil das propriedades leiteiras das regiões do Extremo Oeste e Sul do estado de Santa Catarina

Profile of dairy farms of the extreme west and south regions of Santa Catarina State

Resumo

Nos últimos dez anos a produção brasileira cresceu em média 4,1% ao ano, enquanto Santa Catarina apresentou um aumento de 8,6%, indicando o seu potencial como polo leiteiro. Objetivou-se caracterizar as unidades de produção leiteira de duas regiões do Estado de Santa Catarina, com o intuito de analisar os produtores de leite quanto ao rebanho, à infraestrutura para ordenha e conservação do leite, estratégias de alimentação e características físico-químicas do leite. Foram aplicados questionários aos produtores e realizadas coletas mensais de leite em duas regiões de Santa Catarina (Oeste e Sul) durante 11 meses, totalizando 1034 observações. As características das unidades produtoras de leite foram submetidas à análise descritiva. Os atributos médios do leite e das unidades produtoras de leite foram submetidos à análise de descritiva e multivariada. Houve associação positiva e forte para as regiões oeste e sul entre as características ligadas à infra-estrutura e escala de produção, a área total da UPL, as áreas destinadas ao cultivo de forrageiras no verão e no inverno e à silagem, número total de animais e número de vacas em lactação. Essas características foram relacionadas positivamente na região oeste com os atributos do leite tais como teor de proteína, estabilidade no teste

do álcool e acidez titulável, CCS e volume de produção, enquanto que na região sul essas características foram relacionadas positivamente com a área destinada ao cultivo para silagem, ao uso de concentrado comercial e à estabilidade no teste do álcool, por outro lado, a relação entre gordura e proteína do leite, o uso de concentrado comercial foram associados negativamente com as características ligadas à infra-estrutura e escala de produção para a região oeste. Em relação às práticas de ordenha, UPL da região oeste com ordenha canalizada foram associadas com a prática do pré-dipping e apresentaram menores valores de CBT, na região sul, as amostras com elevados valores de CBT apresentaram maiores valores de acidez titulável e menores valores de estabilidade, gordura e relação gordura e proteína lácteos. Houve pouca variabilidade em relação aos teores médios de lactose, proteína e CCS. Conclui-se que a variabilidade entre as UPLs dentro de cada região foi principalmente relacionada às características de área total e de cultivo de alimentos, número de animais total e em lactação e teor de gordura. A composição química do leite (gordura e proteína) e a CCS variam quase que independentemente das características relacionadas à infra-estrutura e escala de produção.

Palavras-chave: qualidade do leite, nível de produção leiteira, categorias de rebanho leiteiro

Abstract

Over the past decade Brazilian milk production increased on average 4.1% per year, while Santa Catarina increased by 8.6%, indicating its potential as a dairy producer. This study aimed to characterize the dairy farms in two regions of the State of Santa Catarina, in order to evaluate the aspects related to the dairy farmers as of the herd, total area, milking parlour and cooling of milk, feeding strategies and physicochemical characteristics chemical traits. Questionnaires were applied to producers and milk samples were collected monthly in two regions of Santa Catarina (West and South) for 11 months, totaling 1034 observations. The characteristics of the dairy farms were submitted to descriptive analysis and the average milk attributes and dairy farms traits were subjected to multivariate analysis. There was a positive and strong association to the west and south between the traits of infrastructure and production scale, the total area of the UPL, the areas intended for fodder cultivation in summer and winter and silage, total number of animals and number of dairy cows. These characteristics were positively related in the western region with attributes such as milk protein, stability and alcohol test acidity, CCS and volume production, while in the southern region these characteristics were positively related to the area devoted to cultivation for silage, the use of commercial concentrate and the stability in alcohol of the test, on the other hand, the relationship between fat and milk protein, the use of commercial concentrate was negatively associated with the traits of infrastructure and production scale for west region. Regarding milking practices, UPL's western region with piped milking were associated with the practice of

pre-dipping and CBT had lower values in the southern region, samples with high values CBT had higher titratable acidity values and lower values stability, fat and fat ratio and dairy protein. There was little variability in relation to average levels of lactose, protein and CCS. It follows that the variability between UPLs within each region was mainly related to the total area features and growing food, and the total number of animals in milk and fat content. The chemical composition of milk (fat and protein) and CCS vary almost independently of the characteristics related to infrastructure and production scale.

Keywords: milk quality, milk production level, dairy herd categories

Introdução

Nos últimos dez anos observou-se um crescimento acentuado da produção leiteira nos estados do Sul do país, com destaque para o estado de Santa Catarina (EPAGRI, 2014). O perfil das propriedades leiteiras de Santa Catarina baseia-se no modelo de agricultura familiar, sendo a maioria dos estabelecimentos com áreas de até 50 hectares, os quais são responsáveis por 83% da produção leiteira (ICEPA, 2011). A atividade leiteira é economicamente importante em pequenas propriedades (até 15 hectares), onde se configura como primeira ou segunda atividade de maior geração de renda (Marcondes, 2005).

A qualidade do leite produzido no Brasil merece atenção por parte de toda a cadeia produtiva do leite, pois ainda apresenta problemas como elevada

contagem bacteriana total (CBT) e de contagem de células somáticas (CCS) e baixos teores de sólidos. O problema é maior em relação à CBT, que é uma medida direta da contaminação do leite, responsável pelas maiores não conformidades com o padrão estabelecido pela IN-62 (BRASIL, 2011). A melhoria da qualidade do leite no Brasil é imprescindível para ser competitivo no mercado nacional e internacional (Nero et al., 2009; Muller Filho et al., 2010; Siqueira et al., 2010).

As principais características que definem os sistemas de produção são a estrutura das propriedades e o volume de produção de leite (Smith et al., 2002; Fernandes et al., 2004; Wagner et al., 2004; Lopes et al., 2005, García et al., 2012), o tipo de alimentação utilizado na propriedade para exploração leiteira (Chatellier et al., 2008; Reiber et al., 2012), a utilização de tecnologia e o manejo da ordenha (Khanal et al., 2010) e o planejamento empresarial das propriedades e da atividade leiteira (Hansson e Ferguson, 2011).

No Sul do Rio Grande do Sul, Gabbi et al. (2013) mostraram a predominância de unidades produtivas pequenas em área, rebanho e produção leiteira, mão de obra familiar, o uso de várias alternativas alimentares, com amplo uso de suplementação em animais mantidos em pastejo ou semi-confinados, porém as características dos sistemas de produção não foram associadas com a composição do leite. No entanto, esses dados se referem há mais de uma década, no início da implementação do Programa Nacional de Qualidade do Leite. Informações sobre a caracterização dos sistemas de produção leiteiros após esse período são, portanto, necessárias.

Neste trabalho, objetivou-se traçar um perfil das propriedades de duas regiões do Estado de Santa Catarina, com o intuito de avaliar as unidades de produção leiteira quanto ao rebanho, a infra-estrutura de ordenha e conservação do leite, estratégias de alimentação e características físico-químicas do leite.

1. Material e Métodos

Os presentes levantamentos de dados foram obtidos junto aos produtores vinculados aos laticínios das regiões Oeste e Sul de Santa Catarina, com a sua anuência e a aprovação da Comissão de Pesquisa do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Cento e dez unidades produtoras de leite (UPL), 51 e 59 UPLs distribuídas nas regiões Oeste e Sul de Santa Catarina, respectivamente, foram escolhidas aleatoriamente. A característica comum destas propriedades dentro de cada região é que pertenciam à mesma bacia leiteira e vendiam o leite para a mesma indústria laticinista. Os dados relativos à infra-estrutura das UPLs, alimentos usados, manejo da ordenha e conservação do leite foram obtidos com a aplicação de questionários aos produtores e posterior análise. Os dados utilizados da região oeste referem-se ao período de agosto de 2010 a maio de 2011, enquanto os dados usados da região sul referem-se ao período de agosto de 2013 a abril de 2014. Os seguintes indicadores foram usados: estrutura e descrição das propriedades (área total e de pastagens, produção mensal de leite, número de vacas em lactação, produção de leite/vaca/dia, raças

existentes na propriedade, modelo de produção (patronal ou familiar), fonte de água (poço, fonte protegida ou água tratada), energia elétrica (mono, bi e trifásica), estratégias de alimentação (área de pastagem de verão, área de pastagem de inverno, área destinada ao cultivo para silagem, uso de concentrado comercial ou caseira, tipo de pastagem, uso de sal mineral, utilização de alimentos conservados), composição físico-química do leite (teores de proteína, de gordura e de sólidos do leite, densidade, acidez titulável e mensurável, crioscopia, teor de cálcio e tempo de coagulação no tanque (TCT), estabilidade do leite pelo teste de álcool, CCS e CBT; manejo de ordenha: (ordenha mecânica ou balde ao pé, secagem dos tetos, utilização de *dipping*, frequência do uso de testes para detecção de mastite clínica (caneca de fundo preto) e de mastite subclínica (California Mastitis Test - CMT), e sistema de resfriamento).

As amostras de leite foram coletadas mensalmente do período de agosto de 2010 a maio de 2011 (oeste) e agosto de 2013 a abril de 2014, com um total de 1034 observações. Essas amostras (400 mL) foram divididas em duas alíquotas. Na primeira foram realizadas as seguintes determinações: crioscopia; acidez titulável: utilizou-se titulação com solução de hidróxido de sódio, a técnica de Dornic (Tronco, 2003); acidez mensurável (pH): a determinação do potencial hidrogeniônico foi feita com um potenciômetro da Hanna (Órdoñez et al., 2005); estabilidade no teste do álcool: esse teste foi feito misturando 2 mL de leite com 2 mL de solução aquosa com concentrações de etanol de 68 a 80% v/v em intervalos de duas unidades percentuais (Tronco, 2003). O TCT foi avaliado com a colocação do leite em um capilar de vidro com

120 mm de comprimento, 0,15 mm de diâmetro externo e 0,08 mm de diâmetro interno, o qual foi fechado nas duas pontas. Manteve-se um espaço médio de 1 cm entre a amostra e as extremidades. Os capilares foram imersos em glicerina aquecida e mantida a 145 °C. O TCT foi o tempo necessário para a detecção visual de grumos dentro do capilar (Negri, 2003). Foi determinada a concentração de cálcio iônico usando eletrodos seletivos Orion. A densidade foi avaliada com o uso do termolactodensímetro.

A segunda alíquota de leite de cada amostra foi encaminhada ao laboratório da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa em Curitiba – PR para realizar as seguintes análises: gordura, proteína, sólidos totais, lactose, usando o método de espectrofotometria por radiação infra-vermelho (Fonseca e Santos, 2000) CCS e CBT pelo método de contagem eletrônica por citometria de fluxo. As amostras para composição do leite e CCS foram coletadas em frascos contendo o conservante bronopol e para CBT em frascos contendo azidiol.

2.1 Análise estatística

As características das UPLs foram submetidas à análise descritiva. Os dados qualitativos obtidos foram transformados numericamente e estão descritos na Tabela 5.

Tabela 1 – Escore numérico de variáveis qualitativas no levantamento de propriedades rurais do Extremo Oeste catarinense, Brasil.

VARIÁVEL ORIGINAL	ESCORE NUMÉRICO
Raça	1 = raça Holandês 2= mestiço Holandês x Jersey e 3= Jersey
Concentrado	0 = fabricação caseira; 1 = fabricação comercial
Tipo de ordenha	0 = balde ao pé; 1 = canalizada
Dipping	0 = não realiza dipping; 1 = faz dipping
Frequência dos testes CMT e da caneca de fundo preto	1 = após cada ordenha; 2 = semanal 3= quinzenal; 4 = mensal; 5 = bimestral, 10 = não realiza

Todos os procedimentos estatísticos foram realizados com o uso do programa estatístico SAS for Windows versão 9.3 (SAS Institute, Cary, North Caroline, USA, 2002). As frequências de todos os atributos (PROC FREQ) foram calculadas e as que apresentaram percentagem cumulativa maior que 90% em uma das classes, foram excluídas da análise por não apresentarem características discriminativas. A análise dos fatores principais (PROC FACTOR) foi feita usando o método α , separadamente por região. O ordenamento das variáveis originais foi feito a partir dos procedimentos (PROC DISCRIM e PROC STEPDISC). A relação entre as variáveis originais e o agrupamento das observações levantadas foi realizada a partir da análise canônica dos dados (PROC CANDISC). O agrupamento das observações

analisadas deu-se pelo PROC FASTCLUS (com a opção da formação de três *clusters* e número máximo de iterações igual a 10) e PROC CLUSTER. No mesmo procedimento PROC FASTCLUS, usou-se a opção NOMISS, para que dados inexistentes nas observações tomadas fossem desconsiderados. A comparação das médias dos agrupamentos formados foi feita com a análise multivariada (MANOVA) usando o PROC GLM. As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, com 5 % de significância.

Resultados

Descrição das UPLs - região oeste

Das 51 propriedades, 47,1% produziram até 6.000 litros de leite por mês (2000 a 17000 L/mês), 76,5% possuíam até 25 ha de área total (7 a 62 ha), 60,8% possuíam até 20 vacas em lactação (8 a 36), 25% usaram animais da raça Holandês, 15,7% animais da raça Jersey e 56,9% possuíam animais de ambas as raças, 55% usaram concentrado comercial e 35% possuíam sistema de ordenha canalizado. As forrageiras mais usadas no verão foram capim pioneiro (84,3%), capim Sudão (82,4%), capim missioneiro (41,2%) e Tifton (33%), enquanto no inverno as forrageiras mais usadas foram o azevem anual (96%) e aveia (100%). Em relação às práticas de ordenha, 98% dos produtores lavaram e secaram os tetos, 47% usaram pré dipping, 84,3% usaram pos dipping, 62,8% usaram o teste CMT para detecção de mastite subclínica enquanto 37,3% usaram o teste da caneca para detecção da mastite clínica. O leite foi resfriado a granel (94%). Acima de 90% das UPLs usaram tratamento

da mastite no momento da secagem e foram classificadas como produção familiar.

Em relação à média anual dos atributos do leite, a contagem bacteriana total foi inferior a 100.000 UFC/ mL de leite em 21,6% das amostras de leite, porém a contagem de células somáticas superou 400.000 células/ mL de leite em 82% das amostras. Quanto à estabilidade do leite, 92% das amostras foram estáveis ao etanol acima de 72%. Os valores médios de proteína e lactose foram todos acima de 2,9 e 3%, respectivamente, porém 72,6 das UPL produziram leite com menos de 4,5% de lactose.

Descrição das UPLs – região sul

Das 59 propriedades, 15,3% produziram até 6.000 litros de leite por mês (2500 a 26000 l/mês), 62,7% possuíam até 25 ha de área total (8 a 76 ha), 64,4% possuíam até 20 vacas em lactação (7 a 58), 100% usaram animais raça Jersey, 3,4% usaram concentrado comercial e 91,5% possuíam sistema de ordenha canalizado. As forrageiras mais usadas no verão foram capim angolinha (74,6%), capim aruana (61%) e Tifton (35,6%, enquanto no inverno a forrageira mais usada foi o azevem anual (86%). Em relação às práticas de ordenha, acima de 90% dos produtores lavaram e secaram os tetos, 56,9% usaram pré dipping, 67,2% usaram pos dipping, 32,8% usaram o teste CMT para detecção de mastite subclínica enquanto 10,3% usaram o teste da caneca para detecção da mastite clínica. O leite foi resfriado a granel (93%). Acima de 88% das UPLs usaram tratamento da mastite no momento da secagem e 10% delas foram classificadas como produção familiar.

A contagem bacteriana total foi inferior a 100.000 UFC/ mL de leite em 49,2% das amostras de leite, porém a contagem de células somáticas superou 400.000 células/ mL de leite em 30,5% das amostras. Quanto à estabilidade do leite, 93% das amostras foram estáveis ao etanol acima de 72%. Os valores médios de proteína e lactose foram todos acima de 2,9 e 3%, respectivamente, porém 89,3 das UPL produziram leite com menos de 4,5% de lactose.

Análise multivariada – região oeste

Os cinco primeiros fatores principais corresponderam a 74,5% da variância acumulada dos dados. O primeiro fator principal, com 31,1% da variância, correspondeu principalmente aos atributos ligados à escala de produção como área total, área plantada no inverno e verão, número de vacas em lactação e número total de animais. O segundo fator principal, com 17,6% da variância foi influenciado principalmente pelos teores de gordura, proteína do leite e relação desses. O terceiro fator principal, 11,4% da variância, foi relacionado à produção diária de leite da UPL e à acidez do leite, enquanto quarto e quinto fatores principais explicaram, respectivamente 8 e 6,5% da variância e foram relacionados, respectivamente, à contagem bacteriana total e tipo de concentrado usado (Figura 1).

Houve associação positiva e forte entre as características ligadas à infra-estrutura e escala de produção, a área total da UPL, as áreas destinadas ao cultivo de forrageiras no verão e no inverno e à silagem, número total de animais e número de vacas em lactação. Essas características foram

relacionadas positivamente com os atributos do leite tais como teor de proteína, estabilidade no teste do álcool e acidez titulável, CCS e volume de produção. Por outro lado, a relação entre gordura e proteína do leite, o uso de concentrado comercial foram associados negativamente com as características ligadas à infra-estrutura e escala de produção.

Secundariamente a produção diária de leite da UPL foi associada negativamente com os teores de proteína e gordura do leite assim como com a relação entre gordura e proteína. Parte das UPL com maior número total de animais, vacas em lactação e área destinada ao cultivo de silagem não apresentavam maiores áreas total e de pastagem, indicando o uso de sistemas confinados e semi-confinados.

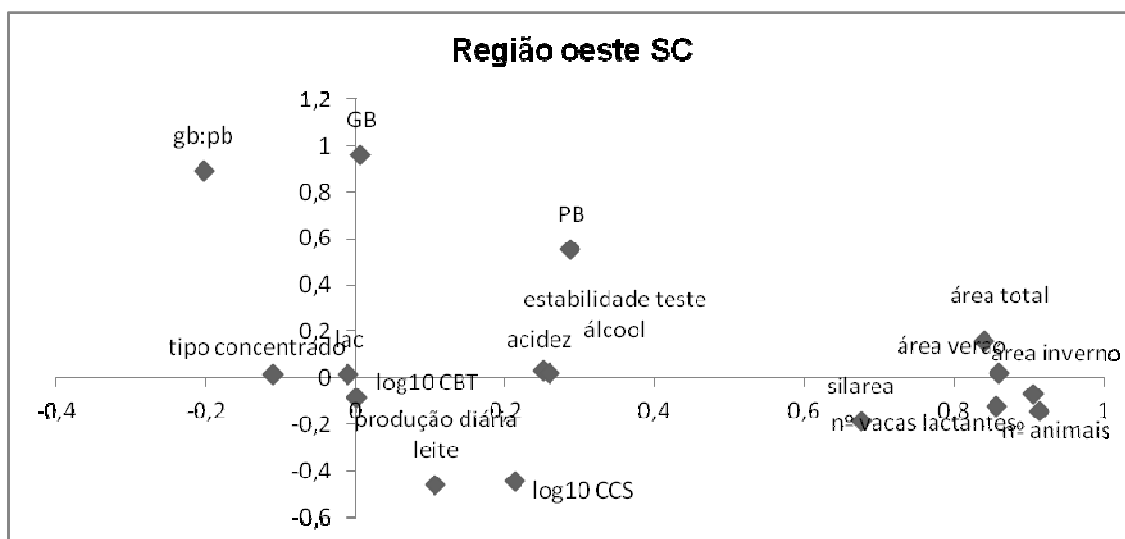


Figura 1 - Plano ortogonal com fatores principais de levantamento de produção leiteira no Extremo Oeste de Santa Catarina, Brasil

Gb =teor de gordura do leite, PB = teor de gordura do leite, gbpb = relação entre gordura e proteína do leite, log10 CBT = log10 contagem bacteriana total,

\log_{10} CCS = \log_{10} da contagem de células somáticas, lac = teor de lactose do leite, silarea = área destinada ao cultivo para silagem, área verão = área destinada ao cultivo de pastagem no verão, área inverno = área destinada ao cultivo de pastagem no inverno.

Em relação às práticas de ordenha, UPL com ordenha canalizada foram associadas com a prática do pré-dipping e apresentaram menores valores de CBT e intervalos de dias para uso dos testes de detecção de mastite clínica e subclínica. UPLs que adotaram o uso do pós dipping estiveram associadas aos maiores teores de lactose, e foram negativamente relacionadas aos valores de CCS e à CBT. O tipo de ordenha (canalizado ou balde ao pé) não foi relacionado à CCS.

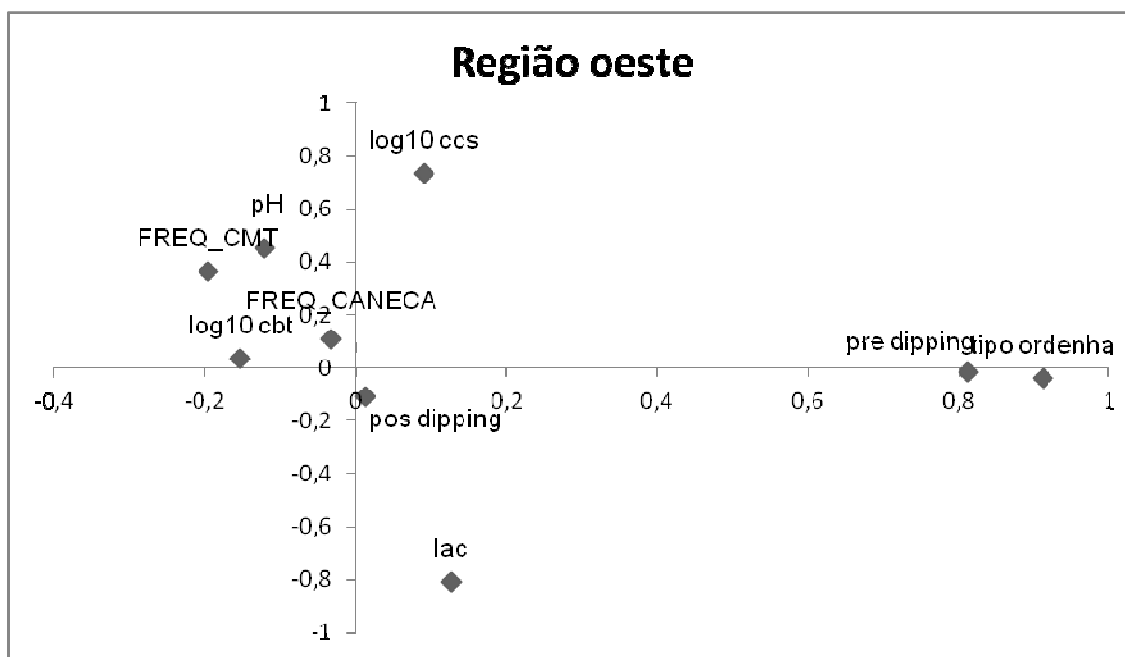


Figura 2 - Plano ortogonal com fatores principais sobre aspectos do manejo de ordenha nas unidades de produção leiteira no Extremo Oeste de Santa Catarina, Brasil

As UPLs puderam ser classificadas em quatro grupos, com 8, 22, 18 e 3 observações. Os atributos mais determinantes para essa classificação foram a produção de leite diária, acidez titulável e teor de lactose do leite (Tabela 2).

Tabela 2 - Coeficiente de determinação, probabilidade F e probabilidade do quadrado médio da correlação canônica (QMCC) dos atributos para classificação dos agrupamentos em análise discriminante.

Atributo para classificação	R ² parcial	P > F	P > QMCC
Produção de leite (L/dia)	0,92	<0,0001	<0,0001
Acidez titulável do leite (°D)	0,26	0,0033	<0,0001
Teor de lactose (%)	0,12	0,1119	<0,0001

A comparação entre os agrupamentos de UPLs mostra que houve diferenças em relação à produção diária de leite, aos valores de acidez titulável, teor de gordura do leite, proporção de gordura e proteína do leite, área cultivada com forrageiras no verão

Tabela 3 - Valores médios dos atributos de infra-estrutura e escala de produção das UPLs e das características do leite e seus desvios padrão de acordo com o seu agrupamento

Atributo	Agrupamento				P<F	RSME
	1	2	3	4		
Área total (ha)	23,3	20,6	20,4	27,7	ns	13,2
Área cultivo verão (ha)	6,2	5,1	5,1	6	ns	2,7
Área cultivo inverno (ha)	7,5	5,9	6,8	10	ns	3,2
Área cultivo silagem (ha)	8,4	5,9	5,8	10,3	ns	4,0
Nº animais	36	31	35	51	ns	13,8
Nº vacas lactantes	21	19	22	27	ns	8,1
Produção leite (L/dia)	436 b	134 d	252 c	533 a	****	38,0
Espécies forrageiras verão (nº)	2,6 b	3 ab	2,9 b	4,3 a	*	0,9
Espécies forrageiras inverno (nº)	2	2	1,9	2	ns	0,2
Uso de silagem ¹	1	1	1	1	ns	0,1
Tipo de concentrado ²	0,8	0,5	0,4	0,7	ns	0,5
Tipo de sala de odenha ³	0,5	0,2	0,4	0,7	ns	0,5
Uso pré dipping ¹	0,5	0,4	0,5	0,7	ns	0,5
Uso pos dipping ¹	0,8 b	1,0 ab	0,8 ab	0,3 a	*	0,3
Intervalo uso teste mastite clínica ⁵	5,0	5,8	5,8	5,3	ns	3,36
Intervalo uso teste	4,4	7,6	7,3	5,0	ns	4,2

mastite sub clínica ⁵						
Acidez titulável (°D)	16,1 b	15,8 b	16,3 b	19,0 a	****	1,0
Log10 CBT	5,4	5,4	5,6	5,4	ns	0,5
Log10 CCS	5,8	5,7	5,8	5,8	ns	0,2
Gordura bruta (%)	3,8 b	4,1 a	3,9 ab	3,8 ab	*	0,3
Proteína bruta (%)	3,2	3,2	3,2	3,3	ns	0,1
Lactose (%)	4,5	4,5	4,4	4,4	ns	0,1
GB:PB	1,2 b	1,3 a	1,2 ab	1,2 b	**	0,1

**** P<0,0001 *** P<0,001 ** P<0,01 * P,0,05 t P,0,10 NS P>0,10

¹ 0 = não, 1 = sim, ² 0 = caseiro 1 = comercial, ³ 0 = balde ao pé 1 = canalizada

⁴ proporção gordura:proteína no leite, ⁵ intervalos realização testes mastite: 1 = após cada ordenha; 2 = semanal 3= quinzenal; 4 = mensal; 5 = bimestral, 10 = não realiza

Análise multivariada – região sul

Os seis primeiros fatores principais corresponderam a 76,5% da variância acumulada dos dados. O primeiro fator principal, com 27,8% da variância, correspondeu principalmente aos atributos ligados à escala de produção como área total, área plantada no inverno e verão, número de vacas em lactação, número total de animais e produtividade. O segundo fator principal, com 14,2% da variância foi influenciado principalmente pelos teores de gordura e relação desses. O terceiro fator principal, 10,4% da variância, foi relacionado à CBT, enquanto quarto e quinto fatores principais explicaram,

respectivamente 8,2 e 7% da variância e foram relacionados, respectivamente, à tipo de concentrado usado e ao teor de lactose do leite (Figura 3).

Houve associação positiva e forte entre as características ligadas à infra-estrutura e escala de produção como a área total da UPL, as áreas destinadas ao cultivo de forrageiras no verão e no inverno e à silagem, número total de animais e número de vacas em lactação e a produção diária de leite. Essas características foram relacionadas positivamente com a área destinada ao cultivo para silagem, ao uso de concentrado comercial e à estabilidade no teste do álcool. Por outro lado, houve pouca ou nula associação dessas variáveis ligadas à infra-estrutura e escala de produção com os teores de gordura e proteína do leite e a relação gordura:proteína. Houve associação negativa entre acidez titulável e os atributos de estabilidade no teste do álcool, teor de lactose, uso de concentrado comercial, áreas destinadas à silagem e pastagens de inverno e verão, volume produzido de leite e número de animais total e em lactação.

Secundariamente as amostras com elevados valores de CBT apresentaram maiores valores de acidez titulável e menores valores de estabilidade, gordura e relação gordura e proteína lácteos. Houve pouca variabilidade em relação aos teores médios de lactose, proteína e CCS.

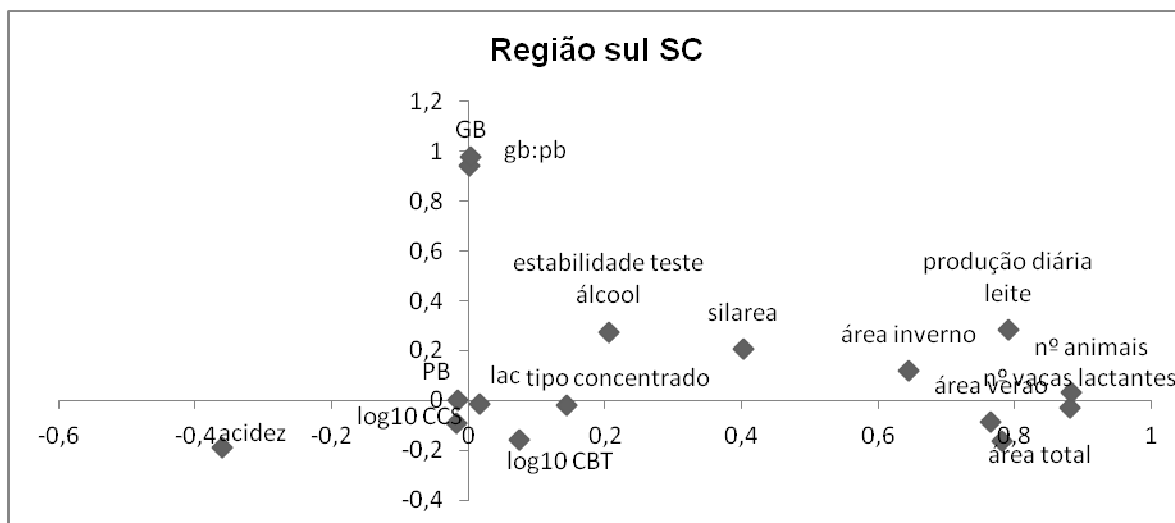


Figura 3 - Plano ortogonal com fatores principais de levantamento de produção leiteira na região sul de Santa Catarina, Brasil

Gb = teor de gordura do leite, PB = teor de gordura do leite, gbpb = relação entre gordura e proteína do leite, log10 CBT = log10 contagem bacteriana total, log10 CCS = log10 da contagem de células somáticas, lac = teor de lactose do leite, silarea = área destinada ao cultivo para silagem, área verão = área destinada ao cultivo de pastagem no verão, área inverno = área destinada ao cultivo de pastagem no inverno.

Houve forte associação positiva entre UPLs que usam pós e pré dipping, as quais por sua vez foram moderadamente associadas com a ordenha canalizada. Por outro lado essas características foram negativamente associadas com o intervalo de realização dos testes de mastite clínica (caneca) e subclínica (CMT), com o pH do leite, com o teor de lactose e CBT. A CCS não foi associada com a realização de pré e pós dipping nem com o tipo de ordenha (Figura 4).

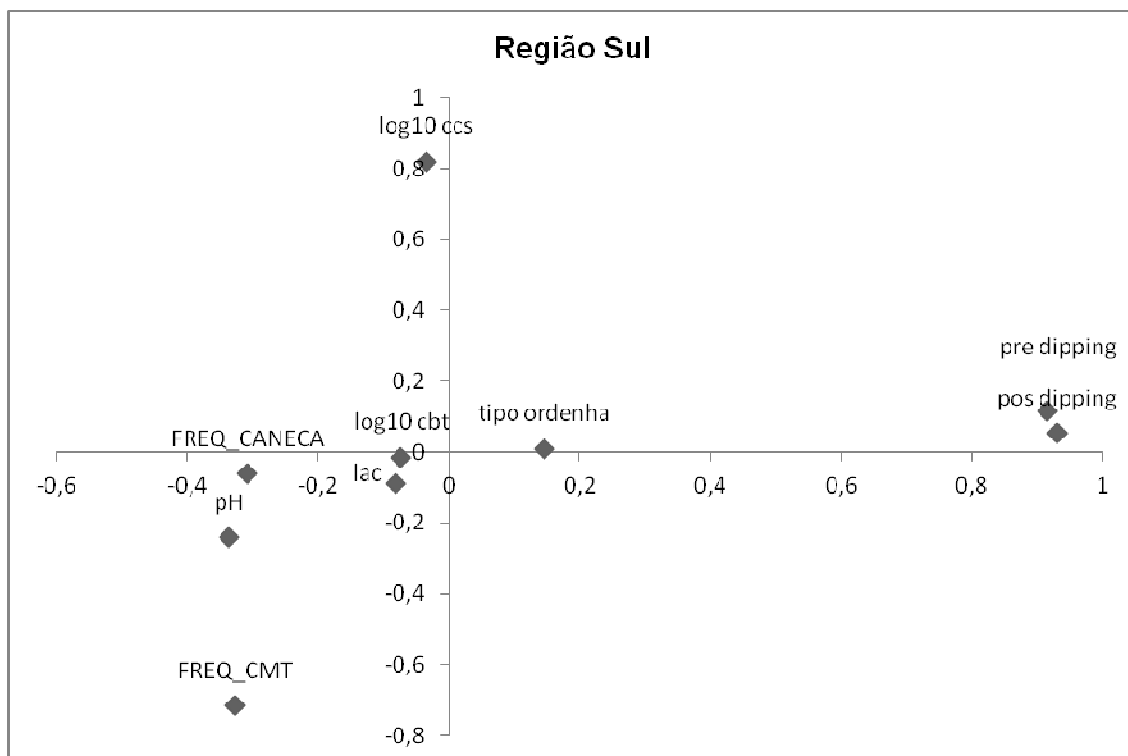


Figura 4 - Plano ortogonal com fatores principais sobre aspectos do manejo de ordenha nas unidades de produção leiteira na região Sul de Santa Catarina, Brasil

As UPLs puderam ser classificadas em quatro grupos, com 7, 22, 12 e 18 observações. Os atributos mais determinantes para essa classificação foram produção diária de leite, proporção de gordura:proteína e acidez titulável do leite (Tabela 4).

Tabela 4 - Coeficiente de determinação, probabilidade F e probabilidade do quadrado médio da correlação canônica (QMCC) dos atributos para classificação dos agrupamentos em análise discriminante.

Atributo para classificação	R ² parcial	P > F	P > QMCC
Produção de leite (L/dia)	0,92	<0,0001	<0,0001
Proporção de gordura:proteína	0,16	0,0206	<0,0001
Acidez titulável do leite (°D)	0,16	0,0208	<0,0001

A comparação entre os agrupamentos de UPLs mostra que houve diferenças em relação à produção diária de leite, teores de gordura, proporção de gordura:proteína do leite, número de forrageiras usadas no inverno, uso de silagem, tipo de sala de ordenha, número total de animais e de vacas em lactação, áreas destinadas ao cultivo no inverno e tendência no uso de pós dipping (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores médios dos atributos de infra-estrutura e escala de produção das UPLs e das características do leite e seus desvios padrão de acordo com o seu agrupamento

Atributo	Agrupamento				P<F	RSME
	1	2	3	4		
Área total (ha)	44	24,7	13,78	23,0		
Área cultivo verão (ha)	20,4 a	11,5 b	6,8 b	11,2 b	****	4,8
Área cultivo inverno (ha)	8,0 a	4,8 b	1,3 c	2,4 c	****	2,9
Área cultivo silagem (ha)	3,0	2,9	1,0	1,7	ns	1,9
Nº animais	65,5 a	49,6 a	22,4 b	37,3 b	***	19,2
Nº vacas lactantes	32,7 a	22,2 ab	10,6 c	16,2 bc	***	9,8
Produção leite (L/dia)	781 a	496 b	181 d	312 c	****	56,0
Espécies forrageiras verão (nº)	2,7	1,3	2,1	2,7	ns	1,0
Espécies forrageiras inverno (nº)	1,4 b	2,6 b	0,5 a	1 ab	*	0,5
Uso de silagem ¹	0,7ab	1,0 a	0,4 b	0,8 ab	t	0,4
Tipo de concentrado ²	0,1	0	0	0	ns	0,2
Tipo de sala de odenha ³	1 a	1 a	0,6 b	1 a	**	0,3
Uso pré dipping ¹	0,9	0,7	0,2	0,6	ns	0,5
Uso pos dipping ¹	0,9 ab	0,8 ab	0,3 b	0,8 a	t	0,4
Intervalo uso teste mastite clínica ⁵	8,7	6,9	8,5	6	ns	3,9
Intervalo uso teste	8,7	8,3	10,0	9,5	ns	3,2

mastite sub clínica ⁵						
Acidez titulável (°D)	15,4	15,8	15,9	16,2	ns	1,0
Log10 CBT	5,2	5,1	5,1	4,9	ns	0,8
Log10 CCS	5,3	5,4	5,5	5,4	ns	0,3
Gordura bruta (%)	4,3 ab	4,4 a	3,9 b	4,3 a	*	0,5
Proteína bruta (%)	3,3	3,5	3,5	3,6	ns	0,2
Lactose (%)	4,4	4,4	4,4	4,4	ns	0,1
GB:PB	1,2 ab	1,3 a	1,1 b	1,2 a	*	0,1

**** P<0,0001 *** P<0,001 ** P<0,01 * P,0,05 t P,0,10 NS P>0,10

¹ 0 = não, 1 = sim, ² 0 = caseiro 1 = comercial, ³ 0 = balde ao pé 1 = canalizada

⁴ proporção gordura:proteína no leite, ⁵ intervalos realização testes mastite: 1 = após cada ordenha; 2 = semanal 3= quinzenal; 4 = mensal; 5 = bimestral, 10 = não realiza

Discussão

A estrutura das propriedades quanto a sua dimensão e capacidade operacional definida por número e categorias de animais existentes, área de pastagens e a produção de leite mensal são os fatores que determinam a classificação de tais propriedades dentro de políticas governamentais e relações comerciais produtor-indústria no Brasil (Marion Filho & Oliveira, 2011). Portanto, nesse presente estudo, o peso maior destas variáveis na variância acumulada na análise de características de unidades de produção leiteira parece refletir a realidade do segmento de produtores leiteiros.

Em ambas as regiões estudadas, na análise do fator principal 1, as variáveis com maior peso na composição do mesmo são o número total de animais e de vacas em lactação, área total e áreas usadas no cultivo durante o inverno e verões, mas somente na região sul, a produção leiteira apresentou carga fatorial elevada. Segundo Fassio et al. (2006), a maioria dos indicadores de eficiência da atividade leiteira levam em conta produção, produtividade por vaca. Em cerca de 1800 propriedades leiteiras nos Estados Unidos durante os anos de 2000 a 2005, Khanal et al. (2010) perceberam que os dados de produção de leite total por propriedade e a produtividade por vaca estavam altamente correlacionadas com a estrutura do rebanho, como, por exemplo, a proporção de cada categoria dentro do rebanho total e com o grau de intensificação do uso de pastagens, entre outras variáveis estudadas.

O segundo fator principal foi explicado pelos teores de gordura e a relação gordura:proteína, provavelmente refletindo uso de alimentos distintos entre as UPLs além das distintas produtividades. O teor de gordura é aquele com maior magnitude de variação dentre os componentes lácteos. O teor de gordura na região oeste foi negativamente relacionado com a produção leiteira diária, provavelmente explicado pelo fator diluição, ou seja, menor produtividade, concentrando assim o teor gordura (Carroll et al., 2006), porém na região sul, houve pequena associação positiva entre o teor de gordura do leite e produção de leite. A totalidade das amostras para gordura e proteína das amostras de leite coletadas nas regiões em estudo esteve de acordo com a IN62, enquanto que para lactose, 85% foram superiores a 4,3% em ambas as regiões.

Na região oeste, a relação positiva entre as características relacionadas à área total e de cultivo de alimentos pro rebanho e número total de animais e de vacas lactantes com teor de proteína, estabilidade no teste do álcool, acidez titulável e volume de produção pode ser explicada pelo fornecimento de alimentos em maior quantidade e com maior consistência durante o período, com melhor aporte nutricional, o que se reflete em maior teor de proteína e estabilidade do leite. De forma semelhante, na região sul, as características relacionadas à área total e de cultivo de alimentos pro rebanho e número total de animais e de vacas lactantes foram relacionadas positivamente com a área destinada ao cultivo para silagem, ao uso de concentrado comercial e à estabilidade no teste do álcool.

Em ambas as regiões, a pouca associação das variáveis ligadas à infra-estrutura e escala de produção com o teor de gordura e a relação gordura:proteína pode ser explicada pelo fato do teor de gordura sofrer influências contrárias da raça usada, do nível produtivo, alimentos usados e esses fatores não terem relação com a área e número de animais do rebanho. Na região oeste, a relação negativa entre teor de gordura e a relação gordura:proteína com a produção leiteira pode ser explicada pelo uso de animais da raça Holandês. Já na região sul houve associação positiva entre o teor de gordura e a produção das UPLs, refletindo o fato do uso maciço de animais da raça Jersey, provável maior uso de silagem e pastagem pelas maiores áreas destinadas ao cultivo e menor CCS.

Em ambas as regiões a relação positiva entre a estabilidade do leite e características relacionadas com área de cultivo de forrageiras e silagem remete ao efeito positivo do maior aporte nutricional sobre a estabilidade, o que foi relacionado com a menor permeabilidade das junções firmes das células epiteliais mamárias (Stumpf et al., 2013) e oferta de alimentos (Ponce & Hernández, 2001; Chavez et al., 2004; Barchiesi-Ferrari et al., 2007; Fruscalso et al., 2013).

Em ambas as regiões, a fraca associação da CCS com as características ligadas à infra-estrutura e escala de produção pode ser explicada pela sua relativa independência com a adoção de práticas de higiene durante a ordenha e com a disseminação de práticas de controle de mastite com o tratamento com antibiótico intramamário no momento da secagem em mais de 90% das UPLs, ao contrário do verificado por El-Tawahy & El-Far (2010) descrevem a CCS e o nível tecnológico da propriedade como interdependentes.

Em ambas as regiões, o uso de ordenha canalizada foi associado com a prática do pré-dipping e menores valores de CBT e a menores intervalos de dias para uso dos testes de detecção de mastite clínica e subclínica. O uso de pré dipping e o tipo de ordenha (canalizado ou balde ao pé) não foram relacionados aos valores de CCS. Na região oeste, o uso de pós dipping foi associado à menor valor de CCS, o que não cooreu na região sul. O sistema balde ao pé permite maior contato do leite com o ordenhador e com o ambiente, o que pode aumentar as chances de contaminação do leite,

aumentando a CBT. Normalmente o pré dipping controla mais os microorganismos ambientais que causam mastite enquanto o pós dipping controla mais os contagiosos.

Taffarel (2010) relatou que o leite de menor contagem bacteriana foi oriundo de sistemas de ordenha canalizados quando comparado com ordenha balde ao pé. Por outro lado, Winck e Thaler (2009), em pesquisa realizada no Oeste de Santa Catarina, relataram que o fato do produtor possuir ordenha mecânica, em comparação com aqueles que possuíam ordenha manual, não impactou significativamente na melhoria da qualidade do leite.

Independentemente do tipo de sala de ordenha, o preparo do úbere variou pouco entre as UPLs. O uso de dipping das regiões Oeste e Sul são semelhantes aos observados por Rosa et al. (2013), os quais relataram que 54% dos produtores entrevistados usam pré-dipping e 62% utilizaram o pós-dipping.

Entretanto os valores de CBT e CCS foram preocupantes. Para a região Oeste, 51 e 72% das amostras de leite não estavam conforme a IN62 para CBT e CCS, respectivamente. Enquanto que para região Sul os valores foram de 35 e 32%. A má qualidade higiênica-sanitária do leite cru pode ser relacionada a fatores como deficiências no manejo e higiene da ordenha, índices elevados de mastite, manutenção e desinfecção inadequadas dos equipamentos, refrigeração ineficiente ou inexistente e mão de obra desqualificada, entre outros (Santana et al., 2001). Dentre as técnicas de manejo de ordenha, independente do sistema de ordenha, o emprego da pré-imersão das tetas em desinfetante torna-se imprescindível seu uso, pois isso

pode estar impactando na alta contagem bacteriana do leite das propriedades das regiões estudadas.

As boas práticas de produção devem ser aplicadas desde a obtenção e durante o armazenamento e transporte da matéria-prima, que no caso da produção leiteira pode-se traduzir em higiene de ordenha, resfriamento e granelização (Matsubara, 2011), pois para Eckstein (2014), as práticas de higiene aplicadas nas propriedades obtiveram correlação com a composição do leite, CCS e CBT, sendo verificado desta maneira que estas práticas são importantes ferramentas para manter a qualidade do leite. Montanhini et al. (2013) avaliando 156.465 amostras analisadas pelo laboratório da Associação Paranaense de criadores de bovinos da raça Holandesa, verificaram a relação negativa da CCS com os teores de gordura, proteína, lactose, ESD.

Conclusões

A variabilidade entre as UPLs dentro de cada região foi principalmente relacionada às características de área total e de cultivo de alimentos, número de animais total e em lactação e teor de gordura. A composição química do leite (gordura e proteína) e a CCS variam quase que independentemente das características relacionadas à infra-estrutura e escala de produção.

Agradecimentos

A Fundação de Amparo a Pesquisa e a Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro para a execução das pesquisas.

Aos laticínios Lac lelo e D'Nona por disponibilizarem sua equipe para realização do experimento.

Referências

Barchiesi-Ferrari, C.G.; Williams-Salinas, P.A.; Salvo-Garrido, S.I. Inestabilidad de la leche asociada a componentes lácteos y estacionalidad en vacas a pastoreo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 42, p.1785-1791, 2007.

Brasil. 2011. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado. Instrução normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. In: BRASIL (Ed.). *Diário Oficial da União*. Brasília.1, 6.

Carroll, S.,M., Depeters, E.J., S.J., Taylor, S.J., Rosenberg, M., Perez-Monti, H., Capps, V.A. 2006. Milk composition of Holstein, Jersey and Brown Swiss cows in response to increasing levels of dietary fat. *Animal Feed Science and Technology*. 131, 451–473.

Chavez, M; Negri, L.M; Taverna, M.A., 2004. Bovine milk composition parameters affecting the ethanol stability. *Journal Dairy Reserch*, 71, 201-206.

Chatellier, V., Pflimlin, A., Perrot, C. 2008. La production laitière dans les regions de l'arc Atlantique européen. *INRA Productions Animales*, Paris, 21(5), 427-440.

Eckstein, I.I. Isolamento de bactérias causadoras de mastite subclínica e correlação entre qualidade físicoquímica do leite e contagem de células somáticas. *Rev. Ciên. Vet. Saúde Públ.*, v. 1, n. 2, p. 99-106, 2014.

Epagri. Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2013 – 2014. 2014. 208p.

El-Tahawy, A.S., El-Far, A.H. Influences of somatic cell count on milk composition and dairy farm profitability. *Int. J. Dairy Technol.* 2010;63:463–469.

Fassio, L. H.; Reis, L. P.; Geraldo, L. G. Desempenho técnico e econômico da atividade leiteira em Minas Gerais. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1154- 1161, nov.-dez., 2006.

Fernandes, E.N., Bressan, M., Verneque, R.S., 2004. Zoneamento da pecuária leiteira da região sul do Brasil [Milk production mapping from Southern region in Brazil]. *Cienc. Rural*. 34, 485–491.

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

Fruscalso, V.; Stumpf, M.T.; McManus, C.M.; Fischer, V. Feeding restriction impairs milk yield and physicochemical properties rendering it less suitable for sale. *Scientia Agricola*, v. 70, p.237-241, 2013.

Gabbi, A.M., Mcmanus, C.M., Silva B.A.V., Marques, L.T.C., Zanela, M.B., Stumpf M.P., Fischer, V.A. 2013. Typology and physical–chemical characterization of bovine milk produced with different productions strategies. *Agricultural Systems* 121, 130–134.

García, C.G.M., Dorward, P., Rehman, T., 2012. Farm and socio-economic characteristics of smallholder milk producers and their influence on technology adoption in Central Mexico. *Trop. Anim. Health Prod.* 44, 1199– 1211.

Hansson, H., Ferguson, R. 2011. Factors influencing the strategic decision to further develop dairy production - a study of farmers in central Sweden. *Livestock Science*, Amsterdam, 135, 110–123.

ICEPA - Instituto de Planejamento e Economia Agrícola de Santa Catarina. 2011. *Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola - Epagri/Cepa. Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina 2009-2010*.

Khanal, A.R., Gillespie, J., Macdonald, J. 2010. Adoption of technology, management practices, and production systems in US milk production. *Journal of Dairy Science*, Champaign, 93(12), 6012–6022.

Lopes, M.A., Lima, A.L., Carvalho, F.M. Reis, R.P. 2005. Resultados econômicos de sistemas de produção de leite com diferentes níveis tecnológicos na região de Lavras, MG. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, 57(4), 485-493.

Marcondes, T. 2005. Produção leiteira em Santa Catarina: situação atual e perspectivas. *Agropecuária catarinense*. 18(1), 20-23.

Marion Filho, P. J.; Oliveira, L. F. V. de. A especialização e a concentração da produção de leite nas microrregiões do Rio Grande do Sul (1990 – 2007). *Ensaio FEE*, Porto Alegre, v. 31, Número Especial, p. 635- 647, jun. 2011.

Matsubara, M. T., Beloti, V., Tamanini, R., Fagnani, R. 2011. Boas práticas de ordenha para redução da contaminação microbiológica do leite no agreste Pernambucano. *Ciências Agrárias*. 32, 277-286.

Montanhini, M.T.M., Moraes, H.M., Neto, R.M. 2013. Influência da contagem de células somáticas sobre os componentes do leite. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes*, 68(392), 18-22.

Muller Filho, A., Damasceno, J.C.R., Previdelli, I.T.S., Santana, R.G., Ramos, C.E.C.O., Santos, G.T. 2010. Tipologia de sistemas de produção baseada nas características do leite. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39(8), 1832-1839.

Negri, L.; Chavez, M.; Taverna, M.; Cuatrin, A.; Rubiolo, A. 2003. Determinación de las variables que afectan la estabilidad térmica de la leche utilizando un método capilar para evaluar el tiempo de coagulación por calor. *Revista Argentina de Lactología*, 22, 33-34.

Nero, L.A.; Vicoso, G.N.; Pereira, F.E.V. 2009. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. *Ciência e Tecnologia Alimentar*. 29(2), 386-390.

Ordóñez, J.A., Rodríguez, M.I.C., Álvarez, L.F., Sanz, M.L.G., Minguillón, G.D.G.F., Perales, L.H., Cortecero, M.D.S. 2005. *Tecnología de Alimentos: Componentes dos Alimentos e Processos*. Porto Alegre: Artmed, v.1, 279p.

Ponce Ceballo, P. & Hernández, R. Propriedades físico-químicas do leite e sua associação com transtornos metabólicos e alterações na glândula mamária. In: González, F. H. D.; Dürr, J. W.; Fontaneli, R. S. (Ed.). **Uso do leite para monitorar a nutrição e metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, p. 58-68, 2001.

Reiber, C., Peters, M., Möhring, J. 2012. Effect of feed supplements on dry season milk yield and profitability of crossbred cows in Honduras. *Tropical Animal Health and Production*, Edinburgh, 1-8.

Rosa, G.S., Rosvadoski, C.S.R., Cicatto, Z.O., Mouro, G.F., Diniz, E.R., Silva, V.R.G. 2013. Boas práticas de ordenha utilizadas por bovinocultores de leite em Ivaiporã-PR. *Cadernos de Agroecologia*. 8(2), 1-5.

Santana, E.H.W., Beloti, V., Barros, M.A.F. 2001. Microrganismos psicrotóxicos em leite. *Revista Higiene Alimentar*. 15(88), 27-33.

Siqueira, K.B.; Kilmer, R.L. Campos, A.C. 2010. The dynamics of farm milk price formation in Brazil. *Revista de Economia e Sociologia Rural*. 48(1), 41-61.

Smith, R.R., Moreira, V.L., Latrille, L.L., 2002. Caracterización de sistemas productivos lecheros en la X Región de Chile mediante análisis multivariable

[Characterization of dairy productive systems in the 10th Region of Chile using multivariate analysis]. *Agric. Tec.* 62, 375–395.

Taffarel, L.E, Costa, P.B.C., Braga, G.C., Oliveira, N.T.E., Zonin, W.J. 2010. Impactos de diferentes sistemas de ordenha sobre a contagem bacteriana do leite. XX CBZ.

Tronco, V.M. Manual para inspeção e qualidade do leite. 2003. Santa Maria: Ed. Da UFSM, 192p.

Wagner, S.A., Gehlen, I., Wiest, J.M., 2004. Padrão tecnológico em unidades de produção familiar de leite no Rio Grande do Sul relacionado com diferentes tipologias [Technologies the domestic dairy producers in Rio Grande do Sul relations among the distinctive tipologies]. *Cienc. Rural.* 34, 1579–1584.

Winck, C.A., Thaler Neto, A. 2009. Diagnóstico da adequação de propriedades leiteiras em Santa Catarina as normas brasileiras de qualidade do leite. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 8(2), 164-172.

CAPÍTULO III

Proporções de silagem e feno em dietas de vacas lactantes e as características físico-químicas do leite⁴

⁴ Artigo escrito de acordo com as normas da Tropical Animal Health and Production

Proporções de silagem e feno em dietas de vacas lactantes e as características físico-químicas do leite

Proportions of silage and hay in lactating cow diets and milk physical and chemical characteristics

Resumo

Objetivou-se com este trabalho avaliar a inclusão de níveis crescentes de feno de tifton 85 (*Cynodon dactylon*) em substituição à silagem de milho sobre a produção leiteira e as características físico-químicas do leite. Foram utilizadas 21 vacas da raça Jersey com produção média de 19,5 kg/dia, 405 kg de peso e 154 dias em lactação. O experimento durou 28 dias, dos quais os primeiros 7 dias foram de adaptação dos animais às condições experimentais e 21 foram de período de medidas. Os animais foram divididos em três grupos homogêneos, todos recebendo dietas com uma proporção de 45% de concentrado e 55% de volumoso na base da massa seca. Em relação ao volumoso total, as proporções de silagem e feno fornecidas aos grupos baixo feno, médio feno e alto feno foram, respectivamente 80:20, 60:40 e 40:60. A alimentação foi oferecida na forma de dieta completamente misturada. O leite foi coletado nos dias 1, 7, 21 e 28 do experimento, para posteriores análises físico-químicas do leite. Os dados contínuos e de distribuição normal foram submetidos à análise descritiva e análise da variância, usando-se os procedimentos FREQ e GLM (SAS, 1989) versão 6.12. Testou-se o efeito da dieta (n=3), e usaram-se os atributos mensurados no dia 7 como covariáveis. Os animais alocados às dietas produziram leite o qual diferiu apenas quanto aos teores de proteína e extrato seco desengordurado. O aumento da inclusão de feno de tifton 85(*Cynodon dactylon*) substituindo a silagem de milho se mostrou viável do ponto de vista técnico ao não alterar desfavoravelmente a produtividade leiteira e a composição físico-química do leite.

Palavras-chave: proporção volumoso · características físico-químicas do leite

Abstract

The objective of this study was to evaluate replacement of corn silage by Tifton hay on yield and physicochemical traits of milk. Twenty-one Jersey cows with daily milk yield of 19.5 kg, 405 kg of BW and 154 of DIM were used. The experiment lasted 28 days, of which 7 were designed to the adaptation of animals to the experimental conditions and 21 for measurements. Cows were allocated into three homogenous groups, each receiving TMR with 45:55 concentrate to forage rate in the dry matter basis. Regarding the forage component of the diet, the proportions of silage and hay

provided to groups fed with low hay, middle hay and high hay were 80:20, 60:40 and 40:60, respectively. Milk yield was daily measured and a sample was collected on days 1, 7, 21 and 28 of the trial. The continuous and normally distributed data underwent descriptive and analysis of variance using FREQ and GLM procedures (SAS, 1989) version 6.12, testing the effect of diet ($n = 3$). The attributes measured on day 1 were used as covariates. Proportion of hay and silage affected only the protein and nonfat dry extract contents of the milk. The inclusion of 20 to 80% of the forage as Tifton hay is feasible from the technical point of view as it did not adversely change the milk yield as well as the physical and chemical composition of milk.

Keywords: roughage ratio · physical chemical characteristics of milk

Introdução

O uso de forragens conservadas na dieta de ruminantes tem se tornado uma prática cada vez mais comum, tendo a ensilagem e fenação as principais formas de conservação. Algumas forrageiras como milho e sorgo são preferencialmente conservadas como silagem, enquanto que outras gramíneas são mais usadas na forma de feno, como exemplo, o tifton 85 (Cavalcante et al., 2004). Mas a substituição da silagem por feno pode trazer alguns benefícios como a disponibilidade de compra durante o ano, bom valor nutricional, principalmente proteína e energia, rico em fibra longa, diminuindo casos de acidose subclínica e benefícios na gordura do leite, mantendo ótima saúde ruminal.

A alimentação de vacas leiteiras tem grande importância para produção e composição do leite. Segundo Fredeen (1996) e Walstra et al. (1999), cerca de 50% da variação no conteúdo de proteína e de gordura do leite pode ser creditado ao manejo nutricional, principalmente relacionado à qualidade dos volumosos. A variação na proporção dos ingredientes que compõe o volumoso da dieta pode alterar a produção de leite e seus componentes, especialmente se o consumo de energia e nutrientes for incrementado (Kowsar et al. 2008). A forma física do volumoso desempenha um

importante papel na estimulação da mastigação e manutenção das funções ruminais (Win et al. 2015). Forragens com comprimentos pequenos de partículas podem resultar na mastigação reduzida, menor produção de saliva e conseqüentemente menor pH do rúmen (Krause et al. 2002; Beauchemin et al. 2003; Stone 2004).

Com o aumento da intensificação da bovinocultura de leite, principalmente em sistemas confinados, a fonte de alimento volumoso para os animais é a silagem de milho ou sorgo, mas a inclusão de outros volumosos pode ser uma alternativa além da possibilidade de usar o feno para melhorar a estrutura da forragem (tamanho e resistência à mastigação) e manter o pH ruminal dentro da faixa adequada de variação (6,2 a 6,8) (Qadis et al. 2014). Os efeitos negativos do reduzido tamanho da partícula frequentemente observados na silagem de milho ou de alfafa sobre a digestibilidade podem ser amenizados com a suplementação de feno (Couderc et al. 2006, Beauchemin et al, 1994). Win et al. (2015) em um experimento realizado com seis diferentes proporções de feno de grama-esmeralda (*Zoysia japonica*) e silagem de milho na massa seca respectivamente (0:100; 10:90; 20:80; 30:70; 40:60; 50:50) observaram que com o aumento da inclusão de feno, foi maior a concentração de acetato e menor a concentração de propionato e butirato. Entretanto o pH ruminal se manteve dentro de uma faixa de 6,77 a 6,89. Kowsar et al. (2008) observaram que o pH ruminal aumentou apenas na proporção de 40% de feno, estabilizando o ambiente ruminal, aumentando o consumo de massa seca.

A inclusão de feno substituindo a silagem aumenta o teor e a quantidade consumida de fibra da dieta, além de melhorar a sua efetividade, o que pode modificar o consumo da dieta, a produção leiteira e os teores de proteína (Kargar, 2012), gordura e lactose (Yang e Beauchemin 2005), relacionado ao valor energético da dieta, porém os

efeitos sobre as características físicas são menos estudados, em especial a estabilidade do leite. A hipótese do presente estudo é que a inclusão de feno em substituição à silagem pode reduzir o consumo e a produção leiteira, mas ao melhorar a efetividade da fibra e aumentar a quantidade de fibra consumida, irá modificar as características físico-químicas do leite. Objetivou-se avaliar a produção leiteira e as características físico-químicas do leite de vacas da raça Jersey, com a inclusão de feno na dieta em substituição à silagem de milho.

Material e métodos

O experimento foi conduzido em uma propriedade leiteira, no município de Itapiranga/SC, de maio a junho de 2011, com o objetivo de avaliar o efeito do fornecimento de diferentes proporções de feno e de silagem sobre a produção leiteira e as características físico-químicas do leite. Foram usadas 21 vacas da raça Jersey mantidas em confinamento, divididas em lotes.

O experimento teve uma duração de 28 dias, dos quais os 7 dias iniciais corresponderam ao período pré-experimental, quando todos os animais receberam a mesma dieta, composta por 32 kg de silagem de milho e 6,6 kg de ração comercial (Tabela I).

Tabela I - Valores percentuais da composição bromatológica dos alimentos

Alimentos	Teores médios de nutrientes (% da MS ^a)						
	MS ^a	PB ^b	EE ^c	FDN ^d	NDT ^e	Ca ^f	P ^g
Feno de Tifton 85	88	10	0,9	74	51	0,37	0,15
Silagem de Milho	29	9	2,7	54	72	0,42	0,19
Ração Comercial	88	28	3,5	33	76	1,5	0,5

(a) massa seca; (b) proteína bruta; (c) extrato etéreo; (d) fibra em detergente neutro; (e)

nutrientes digestíveis totais; (f) cálcio; (g) fósforo.

Ao final do período de adaptação, os animais foram aleatoriamente divididos em três grupos (Tabela II), os quais foram alocados a uma das três dietas. As dietas foram formuladas para conter uma proporção de concentrado:volumoso de 45:55. Em relação ao volumoso, as dietas diferiram quanto à proporção silagem de milho e feno de tifton 85 (*Cynodon dactylon*): baixo feno ou 80:20 (25,14 kg de silagem, 2,57 kg de feno e 6,6 kg de ração comercial), médio feno ou 60:40 (18 kg de silagem, 4,85 kg de feno e 6,6 kg de ração comercial) e alto feno ou 40:60 (14,28 kg de silagem, 7,71 kg de feno e 6,6 kg de ração comercial). Foram fornecidos sal mineral e água *ad libitum*.

Tabela II. Quantidades diárias dos alimentos oferecidos por vacas leiteiras de acordo com a proporção de concentrado na dieta (valores em kg massa seca/vaca/dia e % da MS)

Aporte De Nutrientes ^a	% Silagem : % Feno ^b					
	80:20:		60:40		40:60	
	kg	%	Kg	%	kg	%
MS ^c	15,4	-	15,4	-	16,8	-
PB ^d	2,5	16,4	2,6	16,8	2,7	16,3
NDT ^e	10,9	70,9	10,4	67,7,	10,9	64,9
FDN ^f	7,5	48,8	8,3	54,0	9,2	54,5

(a) Nutrientes consumidos aos animais por vaca e por dia ; (b) Proporção de silagem : feno da dieta dos animais; (c) MS - Massa Seca; (d) PB - Proteína Bruta; (e) NDT - Nutrientes Digestíveis Totais; (f) FDN - Fibra em Detergente Neutro

A alimentação foi oferecida três vezes ao dia (às 7h, às 14h e às 18h) como ração totalmente misturada completa, permitindo uma sobra de 5% do total da massa seca (MS). As vacas foram ordenhadas às 6h e às 18h. Antes da ordenha foram realizadas rotineiramente lavagem e secagem dos tetos e a realização de pré-imersão dos tetos e teste da caneca de fundo preto. Depois da ordenha foi realizada a pós-imersão dos tetos com solução desinfetante com iodo emoliente e tensoativo. As amostras foram compostas de aproximadamente, 100 mL da ordenha vespertina, mantido a 5°C, adicionado de 100 mL do leite da ordenha matutina do dia seguinte.

Realizaram-se as seguintes coletas e análises:

- peso corporal e escore de condição corporal (ECC): a avaliação do peso dos animais foi feita com a fita torácica no início do experimento, pela manhã logo após a

chegada dos animais no local de alimentação. A avaliação da condição corporal dos animais foi realizada concomitantemente de acordo com uma escala de 1 a 5 (Willdman et al., 1982);

- produção leiteira: foi realizada utilizando medidores mecânicos, nas ordenhas da manhã e da tarde, efetuadas nos dias 1, 7, 21 e 28 do experimento;

- composição do leite: a composição do leite de cada vaca foi avaliada em amostras de leite provenientes da mistura proporcional do leite das ordenhas matutina e vespertina nos dias 1, 7, 21 e 28 após o início do experimento, subdivididas em sub-amostras por animal. Um lote de amostras foi colocado em frascos plásticos, adicionado de Bronopol para análises de composição, contagem de células somáticas (CCS) e nitrogênio ureico, analisadas pelo método de contagem eletrônica por citometria de fluxo. E o outro lote de amostras foi destinado à análise das características físicas do leite.

- características físicas do leite: foram determinadas nas amostras de leite coletadas nos dias 1, 7, 21 e 28 após o início do experimento: acidez titulável pelo método de Dornic (Tronco, 2007), pH por potenciometria (Ordóñez et al. 2005), densidade através da utilização de um termolactodensímetro, estabilidade ao etanol em diferentes concentrações (72, 74, 76, 78 e 80% de etanol v/v), onde se registrou a menor concentração de etanol capaz de induzir a coagulação (Tronco 2007) e tempo de coagulação no tanque (TCT), (Negri et al., 2003). Essas amostras foram transportadas sob refrigeração e sem o uso de conservantes e as referidas análises físicas foram executadas no laboratório após algumas horas para liberar o gás carbônico da amostra;

- pH da urina: foram coletadas amostra de urina nos dias 7, 21 e 28 após o início do experimento, por liberação espontânea e/ou massagem perineal dos animais. O pH

da urina foi determinado por potenciometria com o peagâmetro da marca Orion e imediatamente após a sua coleta;

- foram realizadas coletas de sangue nos dias 7 e 28 após o início do experimento, por venipunção na veia coccígea, com tubos Vacutainer sem conservantes e/ou anticoagulantes. Imediatamente após a coleta do material se deixou a amostra em repouso por um período de 30 minutos para permitir a formação do coágulo e, em seguida se centrifugaram os tubos com o fim de separar o soro que foi imediatamente removido e congelado em tubos de *ependorff*. As amostras foram enviadas para um laboratório de análises clínicas e foram determinados os teores de glicose.

O delineamento foi completamente casualizado com medidas repetidas no tempo. Os dados contínuos e de distribuição normal foram submetidos à análise descritiva e análise da variância, avaliando o efeito das dietas, utilizando os procedimentos FREQ e MIXED (SAS, 1989) versão 6.12. As médias foram ajustadas por covariância de acordo com o número de dias em lactação e o valor inicial das medidas antes da aplicação dos tratamentos. Complementarmente os dados contínuos foram submetidos à análise de regressão linear testando o efeito da inclusão de níveis crescentes de feno na dieta. Os valores de CCS e contagem bacteriana total (CBT) sofreram transformação logarítmica (\log_{10}) antes da análise estatística (Markus, 1973).

Resultados

As proporções realmente fornecidas de silagem e feno foram de 76:24, 55:45 e 40:60, respectivamente, para as dietas 80:20, 60:40 e 40:60. As quantidades médias de MS da dieta AF foram superiores, resultando em valores semelhantes das quantidades de proteína bruta (PB) e nutrientes digestíveis totais (NDT) e superiores de fibra em

detergente neutro (FDN) consumidas pelos animais em relação aos grupos BF 80:20 e MF 60:40 (Tabela II).

O incremento da proporção de feno de Tifton substituindo a silagem de milho não alterou significativamente ($P>0,10$) a produção leiteira, peso corporal, ECC e as características físicas e químicas do leite além da CCS e CBT, exceto o teor de proteína e a acidez titulável. Os teores de proteína láctea e sólidos desengordurados diminuíram com o aumento da proporção de feno de 20 para 40%, não havendo diferença em relação ao nível de 60%. A acidez titulável diminuiu linearmente com a inclusão do feno em substituição à silagem. O pH da urina e o teor de glicose plasmático não variaram entre os tratamentos (Tabela III).

Tabela III. Resultados médios de acordo com a proporção de silagem:feno na dieta, equações de regressão e sua significância sobre a composição físico-química do leite.

Atributo	% de Inclusão de Feno no volumoso			P>F	QME	Eq. Regressão
	20	40	60			
Densidade (g/mL)	1031,3	1031,2	1030,7	0,57	1,18	$\hat{y} = 1031,1$ $\hat{y} = 20,9 - 0,05x$
Acidez Tit. (°D)	20,12	18,6	18,5	0,09	1,47	$\hat{y} = 80,7$
Álcool (%v/v)	80,0	81,5	80,5	0,46	2,27	$\hat{y} = 16,04$
Prod. Leite (L)	17,6	15,1	15,4	0,22	2,79	$\hat{y} = 6,77$
pH Leite	6,75	6,75	6,79	0,32	0,05	$\hat{y} = 8,16$
pH Urina	8,12	8,17	8,19	0,26	0,08	$\hat{y} = 4,70$
GB (g/100 ml)	4,35	4,87	4,89	0,11	0,50	$\hat{y} = 4,11$
PB (g/100 ml)	4,15 a	4,0 b	4,23 a	0,01	0,12	$\hat{Y} = 1,14$
GB:PB	1,06 b	1,22 a	1,15 ab	0,11	0,13	$\hat{y} = 4,39$
Lactose (g/100 ml)	4,46	4,38	4,32	0,21	0,13	$\hat{y} = 14,21$
Sólidos totais (g/100 ml)	13,9	14,2	14,4	0,22	0,49	$\hat{y} = 9,70$
ESD (g/100 ml)	9,58 a	9,39 b	9,51 ab	0,03	0,12	$\hat{y} = 11,5$
NUL (g/100 ml)	14,27	14,63	13,69	0,83	2,44	$\hat{y} = 9,06$
CCSc	7,98	9,66	2180,9	0,28	2,03	$\hat{y} = 68,48$
Glicose (mg/dL)	71,4	66,8	67,2	0,60	9,26	$\hat{y} = 402,6$
TCT(seg)	370	414	423	0,82	170	

(1) Letras diferentes na linha mostram diferença significativa entre os tratamentos a 5% de probabilidade no teste de F. As médias foram ajustadas por covariância pelos valores iniciais e dias em lactação. (2) proporção na massa seca. QME - Quadrado Médio do Erro; PL - Produção de Leite; ECC - Escore de Condição Corporal; GB - Gordura Bruta; PB - Proteína Bruta; LAC - Lactose; ST - Sólidos Totais; ESD - Extrato Seco Desengordurado; NUL - Nitrogênio Ureico no Leite; CCSc - Contagem de Células Somáticas Corrigida; TCT - Tempo de Coagulação do Tanque.

Discussão

A manutenção e a semelhança do peso corporal, do ECC e da produção leiteira

das vacas alimentadas com as dietas contendo 20 a 60% de feno em relação ao volumoso total indica que as dietas aportaram quantidades mínimas de nutrientes (Tabela II), de 16% de proteína bruta e de 68% de NDT na dieta para atenderem as exigências nutricionais vacas de tamanho médio, terço médio da lactação, com produção em torno de 20 kg com 4% de gordura, com previsão de consumo de até 16 kg massa seca (NRC 2001). O consumo de nutrientes (Kowsar et al. 2008) e a quantidade de fibra efetiva suficiente para proporcionar um adequado ambiente ruminal semelhantes entre as dietas explicam a semelhança da produção leiteira, além do peso corporal e ECC (Couderc et al., 2006; Win et al., 2015).

Em outros trabalhos, a inclusão de feno na dieta em quantidades moderadas, entre 1,25 a 2,5 kg, não alterou significativamente a produção leiteira diária, o escore de condição corporal nem as características físicas do leite (COURDERC et al., 2006). Por outro lado, Villeneuve et al. (2013) relataram que a produção de leite foi maior em animais que receberam maior proporção de silagem quando comparadas com feno. Kowsar et al. (2008) utilizaram uma dieta com 40% de volumoso, com diferentes proporções de feno e silagem, respectivamente 40:0; 24:16; 20:20; 16:24 e observaram que o pH ruminal foi maior na proporção de 40% de feno, estabilizando o ambiente ruminal, aumentando o consumo de MS. Nesse caso, a menor proporção de volumoso usada pelos autores pode ter provocado a melhor resposta do nível mais alto de inclusão de feno. Win et al. (2015), em um experimento realizado com seis diferentes proporções de feno e silagem na MS respectivamente 0:100; 10:90; 20:80; 30:70; 40:60; 50:50, observaram a modificação da proporção molar de acetato, propionato e butirato no fluido ruminal, com o aumento da inclusão de feno, mas o pH se manteve dentro de uma faixa normal de 6,77 a 6,89, mantendo a atividade celulolítica. Essas diferenças

entre os estudos podem ser devido ao potencial produtivo e estágio lactacional dos animais, percentual da inclusão total de forragem, das proporções de silagem e feno, qualidade nutritiva da silagem e feno, mas também ao fato que, no presente trabalho, foi oferecido uma quantidade relativamente constante de dieta, e o aporte de nutrientes foram semelhantes.

O consumo de FDN aumentou com a inclusão de feno de 20 a 60% do volumoso atingindo, respectivamente, 1,9, 1,9 e 2,2% do seu peso vivo, valores bem superiores aos estimados por Mertens (1987) de 1,2% do peso vivo e Machado et al. (2014) que obteve 1,3%, para permitir máxima produção de leite sem comprometer a função ruminal. Pode-se supor que o excesso de FDN não permitiu aos animais independentemente da dieta manifestar seu potencial produtivo. Segundo Win et al. (2015), a associação de feno com silagem apresenta um efeito associativo positivo entre essas duas forrageiras na digestão e cinética do rúmen, aumentando a taxa de passagem de pequenas partículas, assim como o desaparecimento de parte da MS e FDN do rúmen. Mas a hipótese inicial de que a substituição da silagem por feno poderia reduzir o consumo de MS e modificar a produção leiteira foi rejeitada.

A semelhança dos teores dos componentes lácteos pode ser explicada pelo aporte nutricional similar das dietas, exceto em relação ao percentual de proteína láctea, pois as dietas com médio feno 60:40 apresentaram os menores valores, o que pode ter sido relacionado às variações individuais. Em outros trabalhos, quando a diferença de aporte nutricional ocorreu, foram observadas mudanças nos teores dos componentes lácteos, como os resultados descritos por Zyl et al. (2014), onde o aumento da qualidade do feno aumentou os teores de proteína e nitrogênio ureico; por Kowsar et al. (2008), onde as maiores proporções de silagem exerceram efeito positivo sobre a produção leiteira, teor

de lactose e proteína, mas reduziram o percentual de gordura. Os teores de proteína, gordura e lactose se encontram na faixa de variação normal para a raça Jersey. Os valores da proporção entre gordura:proteína indicam o estado metabólico adequado dos animais: valores acima de 1,5 indicariam cetose e abaixo de 1,0 acidose.

Os níveis de nitrogênio ureico no leite (NUL), analisados conjuntamente com os níveis de proteína no leite, indicam um equilíbrio adequado entre o aporte de nitrogênio e de carboidratos na dieta. Os resultados de NUL deste estudo estão de acordo com os estimados por Jonker et al. (1998) de 10 a 16 mg/dL, Moore e Varga (1996) de 10 a 14 mg/dL ou Hutjens e Barmore (1995) de 12 a 17 mg/dL. Valores abaixo ou acima dos citados anteriormente podem indicar inadequado manejo nutricional.

A adição de feno de gramíneas longo (0, 1,17 e 2,34 kg) a dietas contendo 60% de volumoso e silagem de partículas grandes melhorou a digestão da FDN, aumentou o consumo de dieta e reduziu o efeito de enchimento ruminal e o tempo gasto com a ruminação (Couderc et al., 2006). Os bovinos, na maioria das vezes, consomem menores quantidades de MS quando alimentados com silagem que quando alimentados com materiais verdes ou feno da mesma forrageira (Minson, 1990; Phuntsok et al, 1998; Pereira e Ribeiro, 2001). Atribui-se esse fato a produtos da fermentação (ácidos acético e láctico, por exemplo), à mudança na estrutura física do material ensilado, à quebra de proteína e conversão na forma de amônia e à redução do pH.

Em um trabalho realizado por Kmicikewycz et al. (2014), os quais avaliaram o tamanho de partículas de silagem com a suplementação de feno de gramínea, foi observado que diminuindo o tamanho da partícula da silagem, aumentou o consumo de MS, a produção de leite, proteína e lactose. Ao passo que aumentando a suplementação com feno aumentou a produção de gordura do leite. O pH do rúmen chegou a 5,38 e não

se observaram sinais de acidose subaguda que segundo o autor pode ser devido a uma possível adaptação ao pH baixo.

A redução do valor da acidez titulável do leite pode ter sido devida, em parte, à redução do teor de proteína observado na dieta MF 60:40. A estabilidade do leite não foi alterada pela inclusão de feno substituindo a silagem, provavelmente porque a acidez do leite não se modificou o suficiente para alterar os valores da estabilidade ao álcool e os tempos de coagulação. A redução da estabilidade é relacionada com a modificação dos teores dos cátions divalentes e monovalentes (Chavez et al., 2004; Costabel et al. 2014; Gonnet et al., 2014) e restrição nutricional severa (Zanela et al., 2006). No presente estudo, embora não se tenha medido o teor de cálcio iônico, os animais não sofreram restrição alimentar (NRC 2001) e aparentemente mantiveram adequadas condições ruminais e metabólicas, parcialmente comprovadas pelo pH da urina e do leite, os quais ficaram dentro da faixa normal, com intervalo de referência normal para pH da urina de 7,7 a 8,4 e pH ruminal 6,0 a 7,0 conforme Bouda et al. (2000).

O fornecimento de nutrientes pela dieta acarreta em grande parte o aporte de nutrientes para a glândula mamária, como por exemplo, a glicose, precursor da lactose, a qual é o principal regulador osmótico do volume de leite produzido (Lemosquet et al., 2009a; Lemosquet et al., 2009b; Wall e Mcfadden, 2012). Neste estudo, verificou-se que os valores de glicose das vacas estavam dentro dos parâmetros normais, que segundo González e Silva (2006), o valor de referência da glicose sanguínea para bovinos é de 45 a 75 mg/dL, indicando que a dieta atendeu às exigências nutricionais (NRC 2001).

Conclusão

A inclusão de 20 a 60% de feno de tifton 85 (*Cynodon dactylon*) em substituição à silagem de milho não modificou o peso corporal, ECC, produção leiteira e as características físico-químicas do leite, com exceção da proteína láctea e da acidez titulável.

Agradecimentos

Ao Kurth Griebeler e sua família por ceder a propriedade para realização do experimento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro para a execução das pesquisas.

Bibliografia

Beauchemin, K. A.; Buchanan-Smith, J. G., 2003. Effects of dietary neutral detergent fiber concentration and supplemental long hay on chewing activities and milk production of dairy cows. *Journal of Dairy Science.*, 72 (9), 2288–2300.

Bouda, J; Quiroz-Rocha, G; González, F.H.D., 2000. Importância da coleta e análise de líquido ruminal e urina. In: González, F.H.D.; Borges, J.B.; Cecim, M; Uso de provas de campo e de laboratório clínico em doenças metabólicas e ruminais dos bovinos. Porto Alegre, Brasil. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Cavalcante, A.C.R; Pereira, O.G; Valadares Filho, S.C; Ribeiro, K.G; Garcia, R; Lana, R.P., 2004. Dietas Contendo Silagem de Milho (*Zea maiz L.*) e Feno de Capim-Tifton 85 (*Cynodon spp.*) em Diferentes Proporções para Bovinos. *Revista Brasileira de Zootecnia.*, 33 (6), 2394-2402.

Chavez, M; Negri, L.M; Taverna, M.A., 2004. Bovine milk composition parameters affecting the ethanol stability. *Journal Dairy Reserch*, 71, 201-206.

Costabel, L.; Cautrin, A.; Páez, R.; Audero, G.; Campos, S.; Taverna, M., 2014. Avances en el estudio de estabilidad térmica y al alcohol de la leche. In: VIDAL, L.B. *Leche Inestable Desafios en el Cono Sur. II Conferencia Internacional*, 54-66.

Couderc, J. J.; Rearte, D. H.; Schroeder, G. F.; Ronchi, J. I.; Santini, F. J., 2006. Silage chop length and hay supplementation on milk yield, chewing activity, and ruminal digestion by dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 89 (9), 3599–3608.

Fredeen, A. H., 1996. Considerations in the nutritional modification of milk composition. *Animal Feed Science and Technology*, 59, 185-197.

Gonett, V.; Cardozo, R.; Gutiérrez, J.; Barros, L., 2014. Factores que alteran la estabilidad térmica y al alcohol. In: VIDAL, L.B. *Leche Inestable Desafios en el Cono Sur*. II Conferencia Internacional, 99-101.

González, F.H.D.; Silva, S.C., 2006. *Introdução à bioquímica clínica veterinária*. Porto Alegre. Editora Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 4, 121-151.

Hutjens, M.F.; Barrimore, J., 1995. Milk urea test gives us another tool. *Hoard's Dairyman*, 140 (10), 401.

Jonker, J.S.; Kohn, R.A.; Erdman, R.A., 1998. Using milk urea nitrogen to predict nitrogen excretion and utilization efficiency in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 81 (10), 2681-2692.

Kargar, S; Gholam, R.G; Masoud, A; Mohammad, K; Ladan, R; David, J.S., 2012. Lactational performance and milk fatty acid profile of Holstein cows in response to dietary fat supplements and forage:Concentrate ratio. *Livestock Science* 150, 274–283.

Kmicikewycz, A. D.; Heinrichs, A. J., 2014. Effect of corn silage particle size and supplemental hay on rumen pH and feed preference by dairy cows fed high-starch diets. *Journal of Dairy Science*, 98 (1), 373-85.

Kowsar, R.; Ghorbani, G. R.; Alikhani, M.; Khorvash, M.; Nikkhah, A., 2008. Corn Silage Partially Replacing Short Alfalfa Hay to Optimize Forage Use in Total Mixed Rations for Lactating Cows. *Journal Dairy Science*. 91, (12), 4755–64.

Krause, K. M.; Combs, D. K.; Beauchemin, K. A., 2002. Effects of forage particle size, and grain fermentability in midlactation cows. II. Rumen pH and chewing activity. *Journal of Dairy Science*. 85 (8), 1947–57.

Lemosquet, S.; Delamaire, E.; Lapierre, H.; Blum, J. W.; Peyraud J. L., 2009a. Effects of glucose, propionic acid, and nonessential amino acids on glucose metabolism and milk yield in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92 (7), 3244–57.

Lemosquet, S.; Raggio, G.; Loble, G. E.; Rulquin, H.; Guinard-Flament, J.; Lapierre, H., 2009b. Whole-body glucose metabolism and mammary energetic nutrient metabolism in lactating dairy cows receiving digestive infusions of casein and propionic acid. *Journal of Dairy Science*, 92 (12), 6068–82.

Machado, S. C.; Macmanus, C. M.; Stumpf, M.; Fischer, V., 2014. Concentrate: forage ratio in the diet of dairy cows does not alter milk physical attributes. *Trop Anim*

Health Prod, 46 (5), 855-59.

Markus, R., 1973. Elementos da estatística aplicada. Porto Alegre: DALC, 329.

Mertens, D. R., 1987. Predicting intake and digestibility using mathematical models of ruminal Function. *Journal of Animal Science*, 64 (5), 1548-1558.

Minson, D. J., 1990. Forage in ruminant nutrition. New York: Academic Press, 483.

Moore, D.A.; Varga, G., 1996. BUN and MUN: urea nitrogen testing in dairy cattle. *Compendium on continuing education for practicing veterinarian*, 18, 712-721.

Negri, L.; Chavez, M.; Taverna, M.; Cuatrin, A.; Rubiolo, A., 2003. Determinación de las variables que afectan la estabilidad térmica de la leche utilizando un método capilar para evaluar el tiempo de coagulación por calor. *Revista Argentina de Lactología*, 22, 33-34.

Ordóñez, J.A., Rodriguez, M.I.C., Álvarez, L.F., Sanz, M.L.G., Minguillón, G.D.G.F., Perales, L.H., Cortecero, M.D.S. 2005. *Tecnología de Alimentos: Componentes dos Alimentos e Processos*. Porto Alegre: Artmed, 1, 279.

Pereira, O. G.; Ribeiro, K. G., 2001. Suplementação de bovinos com forragens conservadas. In: *Simpósio de Produção de Gado de Corte*, 2., 2001, Viçosa, MG. *Anais... Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa*, 261-289.

Phuntsok, T.; Froetschel, M. A.; Amos, H. E.; Zheng, M.; Huang, Y. W., 1998. Biogenic amines in silage, apparent postruminal passage, and the relationship between biogenic amines and digestive function and intake by steers. *Journal of Dairy Science*, 81 (8), 2193-2203.

Qadis, A.Q; Goya, S; Ikuta, K; Yatsu, M; Kimura, A; Nakanishi, S; Sato, S., 2014. Effects of a Bacteria-Based Probiotic on Ruminal pH, Volatile Fatty Acids and Bacterial Flora of Holstein Calves. *Journal Veterinary Medicine Science.*, 76 (6), 877–885.

SAS INSTITUTE (Cary, Estados Unidos), 1989. *SAS/STAT user's guide: version 6*. 4th ed. Cary, NC.

Stone, W. C., 2004. Nutritional approaches to minimize subacute ruminal acidosis and laminitis in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 87, 13-26.

Tronco, V. M., 2007. *Manual para inspeção e qualidade do leite*. Santa Maria: Ed. Da UFSM, 192.

Villeneuve, M. P.; Lebeuf, Y.; Gervais, R.; Tremblay, G. F.; Vuilleumard, J. C.; Fortin, J.; Chouinard, P. Y., 2013. Milk volatile organic compounds and fatty acid

profile in cows fed timothy as hay, pasture, or silage. *Journal of Dairy Science*, 96 (11), 7181-94.

Wall, E. H.; Mcfadden, T. B., 2012. A local affair: How the mammary gland adapts to changes in milking frequency. *Journal of Animal Science*, 90 (5), 1695-1707.

Walstra, P.; Jenness, R., 1999. *Dairy Technology: principles of milk properties and processes*. Food Science and Technology, 727.

Wildman, E.; Jones, G.M.; Wagner, P.E., 1982. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *Journal of Dairy Science*, 65 (3), 495-501.

Win, S. K.; Ueda, K.; Kondo, S., 2015. Effect of grass hay proportion in a corn silage-based diet on rumen digesta kinetics and digestibility in dairy cows. *Journal Animal Science*.

Yang, W.Z.; Beauchemin, K.A., 2005. Effects of physically effective fiber on digestion and milk production by dairy cows fed diets based on corn silage, *Journal of Dairy Science*, [S.l.], 88, 1090-1098.

Zanela, M. B.; Fischer, V.; Ribeiro, M. E. R.; Barbosa, R. S.; Marques, L. T.; Stumpf Jr, W.; Zanela, C., 2006. Leite instável não ácido e composição do leite de vacas Jersey sob restrição alimentar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41 (5), 835-40.

Zyl, V.; Meeske, R.; Scholtz, G. D. J.; Einkamerer, O. B., 2014. The effect of lucerne (*Medicago sativa*) hay quality on milk production and composition of Jersey cows. *Journal of Animal Science*, 44 (5), 25-30.

CAPÍTULO IV

Intensidade do estresse por calor influencia distintamente o efeito benéfico do provimento de sombra sobre a produção e as características físico-químicas do leite⁵

⁵ Artigo escrito de acordo com as normas da *Animal*

Intensidade do estresse por calor influencia distintamente o efeito benéfico do provimento de sombra sobre a produção e as características físico-químicas do leite

Intensity of heat stress affects differently the beneficial of shade provision on milk yield and physical chemical traits

Resumo

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da intensidade do estresse por calor sobre a magnitude do efeito do provimento de sombra na produção leiteira e características físico-químicas do leite. Em climas quentes, valores elevados de temperatura, radiação solar e umidade são os principais fatores ambientais que impõem estresse aos animais. Foram realizados dois estudos. O primeiro, em Itapiranga/SC, foi conduzido durante o verão, de 25/01 a 03/03 de 2011. Foram utilizadas dezesseis vacas Holandesas em lactação, mantidas em pastoreio. Os animais apresentaram 520 ± 74 kg de peso corporal, escore de condição corporal de $3,0 \pm 0,3$, produção de $21,5 \pm 4,2$ kg de leite / dia e $120 \pm 61,2$ dias em lactação. O segundo experimento foi realizado no verão, de 24/01 a 07/02 de 2013 em Lages/SC quando foram usadas 14 vacas em lactação, das quais 10 Holandesas e quatro mestiças Holandês x Jersey, em pastagem. Os animais apresentaram $537,6 \pm 93,5$ kg de peso corporal, escore de condição corporal de $2,8 \pm 0,3$, $2,7 \pm 1,5$ lactações, produção de $20,6 \pm 6,5$ kg de leite / dia e $149,3 \pm 48,9$ dias em lactação. Em

cada um dos experimentos, os animais foram divididos em dois grupos, e foram submetidos sequencialmente a períodos de acesso à sombra (todos os animais), privação de sombra (apenas um dos grupos) e acesso à sombra (todos os animais). O delineamento foi o completamente casualizado, considerando o efeito de dia, tratamento aninhado dentro de dia e as medidas realizadas no período de adaptação foram usadas como covariáveis. As condições de estresse por calor foram mais severas em Itapiranga comparado a Lages. A privação de sombra em condições de estresse moderado a severo em Itapiranga reduziu a produção de leite, a estabilidade do leite no teste do álcool, os teores de proteína, enquanto aumentou o valor de acidez titulável, os teores de gordura e de nitrogênio ureico. Em condições amenas em Lages, a privação de sombra tendeu a reduzir o teor de lactose sem modificar a produção e demais características físico-químicas. A intensidade do estresse por calor modifica a resposta produtiva dos animais à privação de sombra. Somente os animais em estresse térmico moderado à severo apresentaram respostas produtivas ao acesso à sombra.

Palavras chave: estresse calórico, vaca leiteira, alterações no leite

Abstract

This trial aimed to evaluate the effect of the intensity of heat stress affecting the magnitude of the beneficial effects of access to shade on milk production and physicochemical characteristics of milk. In hot climates, high temperature, high humidity and solar radiation are the main environmental

factors that impose stress to the animals. Two studies were done. The first, in Itapiranga / SC, was conducted during summer from January 25th to March 3rd 2013 and used 16 lactating Holstein dairy cows, kept on pasture. The animals showed BW= 520 ± 74 kg, BCS = 3.0 ± 0.3, MY= 21.5 ± 4.2 kg and DIM = 120 ± 61.2. The second experiment was carried out from January 24 to February 7, 2013 in Lages / SC when 14 lactating Holstein and Jersey x Holstein crossbred cows were used. Cows showed BW = 537.6 ± 93.5 kg, BCS = 2.8 ± 0.3, MY = 20.6 ± 6.5 kg and DIM = 149.3 ± 48.9 days. In both trials, cows were allocated into treatments (with and without shade) according to the completely randomized design, considering the effect of day, treatment nested within days and the measurements performed in the adaptation period were used as covariates. The heat stress conditions were more severe in Itapiranga compared to Lages. Privation of access to shade under moderate to severe stress conditions in Itapiranga reduced milk production, milk stability into the alcohol test, contents of protein and lactose, while increased the titratable acidity, fat and urea nitrogen contents. In mild conditions as in Lages, privation of access to shade tended to reduce the lactose content without modifying the milk yield as well as the remaining physicochemical characteristics. The intensity of heat stress modifies the productive response of animals to shade deprivation, just animals under moderate to severe heat stress changes productive traits according to access to shade.

Key words: heat stress, dairy cow, changes in milk

Introdução

O Brasil possui cerca de dois terços de seu território situados na faixa tropical do planeta, onde, durante grande parte do ano, predominam altas temperaturas, ultrapassando os 30°C nas horas mais quentes do dia, se tornando um fator de restrição para a produção de bovinos leiteiros, principalmente nos sistemas intensivos confinados ou em pastoreio (Neves et al., 2009). Em climas quentes, valores elevados de temperatura, umidade e radiação solar direta e indireta são os principais fatores ambientais que impõem estresse aos animais (Kadzere et al., 2002; Silanikove, 2000). Esta situação é frequente no manejo de vacas leiteiras nos trópicos e subtropicais, causando reduções na produção e mudanças na composição do leite (Silanikove et al., 2009). O estresse calórico ocorre quando a temperatura corporal (TC) excede o intervalo específico para a atividade normal resultante a partir de uma carga total de calor excedendo a capacidade de dissipação. Respostas comportamentais e fisiológicas são iniciadas para aumentar a perda e reduzir a produção de calor na tentativa de manter a temperatura do corpo dentro do intervalo de normalidade (Horowitz, 2002; Yousef, 1985).

Os bovinos possuem uma maior taxa metabólica em relação aos outros ruminantes domésticos e um mecanismo de retenção de água pouco desenvolvido nos rins e intestinos (Macfarlane, 1972). Com isso a aclimação dos animais envolve respostas fenotípicas, hormonais e para o animal se adaptar depende da resposta do tecido alvo e pode levar dias até várias semanas (Collier, 2006; Horowitz, 2001). Segundo O'Brien et al. (2010), o primeiro sinal relacionado ao estresse é a diminuição do consumo de

nutrientes, uma estratégia do metabolismo para diminuir o incremento calórico da alimentação.

Animais da raça Holandesa com alta taxa metabólica como vacas em lactação requerem temperaturas ambientais de conforto entre 5 e 23°C para a máxima expressão de seu potencial genético. Porém, valores acima desta faixa são facilmente verificados na maioria das regiões do Brasil, durante boa parte do ano. Isto ocorre principalmente nas regiões de baixa latitude durante o verão, caracterizadas por elevados níveis de radiação solar e altas temperaturas (Dikmen e Hansen, 2009). Programas de melhoramento genético podem aumentar a susceptibilidade do animal a altas temperaturas ambientais (Kadzere et al., 2002). Por outro lado, é possível selecionar animais mais tolerantes ao calor (McManus et al. 2009, 2010), Entretanto, para melhorar o bem-estar, a produção e as performances de reprodução é preciso modificar o ambiente em que os animais se encontram (West, 2003; Mader et al., 2006). Apesar dos efeitos benéficos da sombra serem reconhecidos (Renaudeau et al., 2012), muitos produtores não possuem sombra para seus animais. Entretanto a falta de registros da produção leiteira pode ocultar esse problema (Hötzel et al., 2013). Além disso, existem carências em comparar seus efeitos em condições distintas de estresse por calor (Frazzi et al., 1996; Barbosa et al., 2004). Os efeitos do estresse calórico sobre a produção leiteira podem ser separados em duas causas distintas: associados à diminuição do consumo e aos efeitos fisiológicos e/ou metabólicos diretos do estresse calórico (Cowley, 2015). Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da intensidade do

estresse por calor sobre a magnitude do efeito do provimento de sombra na produção leiteira e características físico-químicas do leite.

Material e métodos

Esse estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob o número 21901 e constou de dois experimentos.

Experimento 1 - Itapiranga

Foi conduzido de 25 de janeiro a 03 de março de 2011: 14 dias de período pré- experimental (dias 1 a 14); 10 dias de período experimental com aplicação do tratamento com sombra (CS) e sem sombra (SS) (dias 15 a 24) e 14 dias de período pós-experimental (dias 25 a 38), totalizando 38 dias em uma propriedade familiar no município de Itapiranga/SC, Brasil (latitude - 27° 05' 05", longitude 53° 35' 38" e altitude de 320 metros acima do nível do mar), caracterizada por clima temperado subtropical úmido (Köppen, 1931).

Foram utilizadas 16 vacas em lactação da raça Holandês selecionadas para constituir um grupo semelhante em relação à produção de leite, período de lactação e Escore de Condição Corporal (ECC), que posteriormente foi dividido em dois grupos: sem acesso à sombra e com acesso à sombra. No início do experimento, os animais apresentaram 520 ± 74 kg de peso corporal (PC), escore de condição corporal (ECC) de $3,0 \pm 0,3$, produção de $21,5 \pm 4,2$ kg de leite / dia e $120 \pm 61,2$ dias de produção de leite. Os animais permaneceram em pastoreio contínuo de Tifton 85 (*Cynodon*

dactylon) com massa superior a 2500 kg de massa seca/ha. Os piquetes com formato aproximadamente retangular tinham área com sombra natural de árvores na sua extremidade menor. Durante os primeiros 14 dias, todas as vacas tinham livre acesso à sombra. As vacas do tratamento (SS) foram privadas do acesso à área sombreada pela colocação de uma cerca, evitando a sua entrada embaixo das árvores, nos dias 15 a 24. Posteriormente, por mais 14 dias, todas as vacas tiveram acesso à área sombreada. Os piquetes ficaram distante 200 m da sala de ordenha e do galpão de alimentação.

As vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia às 6 e às 18h e a suplementação foi fornecida em cocho após as duas ordenhas, constando de silagem de milho e concentrado comercial (Tabela 1). Foi fornecido 1 kg de concentrado para cada 3 kg de leite produzido, e ao início do experimento elas receberam 7 kg de concentrado, o qual foi posteriormente ajustado em função da produção leiteira.

Tabela 1 - Composição bromatológica dos alimentos.

Alimentos	Teores médios de nutrientes (%MS)				
	MS	PB	EE	FDN	NDT
Capim Tifton 85	28	12	2,5	65	65
Silagem de Milho	30	8	2,5	49	68
Ração Comercial	88	20	3,0	20	75

MS - Massa Seca; PB - Proteína Bruta; EE - Extrato Etéreo; FDN - Fibra em Detergente Neutro; NDT - Nutrientes Digestíveis Totais.

Mensurações realizadas

O peso dos animais foi feito com a fita torácica no início do experimento, pela manhã logo após a chegada dos animais no local de alimentação. A avaliação da condição corporal dos animais foi realizada de acordo com uma escala de 1 a 5 (Willdman et al., 1982). A produção leiteira foi mensurada utilizando medidores mecânicos, nas ordenhas da manhã e da tarde, nos dias 1, 9, 14, 16, 17, 18, 22, 24, 28, 31, 35 e 38 após o início do experimento. A composição do leite de cada vaca foi avaliada em amostras de leite provenientes da mistura proporcional do leite das ordenhas matutina e vespertina nos dias 1, 9, 14, 18, 22, 24, 31 e 38 após o início do experimento, subdivididas em sub-amostras por animal. Um lote de amostras foi colocado em frascos plásticos, adicionado de Bronopol para análises de composição, nitrogênio ureico (NUL) e contagem de células somáticas (CCS), outra parte foi colocada em frascos plásticos contendo azidiol para análise de contagem bacteriana total (CBT), analisadas pelo método de contagem eletrônica por citometria de fluxo. E o outro lote de amostras foi destinado à análise das características físicas do leite como: acidez titulável pelo método de Dornic (Tronco, 2007), densidade com o uso do termolactodensímetro, estabilidade ao etanol em diferentes concentrações (72, 74, 76, 78 e 80% de etanol v/v), onde se registrou a menor concentração de etanol capaz de induzir a coagulação (Tronco, 2007), sódio por potenciometria, crioscopia e tempo de coagulação no tanque (TCT), (Negri, 2002). Essas amostras foram transportadas refrigeradas sem o uso de conservantes e as referidas análises físicas foram executadas logo após a coleta.

Experimento 2 - Lages

Foi conduzido no setor de gado leiteiro da Universidade de Santa Catarina (UDESC-CAV), localizado na cidade de Lages - SC, Brasil (latitude - 27 ° 48 '58' ', longitude 50 ° 19' 34 " e altitude de 910 metros), com umidade relativa média de 79,3%, caracterizada por clima temperado subtropical (Köppen, 1931), no período de 24/01 a 07/02 de 2013, totalizando 15 dias. Foram utilizadas 14 vacas em lactação, 10 da raça Holandesa e quatro mestiças Holandês x Jersey, as quais foram selecionadas do rebanho experimental para constituir um grupo semelhante em relação à produção de leite, ordem de nascimento, raça, período de lactação e CCS. Inicialmente os animais apresentaram $537,6 \pm 93,5$ kg de peso corporal, ECC de $2,8 \pm 0,3$, $2,7 \pm 1,5$ lactações, $20,6 \pm 6,5$ kg de leite / dia e $149,3 \pm 48,9$ dias em leite. Os animais pastorearam em sistema contínuo de grama Sudão (*Sorghum sudanense L.*) e capim Papuã (*Brachiaria plantaginea*) com massa de forragem mantida acima de 3000 kg de massa seca/ha com oferta aproximada de 10 kg de MS/100 kg de peso vivo/dia. Os piquetes com formato aproximadamente retangular tinham área com sombra natural de árvores (Eucaliptos) na sua extremidade menor. No início do período experimental as vacas foram distribuídas em dois grupos com sete vacas cada, os quais foram colocados em dois piquetes (A e B) com 0,8 ha cada, compostas por grama Sudão (*Sorghum sudanense L.*) e capim Papuã (*Brachiaria plantaginea*), onde um dos grupos teve acesso à sombra, enquanto o outro grupo não.

Durante os primeiros 5 dias até 28/01, todas as vacas tinham livre acesso à sombra. Entre 29/01 a 01/02, as vacas do tratamento (SS) foram privadas do

acesso à área sombreada pela colocação de uma cerca, evitando a sua entrada embaixo das árvores.

As vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia às 6 e 18h, e a suplementação foi fornecida depois das duas ordenhas. Este suplemento foi composto de 200 g/kg de farelo de soja, 750 g/kg de milho moído, 30 g/kg de sal mineral Novo Bovigold e 20 g/kg de bicarbonato de sódio e continha 88% MS, 16% PB, 8% FDN e 75% NDT/kg (base da MS).

Mensurações realizadas

As vacas foram avaliadas quanto ao seu ECC: 1-5 escala; Edmonson et al.(1989) e foram pesadas individualmente nos dias 1, 5 e 10, depois da ordenha da manhã . A produção de leite foi medida nas ordenhas matutinas e vespertinas utilizando medidores de leite em cada ordenha entre os dias 2 a 10.

A composição do leite, CCS, estabilidade no teste do álcool, pH, acidez titulável, sódio e NUL de cada vaca foram avaliadas em amostras de leite provenientes da mistura proporcional das ordenhas matutina e vespertina nos dias 5 a 10. No dia 0, o pasto foi coletado em cinco locais pastejados pelos animais, os quais foram selecionados depois de observar o comportamento de pastejo de vacas. O pasto foi cortado com tesoura de esquila dentro da área de um quadro de medição (20 cm x 20 cm). Os teores de massa seca (MS), proteína bruta (PB), fibra bruta (FB), extrato etéreo (EE) e cinzas foram determinados (AOAC, 2004). A pastagem no piquete com sombra conteve 171 g / kg de MS de PB, 208 g / kg de FB e 691 g / kg de nutrientes digestíveis

totais (NDT) enquanto a pastagem no piquete sem sombra conteve 156 g / kg de MS de PB, 224 g / kg da FB e 712 g / kg de NDT.

A medição da temperatura do ar e umidade relativa do ar foi realizada por estação portátil HT-500, colocada a 1,5 m acima do solo e instalada na área sombreada e ensolarada dos piquetes. O índice de temperatura e umidade (ITU) foi usado como um indicador de conforto térmico e foi calculado usando a temperatura do ar (TA) e umidade relativa (UR) para todos os dias do experimento, usando a fórmula (ROSENBERG et al., 1983): $ITU = (0,8 \times TA + (UR/100) \times (TA - 14,4) + 46,4$, onde TA = temperatura do ar em °C e UR = umidade relativa %. O ITU foi utilizado para classificar o estresse por calor como ameno (72 a 78), moderado (79 a 88) e severo (89 a 98), conforme Smith et al. (2013).

Análise estatística

As vacas foram consideradas as unidades experimentais. Os dados de natureza contínua como os valores de produção de leite, TCT, crioscopia, densidade, pH, acidez titulável, concentrações de gordura, proteína, lactose, sólidos totais, NUL e sódio no leite, CCS transformada por \log_{10} ($\log_{10}CCS$) e CBT transformada por \log_{10} ($\log_{10}CBT$) foram submetidos ao teste de normalidade e posteriormente foram submetidos à análise de variância considerando o efeito de dias, tratamento (com e sem sombra) hierarquizado dentro de tratamento e foram usados como covariáveis os mesmos atributos mensurados no período de adaptação, quando todos os animais tiveram acesso à sombra. Foram usados os procedimentos univariate (teste de

normalidade) e o mixed do SAS (enterprise guide 5.2). As médias foram separadas pelo Lsmeans opção pdiff. Foi adotado o nível de 0,05 de probabilidade para rejeição da hipótese de nulidade.

Resultados

Experimento 1 - Itapiranga

Foram observadas grandes variações de temperatura e UR do ar entre manhã, tarde e noite, entre os piquetes na sombra e no sol, bem como entre os dias (Tabela 2). As temperaturas avaliadas às 9h e às 15h para o grupo (SS) foram superiores quando comparado com o grupo (CS), ocorrendo o inverso em relação à UR do ar. Com relação ao horário das 21h, a temperatura e a umidade foram semelhantes para os dois grupos avaliados. Em vários dias foram observados valores severos de ITU no piquete do grupo SS (Tabela 2).

Tabela 2. Valores de temperatura do ar (TA), umidade relativa (UR) e índice de temperatura e umidade (ITU) medidos nos piquetes com e sem sombra às 9h, 15h e 21h.

Fase	Com sombra						Sem sombra					
	pré	Experimental				Pós	pré	Experimental				Pós
Dias												
experimento	14	18	22	24	31	38	14	18	22	24	31	38
ITU 09:00 h***	73,7	71,6	68,8	69,8	74,8	72,0	81,0	72,8	90,3	90,9	90,4	73,4
ITU 15:00 h***	77,5	78,0	78,2	81,2	73,6	76,5	85,4	82,4	89,7	83,7	78,0	80,4
ITU 21:00 h***	71,6	70,7	72,2	72,8	66,2	67,8	71,0	73,1	73,8	81,9	71,4	69,0

* TA = temperatura do ar (°C); ** UR = umidade relativa (%); ***ITU =

$$(0,8 \times TA) + (UR/100) \times (TA - 14,4) + 46,4$$

A produção de leite diferiu ($P < 0,05$) apenas no dia 24 do experimento, quando os animais do grupo CS produziram 19,6 L de leite por dia enquanto que os animais do grupo SS produziram apenas 13 L/dia chegando a reduzir em 38% na produção de leite (Tabela 4). A privação de sombra reduziu a estabilidade no teste do álcool nos dias 18 ($P < 0,10$) e 22, 24 e 31 ($P < 0,05$). Não houve diferença quanto à estabilidade no teste do álcool no dia 38. A estabilidade térmica foi reduzida ($P < 0,05$) no dia 24, não apresentando diferença entre os grupos nos demais dias (Tabelas 3 e 4).

Vacas privadas do acesso à sombra produziram leite com maior teor de gordura nos dias 22 ($P < 0,10$) e 24 ($P < 0,05$), mas menores teores de proteína nos dias ($P < 0,05$) 18, 22 e 24. Nos dias 22 e 24, as vacas sem acesso à sombra produziram leite com maior acidez titulável ($P < 0,05$), mas menor densidade nos dias 18 e 38 ($P < 0,05$). O grupo SS produziu leite com maior

concentração de nitrogênio ureico que o grupo CS nos dias 18, 22, 24, 31 e 38. A privação de sombra não influenciou os valores de Na, CCS e CBT entre os grupos nos dias avaliados (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Valores da probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade dos efeitos de dia, tratamento hierarquizado dentro de dia e do ajuste por covariância da produção de leite e características produtivas de vacas com e sem acesso à sombra sob estresse térmico moderado a severo

Atributos	Dia	Tratamento (dia)	Cov
Prod. Leite (L)	0,0007	0,0054	< 0,0001
Álcool (%v/v)	0,0542	0,0002	< 0,0001
TCT (seg)	NS	0,0418	NS
Gordura Bruta (g/100g)	NS	0,0386	< 0,0001
Proteína Bruta (g/100g)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Lactose (g/100g)	0,0061	NS	< 0,0001
Acidez (°D)	0,0095	0,0009	0,0006
Densidade (g/mL)	< 0,0001	0,0004	NS
CCSc (x1000cél/mL)	NS	NS	< 0,0001
CBTc (x1000ufc/mL)	< 0,0001	NS	0,0150
Sódio (mg/L)	0,0744	NS	NS
Nitrogênio Ureico (mg/dL)	0,0003	0,0033	0,0088

TCT - tempo de coagulação no tanque; CCSc - contagem de células somáticas corrigida; CBTc - contagem bacteriana total corrigida

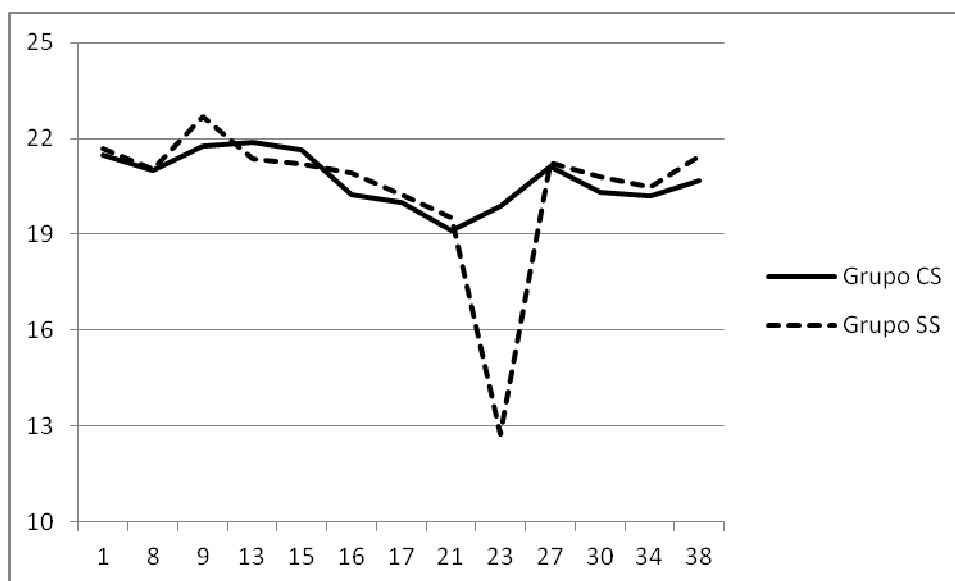


Figura 1. Produção de leite diária de vacas com e sem acesso à sombra sob estresse moderado a severo, nos períodos pré-experimental (dias 1 a 14), experimental (estresse) (dias 15 a 24) e pós-experimental (dias 25 a 38)

Tabela 4. Valores médios da produção leiteira e atributos físico-químicos de vacas com sombra e sem acesso à sombra sob estresse térmico moderado a severo

Atributo	Trat	Dias				
		Estresse			Pós (recuperação)	
		14	22	24	31	38
Produção	SS	20,5 a A	19,7 a A	13,0 b B	21,4 a A	21,7 a A
Leite (L)	CS	19,9 a A	18,9 a A	19,6 a A	20,6 a A	20,4 a A
Álcool (%v/v)	SS	73,6 a A	70,6 b AB	67,9 b B	71,6 b AB	74,6 a A
	CS	77,2 a A	76,8 a A	74,9 a A	76,8 a A	75,9 a A
TCT	SS	133,8 a AB	131,9 a AB	48,8 b B	133,2 a AB	204,4 a A

(seg)	CS	172,8 a A	198,1 a A	190,6 a A	198,1 a A	220,6 a A
Gordura	SS	3,34 a B	3,66 a AB	3,89 a A	3,53 a AB	3,34 a B
Bruta (g/100g)	CS	3,58 a A	3,27 b A	3,45 b A	3,56 a A	3,53 a A
Proteína	SS	2,89 b B	2,84 b B	2,64 b C	3,05 a A	3,10 a A
Bruta (g/100g)	CS	3,04 a AB	2,98 a B	3,04 a AB	3,12 a A	3,10 a AB
Lactose	SS	4,40 a A	4,39 a AB	4,18 b C	4,39 a AB	4,24 a BC
(g/100g)	CS	4,39 a AB	4,35 a AB	4,35 a AB	4,40 a A	4,26 a B
Acidez	SS	15,3 a C	18,4 a B	22,4 a A	16,4 a BC	15,9 a BC
Titulável (°D)	CS	15,1 a A	15,3 b A	15,7 b A	15,8 a A	15,8 a A
Densidade	SS	1028,0 b B	1028,6 b B	1028,3 a B	1031,5 a A	1032,0 a A
(g/mL)	CS	1029,5 a A	1030,2 a A	1029,2 a B	1030,5 a A	1030,5 b A
Log ₁₀ CCS	SS	5,6 a AB	5,59 a AB	5,50 a B	5,84 a A	5,83 a A
(x1000cel/mL)	CS	5,85 a A	5,78 a A	5,70 a A	5,85 a A	5,73 a A
Sódio	SS	----	380,6 a A	231,5 a A	----	278,1 a A
Leite (mg/L)	CS	----	334,5 a A	235,2 a A	----	229,1 a A
Nitrogênio	SS	23,1 a A	20,6 a B	24,0 a A	23,4 a A	24,4 a A
Ureico (mg/dL)	CS	19,7 b BC	18,3 a B	21,5 b AC	21,3 a A	22,4 a A

a,b são avaliados na coluna, A,B são avaliados na linha, diferentes letras na coluna ou diferentes letras na linha representam diferença significativa (P<0,05). TCT - tempo de coagulação no tanque; CCS - contagem de células somáticas;

Experimento 2 - Lages

Foram observadas variações de temperatura e UR do ar entre manhã, tarde e noite, bem como entre os dias, mas diferenças moderadas foram observadas entre áreas com e sem sombra (Tabela 5). Em geral, a temperatura e ITU foram inferiores às 9h, em comparação com as que estão em 15h, e as medições às 21h foram intermediárias. Para UR do ar, os menores valores ocorreram geralmente às 15h nos piquetes sem sombra. Os valores de ITU foram mais elevados nos dias 1, 2 e 4 nos horários 15 e 21h.

Tabela 5. Temperatura do ar, umidade relativa e ITU medidos nos piquetes com e sem sombra às 9h, 15h e 21h.

Atributos	Com sombra (CS)					Sem sombra (SS)			
	Dia experimental					Dia/Mês			
	5	6	7	8	9	6	7	8	9
ITU 09:00 h***	62.0	63.3	63.2	64.4	68.0	65.5	64.3	66.5	68.4
ITU 15:00 h ***	73.5	72.7	74.8	76.4	78.6	77.1	75.5	76.8	79.6
ITU 21:00 h***	65.4	68.5	68.0	70.2	69.9	67.6	68.0	69.3	77.8

* Tbs = temperatura de bulbo seco (°C); ** UR = umidade relativa (%); ***ITU = $(1.8 \times Tbs + 32) - [(0.55 - 0.0055 \times UR) \times (1.8 \times Tbs - 26.8)]$.

A privação de sombra reduziu apenas o teor de lactose no dia 8 ($P < 0,10$), mas não modificou a produção leiteira nem os demais atributos físico-químicos do leite (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6. Valores da probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade dos efeitos de dia, tratamento hierarquizado dentro de dia e do ajuste por covariância da produção de leite e características produtivas de vacas com e sem acesso à sombra em estresse térmico leve.

FV	Dia	Trat (dia)	Cov (Pré)
Prod. Leite (L)	NS	NS	< 0,0001
Álcool (%v/v)	NS	NS	< 0,0001
Gordura Bruta (g/100g)	NS	NS	0,0290
Proteína Bruta (g/100g)	NS	NS	< 0,0001
Lactose (g/100g)	NS	0,0938	< 0,0001
Acidez (°D)	NS	NS	< 0,0001
CCSc (x1000cél/mL)	NS	NS	< 0,0001
pH	< 0,009	0,0011	< 0,0001
Sódio (mg/L)	< 0,0001	NS	< 0,0001
NUL (mg/dL)	0,0015	NS	NS

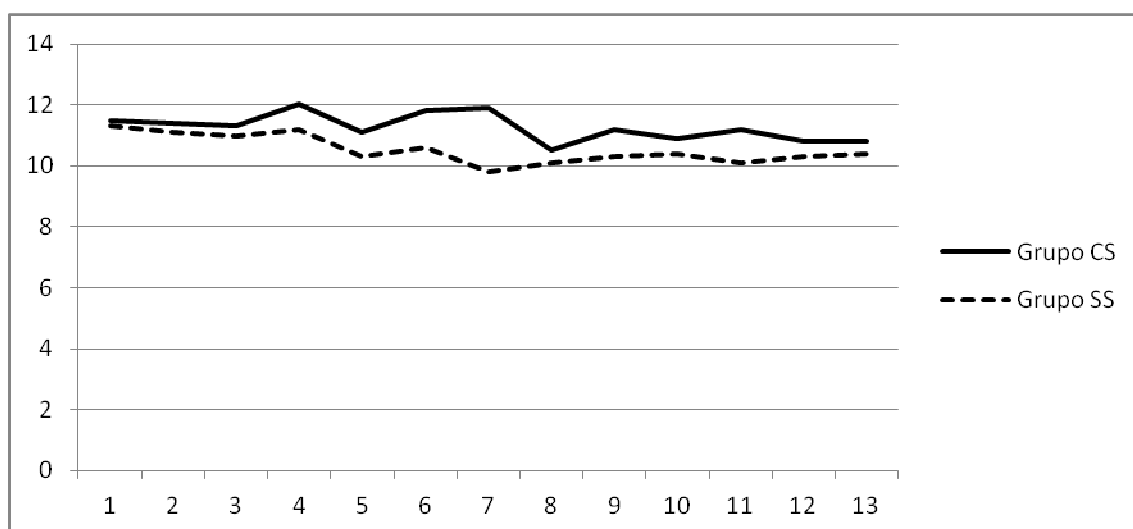


Figura 2. Produção de leite diária de vacas com e sem acesso à sombra em

estresse térmico leve, nos períodos pré-estresse (dias 1 a 5), estresse (dias 6 a 9) e pós-estresse (dias 10 a 15).

Nas mensurações realizadas durante o período de recuperação, quando o grupo de vacas privado de sombra voltou a ter acesso à sombra, não houve diferenças quanto à produção leiteira e características físico-químicas do leite, com exceção da estabilidade no teste do álcool no experimento 1 (estresse moderado a severo), a qual ainda foi menor 7 dias após o acesso à sombra em relação aos animais que sempre tiveram acesso à sombra. Foram detectadas diferenças pontuais no período de recuperação, como o valor de pH no experimento 2 (estresse leve), mas aparentemente não relacionadas ao provimento ou não de sombra.

Tabela 7. Valores médios da produção leiteira e atributos físico-químicos de vacas com sombra e sem acesso à sombra sob estresse térmico leve

Atributo	Trat	Dias				
		Estresse				Pós
		6	7	8	9	10
Produção	SS	21,1 a A	21,7 a A	20,2 a A	20,7 a A	21,2 a A
Leite (L)	CS	21,7 a A	23 a A	23,3 a A	20,6 a A	21,9 a A
Álcool (%V/V)	SS	83,3 a A	83,2 a A	82,5 a A	82,6 a A	81,6 a A
	CS	83,2 a A	83,5 a A	83,4 a A	83,4 a A	82,8 a A
pH	SS	6,81 a A	6,83 a A	6,75 a B	6,72 a BC	6,68 b C
	CS	6,83 a AB	6,88 a A	6,79 a BC	6,75 a C	6,82 a AB
Gordura Bruta						
(g/100g)	SS	3,40 a A	3,43 a A	3,50 a A	3,31 a A	3,33 a A
	CS	3,57 a AB	3,43 a AB	3,69 a A	3,63 a AB	3,30 a B
Proteína Bruta	SS	3,40 a A	3,33 a A	3,36 a A	3,41 a A	3,32 a A
(g/100g)	CS	3,41 a A	3,32 a A	3,32 a A	3,25 a A	3,31 a A
Lactose	SS	4,59 a A	4,53 a AB	4,51 c AB	4,57 a AB	4,50 a B
(g/100g)	CS	4,62 a A	4,58 a A	4,61 d A	4,61 a A	4,56 a A
Acidez	SS	14,15 a A	13,43 a A	13,58 a A	13,00 a A	13,72 a A
Titulável (°D)	CS	14,43 a A	13,14 a A	12,85 a A	13,00 a A	13,28 a A
CCSc	SS	4,97 a A	4,87 a A	4,90 a A	4,87 a A	4,91 a A
(log ¹⁰ CCS)	CS	5,50 a A	4,95 a A	5,07 a A	5,01 a A	4,90 a A

Sódio Leite	SS	500,0 a A	355,8 a C	427,2 a B	415,0 a B	395,8 a BC
(mg/L)	CS	492,8 a A	332,8 a C	384,2 a B	378,5 a BC	363,6 a BC
Nitrogênio	SS	23,6 a A	20,7 a B	20,0 a B	20,6 a B	20,0 a B
Ureico (mg/dL)	CS	21,8 a A	21,5 a A	20,4 a AB	20,3 a AB	18,8 a B

a,b são avaliados na coluna, A,B são avaliados na linha, diferentes letras na coluna ou diferentes letras na linha representam diferença significativa ($P<0,05$); cd na mesma coluna indica tendência ($P<0,10$).

Discussão

ITU e Produção de leite

As regiões onde os estudos foram realizados apresentam grande amplitude da faixa de temperatura e umidade entre as fases diurna e noturna do dia, mas em função da continentalidade e altitude, a região de Itapiranga apresenta maiores valores de ITU, o que de fato se verificou nos anos em que foram realizados os estudos. Nessa região são observadas temperaturas muito altas, devido à proximidade da Baixa do Chaco (rio Uruguai), região de convergência de massa de ar tropical, com altos índices de temperatura e umidade. No primeiro experimento, em Itapiranga, o estresse calórico foi moderado a severo, com valores de ITU superiores a 90 em alguns dias. Segundo Smith et al. (2013) o ITU pode ser utilizado para classificar o estresse calórico em ameno ou brando (72 a 78), moderado (79 a 88) e severo (89 a 98). Campos (2002) propuseram um valor máximo de 75 para ITU, visando ao conforto térmico do rebanho leiteiro da raça Holandesa. Esses autores

observaram que valores iguais ou inferiores a 70 não causaram nenhum desconforto térmico para vacas leiteiras. Entretanto, para valores iguais ou superiores a 75, a produção de leite e ingestão de alimentos foram seriamente prejudicadas. Foi sugerido que o valor mínimo de ITU para considerar a ocorrência do estresse por calor deve ser reduzido para 68 (Zimbelman et al., 2009), especialmente para vacas de elevada produtividade.

A redução da produção leiteira das vacas do experimento 1 sob estresse calórico severo e privação de sombra efetivamente chegou a valores próximos de 40%, como já fora notado previamente por outros autores (Soriani et al., 2013; West, 2003) e provavelmente está relacionada parcialmente à menor ingestão de alimentos. O consumo de alimentos não foi avaliado, porém foi constatado menor tempo de pastejo nas vacas sem acesso à sombra (169 minutos), em relação àquelas com acesso ao pasto, (258 minutos). A diferença de produção leiteira entre os grupos com e sem acesso à sombra no experimento 1 pode ser explicada pela atenuação da radiação solar e consequente redução da temperatura corporal nas vacas com acesso a sombra (Mitlöhner et al, 2001; Kendall et al, 2006; Tucker et al, 2008). A recuperação da produção leiteira dos animais do experimento 1 após provimento de sombra aos animais (Figura 1) provavelmente foi relacionada aos efeitos de redução da radiação solar e redução da temperatura corporal.

A redução do consumo de alimentos provoca um período de balanço energético negativo (BEN), no qual o consumo de alimentos não compensa as perdas energéticas (Drackley, 1999). Baccari Júnior (2001) aponta três fatores para justificar o declínio da produção de leite observada em condições de

estresse calórico, primordialmente, a redução do consumo de alimentos, seguida da hipofunção da tireóide e a energia despendida para eliminar o excesso de calor corporal. Ainda segundo o autor, a redução do consumo se intensifica, à medida que o estresse calórico aumenta, devido principalmente, a inibição do centro do apetite localizado no hipotálamo, resultante da hipertermia corporal. Outro fator são as alterações metabólicas, tais como aumento do gasto energético por tecidos não mamários. Vacas em balanço energético negativo decorrente de estresse térmico, apesar de ingerirem menos, não apresentam reduções na secreção e na sensibilidade à insulina e podem ter seus níveis de somatotropina reduzidos (Wheelock et al., 2010). Dessa forma, as vacas se tornam metabolicamente inflexíveis, uma vez que as mesmas não podem oxidar ácidos graxos para gerar energia, pois esse processo contribui no incremento de calor metabólico (Baumgard & Rhoads, 2013). Um terceiro fator para explicar a redução da produção leiteira e alterações em sua composição foi proposto por Silanikove et al. (2009), os quais sugerem que, sob estresse térmico agudo, ocorre aumento na concentração de um peptídeo derivado da clivagem da β -caseína pela plasmina, o qual bloqueia os canais de potássio da membrana apical das células epiteliais mamárias, promovendo despolarização potencial da membrana, reduzindo o metabolismo celular, sua atividade secretória e, por conseguinte, diminuindo a produção láctea e a síntese de seus componentes como a proteína e gordura. Além disso, as condições de estresse decorrentes das elevadas temperaturas, além de alterarem o comportamento (Renaudeau et al., 2012; Silanikove, 2000) e as condições metabólicas (Bernabucci et al., 2014; Baumgard & Rhoads, 2013),

também podem prejudicar a resposta fisiológica das vacas aos estímulos de ejeção de leite durante a ordenha, uma vez que em situações de estresse, a síntese e secreção de ocitocina durante a ordenha podem ser prejudicadas, e agravar os efeitos negativos do estresse calórico sobre a produção de leite, pois elevadas concentrações plasmáticas de cortisol prejudicam a síntese e secreção de ocitocina pela hipófise (Bruckmaier et al., 1993).

A severidade do estresse por calor depende de flutuações diurnas e noturnas de temperaturas. Se a temperatura ambiente apresentar valores inferiores a 21° C durante a noite por 3 a 6 horas, o animal dissipa o calor adquirido durante o dia (Muller et al., 1994; West, 2003; Silanikove et al., 2009;), que pode permitir ingestões de alimento e produções leiteiras semelhantes. No experimento 2, com exceção do dia 4, os animais foram expostos por mais de 6 horas durante o período noturno a temperaturas inferiores a 21°C, indicando que teriam se beneficiado do resfriamento noturno. No experimento 1, os animais ficaram menos de 6 horas expostos a temperaturas abaixo de 20°C.

No segundo trabalho em Lages, o resfriamento noturno ocorreu, e levando isso em consideração, se podem esperar efeitos benéficos de resfriamento natural durante a fase noturna nas características produtivas exibidas durante a fase diurna. De fato, foi a produção de leite dos dois grupos, independentemente do acesso à sombra, foi semelhante (Figura 2). Resultados semelhantes foram relatados por Silanikove et al. (2009). O fato da produção de leite não ter sido reduzida no experimento 2 pode estar relacionada ao baixo desafio imposto pelo estresse calórico, já que todas as vacas apresentaram

produção de leite moderada antes do julgamento (West, 2003). Pode ser que eles compensaram parcialmente a ingestão de MS devido ao efeito de resfriamento durante a noite (Kadzere et al., 2002; Silanikove et al., 2009) em comparação com os animais de maior potencial de rendimento que são mais sensíveis ao estresse térmico (Silanikove, 2000; Kadzere et al., 2002). De acordo com Titto (1998) a recuperação da produção leiteira após o estresse térmico ocorre lentamente e sua magnitude varia com a intensidade e a duração do estresse, além da fase da lactação dentro dos limites fisiológicos da glândula mamária, podendo recuperar totalmente a produção normal ou até comprometer toda lactação.

Estabilidade do Leite e Acidez Titulável

Os efeitos do estresse por calor reduzindo a estabilidade do leite no teste do álcool e no teste do tempo de coagulação, verificada nos animais sem acesso à sombra no experimento 1, podem ser relacionados parcialmente à redução do consumo de alimento. Apesar do consumo total não ter sido mensurado, algumas medidas apontam nessa direção como a expressiva redução dos tempos diurnos de ruminação de 133 para 37 minutos, do tempo de pastejo de 258 para 169 minutos e do aumento do tempo em estação de 195 para 345 minutos (Fischer et al., 2014). Em outros estudos, a restrição de consumo resultou em redução na estabilidade do leite (Zanela et al., 2006; Fruscalso et al., 2013; Stumpf et al., 2013). Por outro lado, quando submetidos ao estresse térmico leve, como no experimento 2, não houve diferenças significativas nos tempos diurnos de pastejo e em estação, mas apenas uma

redução pequena no tempo de ruminação de 178 para 145 minutos (Fischer et al., 2014).

Distúrbios metabólicos provenientes do estresse por calor, ao alterar de forma significativa as condições fisiológicas do animal, apresentam grande potencial de reduzir a estabilidade do leite, conforme percebido por Marques et al., (2011) ao induzirem acidose metabólica através do fornecimento de sal aniônico em bovinos leiteiros. O estresse térmico pode efetivamente induzir acidose ruminal e metabólica (Kadzere et al., 2002), o que poderia aumentar a concentração de cálcio iônico do leite (Marques et al., 2011), reduzindo a estabilidade do leite. Um fator que predispõe à redução na estabilidade do leite é relacionado ao aumento na permeabilidade das junções firmes das células epiteliais da glândula mamária, devido à restrição alimentar severa (Stumpf et al., 2013) ou estresse por isolamento social (Stelwagen et al., 2000), o que permite a passagem de K^+ e lactose do leite para o sangue e o influxo de cloretos e Na^+ do sangue para o lúmen alveolar (Lacy-Hulbert et al., 1999; Stumpf et al., 2013). Isso poderia elevar a força iônica, reduzir a constante dielétrica no leite e enfraquecer as forças que previnem a coagulação da proteína (Chavez et al., 2004), o que reduz a estabilidade das caseínas.

O aumento da acidez titulável observado no experimento 1 nos animais privados de sombra pode estar relacionado à provável acidose metabólica provocada pela hiperventilação observada nos animais sem acesso à sombra (117,6 resp/min) comparado com as vacas com acesso à sombra (80 resp/min). (Freitas et al., 2010; González e Silva, 2006; Sucupira e Ortolani, 2003; Hahn e Mader, 1997). Esses resultados estão em desacordo com os de

outros autores (Bernabucci e Calamari, 1998; Calamari e Mariani, 1999), os quais verificaram valores de pH mais alto no leite e de acidez titulável mais baixos em animais em estresse térmico.

Os menores valores de densidade do leite produzido por animais sem acesso à sombra no experimento 1 podem ser explicados em parte pelo menor teor de proteína e lactose verificados no presente trabalho, os quais contribuem para aumentar a densidade, mas maior teor de gordura observado nesse estudo, a qual contribui para reduzir a densidade (González e Campos, 2001; Collier, 2005; Tronco, 2007).

Lactose, gordura, proteína e nitrogênio ureico do leite

Os menores teores de proteína verificados no experimento 1 e os de lactose verificados no experimento 2 no leite das vacas sem acesso à sombra podem ter relação com menor síntese de componentes lácteos mediada por (1) diminuição do aporte nutricional causada pela redução da ingestão de alimentos (Baumgard e Rhoads, 2013; Schwartz et al., 2009; Lacetera et al., 1996) e (2) redução do processo de síntese em si, provocada por aumento da atividade de plasmina, com degradação da β -caseína e alterações na membrana apical das células epiteliais mamárias (Silanikove et al., 2009) ou ainda (3) aumento do desgaste energético de outros tecidos sem a possibilidade de aumentar a oxidação dos ácidos graxos (Wheelock et al., 2010), uma vez que as vacas em estresse térmico dependem da glicose e do catabolismo de aminoácidos para gerar energia (Baumgard e Rhoads, 2013).

O aumento do teor de gordura observado no experimento 1 pode ter sido devido à redução da produção leiteira, com a concentração da produção de gordura em um volume menor de leite, hipomobilização por BEN (Lacy-Hulbert et al., 1999).

Existe variabilidade nos resultados encontrados na literatura quanto à composição do leite de animais em estresse por calor, provavelmente devido à intensidade do estresse, estágio de lactação e nível de produção dos animais, duração do estresse, entre outros. Aumento (Stumpf, 2014; Silanikove et al., 2009), redução (Bernabucci et al., 2014; Du Preez, 2000; Head, 1989; Rodriguez et al., 1985) ou manutenção (Smith et al., 2013; Cerutti, 2013) dos teores de gordura foram registrados. Nesse sentido, a modificação da composição da gordura do leite observada por Bernabucci et al. (2014), com o aumento dos ácidos graxos de cadeia longa devido à mobilização do tecido adiposo tecidual e redução dos ácidos graxos de cadeia curta pode ser relacionada à redução da produção de acetato pela redução do consumo.

Em relação à variação dos teores de proteína do leite relatados na literatura se constataram aumento (Silanikove et al., 2009), redução (Sevi e Caroprese, 2002; Bernabucci et al., 2002; Porcionatto et al., 2009; Rhoads et al., 2009; Cowley et al., 2015) ou manutenção (Cerutti, 2013; Arcaro Junior et al., 2003) dos teores proteicos, apesar de haver um consenso quanto à redução do teor de caseína (Bernabucci et al., 2002; Silanikove et al., 2009; Cowley et al., 2015). Em relação à lactose, foram constatados manutenção dos teores (Rhoads et al., 2009; Stumpf, 2014) ou redução (Wheelock et al., 2010; Silanikove et al., 2009).

O aumento do teor de NUL verificado no leite das vacas sem acesso à sombra no experimento 1 pode ter sido relacionado menor consumo com consequente desequilíbrio no aporte de aminoácidos e/ou falta de energia (Baker et al., 1995; Grant, 2005; Cowley et al., 2015) ou ao aumento do nitrogênio amoniacal ruminal ou ao aumento do catabolismo de aminoácidos teciduais como fonte de glicose para prover energia para o animal, uma vez que a oxidação de tecido adiposo se encontra inibida (Rhoads et al., 2009; Baumgard e Rhoads, 2013). O valor médio de NUL em um rebanho leiteiro deve estar entre 12-16 mg/dL (Grant, 2005; Jonker et al., 1999).

O teor de sódio não variou independente do acesso à sombra, apesar da modificação da estabilidade do leite. Valores maiores de sódio foram relacionados à maior permeabilidade das junções firmes (STELWAGEN et al., 2000) e à redução de estabilidade (STUMPF et al., 2013; TSILOULPAS et al., 2007). Por outro lado os valores de sódio podem ter sido contrabalançados pela CCS (HARON et al., 2014).

Contagem de Células Somáticas (CCS) e Contagem Bacteriana Total (CBT)

Em condições de estresse severo e leve, o provimento de sombra não alterou a CCS e CBT do leite, o que está de acordo com os resultados relatados por Ominski et al., (2002) e Cowley et al (2015). Entretanto, levantamentos da CCS de tanque em meses quentes ou frios do ano na Flórida mostram aumento do valor da CCS (Ferreira e De Vried, 2015), o que está de acordo com resultados de que elevados valores de temperatura e umidade no

verão estão relacionados ao aumento de infecções intramamárias e redução na produção de leite (Bernabucci et al., 2013; Smith et al., 2013; West, 2003).

Conclusões

Em estresse térmico leve, a privação de sombra não alterou expressivamente a produção leiteira e as características físico-químicas do leite, exceto o teor de lactose. Em estresse moderado a severo, a privação de sombra diminuiu a produção leiteira, a estabilidade do leite, a densidade e os teores de PB, mas aumentou acidez titulável e os teores gordura e NUL, sem influenciar a CCS e CBT. Uma semana após recuperar o acesso à sombra, as diferenças desapareceram. O provimento de sombra mantém a produção leiteira e a composição do leite dentro da normalidade nos animais em estresse moderado a severo, mas não traz benefícios à produção e composição do leite em condições de estresse leve.

Agradecimentos

A Fundação de Amparo a Pesquisa e a Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro para a execução das pesquisas.

À Família Eidt de Itapiranga que permitiu a realização de um dos experimentos.

À Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC) que disponibilizou sua unidade de produção leiteira para que realizasse esse experimento.

Bibliografia

André G, Engel B, Berentsen PBM 2011. Quantifying the effect of heat stress on daily milk yield and monitoring dynamic changes using an adaptive dynamic model. *Journal of Dairy Science* 94, 4502– 4513.

Arcaro Junior I, Arcaro JRP, Pozz CR, Fagundes H, Matarazzo SV, Oliveira CA 2003. Teores plasmáticos de hormônios, produção e composição do leite em sala de espera climatizada. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 7(2), 350-354.

Association Of Official Analytical Chemists 2004. *Official methods of analysis*. 2, 18 ed. AOAC, Arlington, VA, USA.

Baccari Jr F 2001. *Manejo ambiental da vaca leiteira em climas quentes*. Londrina: Universidade Estadual de Londrina. 142p.

Baker LD, Ferguson JD, Chalupa W 1995. Responses in urea and true protein of milk to different protein feeding schemes for dairy cows. *Journal Dairy Science* 78(11), 2424-2434.

Barbosa OR, Boza PR, Santos GT, Sakagushi ES, Ribas NP 2004. Efeitos da sombra e da aspersão de água na produção de leite de vacas da raça Holandesa durante o verão. *Acta Scientiarum Animal Science* 26(1), 115-122.

Baumgard LH, Rhoads RP 2013. Effects of heat stress on postabsorptive metabolism and energetics. *Revista Animal Bioscience* 1, 311-333.

Bernabucci L, Basirico P, Morera D, Dipasquale A, Vitali F, Piccioli C, Calamari L 2014. Original Research Article *Journal of Dairy Science*, In Press, Corrected Proof.

Bernabucci U, Lacetera N, Ronchi B, Nardone A 2002. Effects of the hot season on milk protein fractions in Holstein cows. *Animal Reserch* 51, 25-33.

Bernabucci U, Lacetera N, Ronchi B, Nardone A 2002. Markers of Oxidative Status in Plasma and Erythrocytes of Transition Dairy Cows During Hot Season. *Journal Dairy Science* 85, 2173–2179.

Bruckmaier RM, Schams K, Blum JW 1993. Milk removal in familiar and unfamiliar surroundings: concentrations of oxytocin; prolactin; cortisol and β -endorphin. *Journal of Dairy Research* 60(4), 449-456.

Calamari, L, Mariani, P. Effect of the hot environment conditions on the main milk cheesemaking properties. *Zootecny Nutrition Animal* 24. 259-271

Campos AT 2002. Estudo do potencial de redução da temperatura do ar por meio do sistema de resfriamento adiabático evaporativo na região de Maringá-PR. *Acta Scientiarum* 24(5), 1575-1581.

Cerutti WG, Bermudes RF, Viégas J, Martins CMMR 2013. Respostas fisiológicas e produtivas de vacas holandesas em lactação submetidas ou não a sombreamento e aspersão na pré-ordenha. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.* 14(3), 406-412.

Chavez MS, Negri LM, Cuatrin A 2004. Bovine milk composition parameters affecting the ethanol stability. *Journal Dairy Reserch* 71, 2001–2006.

Collier RJ, Baumgard LH, Lock AL, Bauman DE 2005. Physiological limitations, nutrient partitioning. In *Yield of farmed species. Constraints and opportunities in the 21st Century* (ed. R Sylvester-Bradley and J Wiseman), 351–377.

Collier RJ, Dahl GE, Vanbaale MJ 2006. Major advances associated with environmental effects on dairy cattle. *J Dairy Sci* 89,1244-1253.

Cowley FC, Barber DG, Houlihan AV, Poppi PD 2015. Immediate and residual effects of heat stress and restricted intake on milk protein and casein composition and energy metabolism. *Journal Dairy Science.* 98, 2356–2368.

Dikmen S, Hansen PJ 2009. Is the temperature-humidity index the best indicator of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment? *Journal of Dairy Science* 92, 109- 116.

Drackley JK 1999. Biology of dairy cows during the transition period :The final frontier? *Journal Dairy Science* 82, 2259–73.

Du Preez JH 2000. Parameters for the determination and evaluation of heat stress in dairy cattle in South Africa. *Journal of Veterinary Research* 67, 263 – 271.

Edmonson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T 1989. Webster, G. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* 72, 68-78.

Ferreira FC, De Vries A 2015. Effects of season and herd milk volume on somatic cell counts of Florida dairy farms. *Journal Dairy Science.* 98, 1–16.

Fischer, V, Vizzotto EF, Abreu, AS, Thaler, NA, Stumpf, MT, Wernck, D, Schmidt, FA. 2014. Behavior of lactating dairy cows under mild and severe heat stress with free access or not to shade. In: *Joint Annual Meeting, Kansas, MI, July, Proceedings*

Frazzi E, Calamari L, Calegari F 1996. Dairy cows heat stress index including air speed parameter. *AgEng'96, Conference on Agricultural Engineering, Madrid, 23-26.*

Freitas MD, Ferreira MG, Ferreira PM, Carvalho AU, Lage AP, Heinemann MB, Facury Filho EJ 2010. Equilíbrio eletrolítico e ácido-base em bovinos. *Ciência Rural* 40(12), 2608-2615.

González FHD, Silva SC 2006. Bioquímica clínica de glicídeos. In: *Introdução a bioquímica clínica veterinária*. 2ed. Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul- Porto Alegre, 153-207.

González FHD e Campos R 2003. Indicadores metabólico nutricionais do leite. *Anais do I simpósio de patologia clínica veterinária da região sul do Brasil*. Porto Alegre, RS.

Grant RJ 2005. Optimizing starch concentrations in dairy rations. In: *Annual Tristate Dairy Nutrition Conference*, 14, 73-79.

Hahn G L, Mader TL 1997. Heat waves in relation of thermoregulation, feeding behavior, and mortality of feedlot cattle. In: *International Livestock Environment Symposium*, 5., Minnesota, 1997. *Proceedings*. St. Joseph: ASAE, 125-129.

Haron AW, Jesse Abdullah FF, Tijjani A, Abba Y, Adamu L 2014. The use of Na⁺ and K⁺ ion concentrations as potential diagnostic indicators of subclinical mastitis in dairy cows. *Veterinary World* 7(11), 966-969.

Head HH 1989. The strategic use of the physiological potential of the dairy cow. In: *Simpósio Leite nos Trópicos: novas estratégias de produção*. Botucatu, 38-89.

Horowitz M 2002. From molecular and cellular to integrative heat defence during exposure to chronic heat. *Comparative Biochemistry and Physiology* 131, 475–483.

Horowitz, M 2001. Heat acclimation: Phenotypic plasticity and cues to the underlying molecular mechanisms. *J. Thermal Biol* 26, 357-363.

Hotzel, M. J., Neves, H. H., Honorato, L. A., Moreira, C. E., Mata, M. G. F., Silva, J. 2013. Controle de verminoses gastrintestinais em caprinos utilizando preparados homeopáticos. *Revista Cadernos de Agroecologia*, V. 8, N. 1, 2013 - ISSN: 2236-7934

Jonker JS, Kohn RA, Erdman RA 1999. Milk urea nitrogen target concentrations for lactating dairy cows fed according to national research council recommendations. *Journal Dairy Science* 82,1261-1273.

Kadzere CT, Murphy MR, Silanikove N, Maltz E 2002. Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Livestock Production Science* 77, 59-91.

Kendall, P.E., Nielsen, P.P., Webster, J.R., Verkerk, G.A., Littlejohn, R.P., Matthews, L.R. The effects of providing shade to lactating dairy cows in a temperate climate. *Livestock Science* 2006;103:148–157.

Köppen, W 1931. *Climatologia*. Fundo da cultura econômica, Buenos Aires, Argentina.

Lacetera N, Bernabucci U, Ronchi B, Nardone A 1996. Body condition score, metabolic status and milk production of early lactating dairy cows exposed to warm environment. *Riv Agriculture Subtropical e Tropical* 90, 43–55.

Lacy-Hulbert SJ, Woolford MW, Nicholas GD, Prosser CG, Stelwagen K 1999. Effect of milking frequency and pasture intake on milk yield and composition of late lactation cows. *Journal of Dairy Science* 82, 1232–1239.

Macfarlane WV, Howard B 1972. Comparative water and energy economy of wild and domestic mammals. *Proc Symp Zool Soc* 31, 261-296.

Mader TL, Davis MS, Brown-Brandl T 2006. Environmental factors influencing heat stress in feedlot cattle. *Journal of Animal Science* 84, 712–719.

Marques LT, Fischer V, Zanela MB 2011. Produção leiteira, composição do leite e perfil bioquímico sanguíneo de vacas lactantes sob suplementação com sal aniônico. *Rev Bras Zootec* 40, 1088-1094.

Mcmanus C, Paiva SR, Araújo RO 2010. Genetics and breeding of sheep in Brazil. *Revista Brasileira de Zootecnia* 39, 236-246.

Mcmanus C, Paludo GR, Louvandini H, Gugel R, Sasaki LCB, Paiva SR 2009. Heat tolerance in naturalized Brazilian sheep: physiological and blood parameters. *Tropical Animal Health and Production* 41, 95-101.

Mitlöhner, F.M., Morrow, J.L., Dailey, J.W., Wilson, S.C., Galyean, M.L., Miller, M.F., McGlone, J.J. Shade and water misting effects on behaviour, physiology, performance, and carcass traits of heat-stressed feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 2001;79:2327–2335.

Muller CJC, Botha JA, Smith WW 1994. Effect of shade on various parameters of Friesian cows in Mediterranean climate in South Africa. Fed an water intake, milk production and milk composition. *Journal Dairy Science*. 24, 49 – 55.

National Research Council 2001. Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition. Nutrient requirements of dairy cattle. Washington, DC: National Academy Press, 381p.

Negri L, Chavez M, Taverna M, Cuatrin A, Rubiolo A 2003. Determinación de las variables que afectan la estabilidad térmica de la leche utilizando un método capilar para evaluar el tiempo de coagulación por calor. *Revista Argentina de Lactología*, 22, 33-34.

Neves MLMW, Azevedo MD, Costa LAB 2009. Níveis críticos do Índice de Conforto Térmico para ovinos da raça Santa Inês criados a pasto no agreste do

Estado de Pernambuco. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, Maringá 31(2), 169-175.

O'Brien MD, Rhoads RP, Sanders SR, Duff GC, Baumgard LH 2010. Metabolic adaptations to heat stress in growing cattle. *Domestic Animal Endocrinology* 38, 86-94.

Ominski KH, Kennedy AD, Wittenberg KM, Moshtaghi SA 2002. Physiological and Production Responses to Feeding Schedule in Lactating Dairy Cows Exposed to Short-Term, Moderate Heat Stress. *Journal Dairy Science*. 85, 730–737.

Porcionatto MAF, Fernandes AM, Netto AS, Santos MV 2009. Influência do estresse calórico na produção e qualidade do leite. *Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais* 7(4), 483-490.

Renaudeau, D, Collin, A, Yahav, S, De Babilio, V, Gourdine, LJ, Collier, RJ. Adaptation to hot climate and strategies to alleviate to stress in livestock production. *Animal* 6(5). 707-728

Rhoads ML, Rhoads RP, Vanbaale MJ 2009. Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism and aspects of circulating somatotropin. *J Dairy Sci* 92, 1986–1997.

Rodriguez LA, Mckonnen G, Wilcox CJ, Martin FG, Krienke WA 1985. Effects of relative humidity, maximum and minimum temperature, pregnancy and stage of lactation milk composition and yield. *Journal of Dairy Science*, Lancaster 68, 973-978.

Rosenberg LJ, Biad BL, Verns SB 1983. Human and animal biometeorology. In: *Microclimate, the biological environment*. New York: Wiley- Interscience Publication, p.423-467.

Sevi A, Caroprese M 2012. Impact of heat stress on milk production, 59 immunity and udder health in sheep: A critical review. *Small Ruminant Research*, Amsterdam 107, 1-7.

Shwartz G, Rhoads ML, VanBaale MJ, Rhoads RP 2009. Effects of a supplemental yeast culture on heatstressed lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 92, 935-942.

Silanikove, N 2009. Acute heat stress brings down milk secretion in dairy cows by up-regulating the activity of the milk-borne negative feedback regulatory system. *BMC Physiology* 9, 13.

Silanikove, N 2000. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. *Livestock Production Science* 67, 1-18.

Smith DL, Smith T, Rude BJ, Ward SH 2013. Short communication: Comparison of the effects of heat stress on milk and component yields and somatic cell score in Holstein and Jersey cows. *Journal of Dairy Science* 96(5), 3028-303.

Soriani N, Panella G, Calamari L 1996. Rumination time during the summer season and its relationships with metabolic conditions and milk production. *Journal of Dairy Science* 5082-5094.

Stelwagen K, Hopstert H, Van Der Werf Jtn E, Blokhuis HJ 2000. Short communication: effects of isolation stress on mammary tight junctions in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 83, 48-51.

Stumpf MT 2014. Respostas biológicas de bovinos das raças Holandesa e Girolando sob estresse térmico. Tese. UFRGS. 69p.

Stumpf MT, Fischer V, Mcmanus CM 2013. Severe feed restriction increases permeability of mammary gland cell tight junctions and reduces ethanol stability of milk. *Anim* 7, 1137-1142.

Sucupira MCA e Ortolani EL 2003. Uso de sangue arterial e venoso no exame do equilíbrio ácido-básico de novilhos normais ou com acidose metabólica. *Ciência Rural* 33, 863-868.

Titto EAL 1998. Clima: Influência na produção de leite. Ambiente na produção de leite em clima quente. In: *Simpósio Brasileiro de Ambiente na Produção de Leite*, 1, Piracicaba: FEALQ 10-23.

Tsioulpas A, Grandison AS e Lewis MJ 2007. Changes in physical properties of bovine milk from the colostrum period to early lactation. *Journal of Dairy Science* 90, 5012-5017.

Tronco VM 2003. Manual para inspeção e qualidade do leite. Santa Maria: Ed. da UFSM, 192p.

Tucker, C.B., Rogers, A.R., Schütz, K.E. Effect of solar radiation on dairy cattle behaviour, use of shade and body temperature in a pasture-based system. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2008;109:141–154.

West JW, Mullinix BG, Bernard JK 2003. Effects of hot, humid weather on milk temperature, dry matter intake, and milk yield of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 86, 232–242.

Wheelock JB, Rhoads RP, Vanbaale MJ, Sanders SR, Baumgard LH 2010. Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci.* 93, 644–655.

Wildman EE, Jones GM, Wagner PE 1982. A dairy body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. J. Dairy Sci. 65(3), 495-501.

Yousef, M.K 1985. Measurements of heat production and heat loss. In:BookSeries TitleStress physiology in livestock. 1, 35–46.

Zanela MB, Fischer V, Ribeiro MER 2006. Leite instável não-ácido e composição do leite de vacas Jersey sob restrição alimentar. Pesq Agropec Bras 41, 835-840.

Zimbelman RB 2009. A re-evaluation of the impact of temperature humidity indx (THI) and black globe temperature humidity index (BGHI) on milk production in high producing dairy cows. In: Southwest Nutrition And Management Conference, 24, 158-168.

CAPÍTULO V

Intensidade do estresse por calor influencia distintamente os benefícios do provimento de sombra sobre os atributos fisiológicos e sanguíneos em vacas da raça Holandês⁶

⁶ Artigo escrito de acordo com as normas da *Animal*

Intensidade do estresse por calor influencia distintamente os benefícios do provimento de sombra sobre os atributos fisiológicos e sanguíneos em vacas da raça Holandês

Severity of heat stress affects distinctly the beneficial effects of shade provision on physiological and blood traits of Holstein cows

Resumo

O provimento de sombra reconhecidamente contribui para minimizar os efeitos deletérios do estresse por calor sobre a fisiologia e metabolismo de vacas leiteiras, porém a magnitude desse benefício provavelmente depende da severidade desse estresse e dos atributos medidos. O objetivo deste trabalho foi avaliar os benefícios do provimento de sombra de acordo com a intensidade do estresse por calor nos atributos fisiológicos e sanguíneos de vacas leiteiras. O estudo foi realizado em dois locais, Itapiranga/SC de 25/01 a 03/03/2011, com 16 vacas em lactação e o segundo experimento foi realizado entre os dias 28/01 a 07/02/2013 em Lages/SC, com 14 vacas em lactação. Em cada estudo, os animais foram divididos em dois grupos: com e sem acesso à sombra e os quais foram avaliados em três momentos: pré-estresse, estresse e pós-estresse, quando, respectivamente, todos os animais tiveram acesso à sombra, parte dos animais foi privado de sombra e posteriormente todos tiveram acesso à sombra. Foram avaliados atributos fisiológicos como temperatura e frequências cardíaca e respiratória; hematológicos como hematócrito, assim

como os teores de glicose, creatinina, ureia e sódio. Em Itapiranga, a intensidade do estresse foi considerada de moderada à severa e em Lages, o estresse foi considerado leve. Sob estresse por calor moderado a severo, a privação de sombra acarretou em maiores valores ($P < 0,05$) de frequência respiratória, temperatura corporal medidos às 18:30h, glicose, creatinina e sódio no plasma, mas não modificou os valores de frequência cardíaca medida às 6:30 e às 18:30h, frequência respiratória e temperatura corporal medidas às 6:30h, assim como os valores de hematócrito e ureia. Durante o período pós-estresse, o acesso à sombra reduziu os valores de frequência respiratória e temperatura corporal medidos às 18:30h a valores semelhantes aos animais permanentemente com acesso à sombra. Sob estresse leve por calor, a privação de sombra aumentou os valores de frequência respiratória medida às 18:30h, mas não alterou os valores de frequência cardíaca e temperatura corporal medidas às 18:30h assim como os valores de hematócrito, teores de glicose, creatinina, ureia e sódio. O acesso à sombra dos animais reduziu os valores de frequência respiratória medida às 18:30h a valores semelhantes aos animais permanentemente com acesso à sombra. O provimento de sombra especialmente quando o estresse por calor for moderado a severo melhora o bem estar dos animais, mantendo seus atributos fisiológicos e hematológicos dentro da faixa normal.

Palavras chave: atributos fisiológicos, atributos hematológicos, sombra, severidade do estresse por calor

Abstract

Shade provision helps to minimize the deleterious effects of heat stress on the physiology and metabolism of dairy cows, but the magnitude of this benefit is likely to depend on the severity of heat stress and the measured attributes. The objective of this study was to evaluate the benefits of shade-provision according to the intensity of the heat stress on physiological and blood parameters of dairy cows. The study was conducted at two sites, Itapiranga, SC, from 25/01 to 03/03/2011, with 16 dairy cows and the second trial was held from 25/01 to 07/02 / 2013 in Lages, SC with 14 lactating cows. In each study, the animals were divided into two groups: with and without access to shade and were evaluated in three stages: pre-stress, stress and pos-stress when the cows had access to shade, part of the cows were deprived of shadow and then all cows had access to shade, respectively. Physiological attributes such as temperature and cardio-respiratory rates and haematological such as hematocrit, glucose, creatinine, urea and sodium contents were evaluated. In Itapiranga, the intensity of stress was considered to be moderate to severe, and in Lages stress was considered mild. Under moderate to severe heat stress, lack of access to shade resulted in higher values ($P < 0.05$) of respiratory rate, body temperature measured at 18:30h, glucose, creatine and sodium contents in plasma but did not affect heart rate values measured at 6:30 and 18: 30h, respiratory rate and body temperature measured at 6:30h, as well as the values of hematocrit and urea. During the post-stress period, the access to shade decreased respiration rate and body temperature measured at 18:30 h to values similar to those animals with permanent access shade. Under mild heat stress,

deprivation of shade increased respiratory rate values measured at 18:30 h, but did not change the values of heart rate and body temperature values measured at 18:30 h, as well as hematocrit values and glucose, creatinine, urea and sodium contents. Access to shade by previously shade-deprived cows reduced their respiratory rate values measured at 18:30 h to similar values to those animals permanently with access to shade. Shade provision especially when heat stress is moderate to severe improves animal welfare, maintaining its physiological and hematological attributes within the normal range while for the measured attributes provision of shade to cows under mild heat stress did not show beneficial effects.

Key words: hematological attributes, physiological attributes, severity of heat stress, shade

Introdução

O estresse por calor prejudica o desempenho produtivo (Dias e Silva Junior, 2013; Perissinotto, 2009) reprodutivo (Garcia-Ispierto et al., 2006; Nogueira et al., 2011; Nascimento et al., 2014) e a saúde dos animais. Animais mantidos em pastagem recebem radiação solar excessiva especialmente durante a estação quente (Silanikove, 2000) e a intensificação da pecuária, com subdivisão dos campos, associação com lavouras pode reduzir ou mesmo impedir o acesso dos animais à sombra natural. O acesso à sombra reconhecidamente reduz a carga térmica e a radiação solar sobre os animais (Frazzi et al., 1996) em zonas quentes como os trópicos, porém as evidências

dos benefícios do provimento de sombra em região subtropical são ainda escassas (Barbosa et al., 2004).

O baixo desempenho produtivo de vacas leiteiras, quando associado ao estresse por calor, deve-se à baixa ingestão de alimentos, ao aumento dos gastos energéticos nos tecidos e a impossibilidade de aumentar a mobilização do tecido adiposo para prover a energia necessária (Baumgard e Rhoads, 2013), acarretando num gasto maior de glicose que deixa de ser absorvida e usada pela glândula mamária.

Quando sob estresse por calor, os animais aumentam a frequência respiratória (Baccari Jr, 2001; Perissinotto et al., 2009), modificam seu comportamento (Vizzotto et al., 2014), reduzem o consumo (Huber, 1995) numa tentativa de aumentar as perdas por calor (Souza e Batista, 2012) assim como reduzir a produção de calor (Freitas et al., 2010) e carga térmica (Souza et al., 2010). Entretanto em certas situações, como elevados valores de temperatura e umidade esses mecanismos não são suficientes para evitar a hipertermia (Avendaño-Reyes et al., 2010) e outras alterações na fisiologia e metabolismo dos animais (Baêta et al., 1998). O conhecimento da interação entre os animais e o ambiente é fundamental para a tomada de decisões quanto a estratégias de manejo a serem utilizadas para maximizar as respostas produtivas. Dessa forma, o entendimento das variações diárias e sazonais das respostas fisiológicas permite a adoção de ajustes que promovam maior conforto aos animais. Objetivou-se com este trabalho avaliar se o provimento de sombra em ambientes com diferente intensidade de estresse por calor interfere nos atributos fisiológicos e hematológicos de vacas em lactação.

Material e métodos

Local, duração, animais

O estudo compreendeu dois experimentos conduzidos (1) em Itapiranga e em (2) em Lages, em Santa Catarina. Os experimentos foram aprovados pela comissão de Pós-Graduação em Zootecnia e Comissão de Ética do uso de animais da UFRGS projeto número 21901.

Experimento 1 - Conduzido de 25 de janeiro a 03 de março de 2011: 18 dias de período pré experimental; 6 dias de período experimental e 14 dias de período pós experimental, totalizando 38 dias. Dessa forma as etapas do experimento foram: período pré-estresse (dias 1 a 17), estresse, com aplicação do tratamento com sombra (CS) e sem sombra (SS) (dias 18 a 24) e recuperação (dias 25 a 38). Esse estudo foi realizado em uma propriedade familiar no município de Itapiranga/SC, Brasil (latitude - 27° 05' 05", longitude 53° 35' 38" e altitude de 320 metros acima do nível do mar), caracterizada por clima temperado subtropical úmido (Köppen, 1931).

Foram utilizadas 16 vacas da raça Holandesa, as quais apresentaram, ao início do experimento, 520 ± 74 kg de peso corporal, escore de condição corporal (ECC) de $3,0 \pm 0,3$, $21,5 \pm 4,2$ kg de leite/dia e $120 \pm 61,2$ dias em leite. As vacas foram aleatoriamente distribuídas em dois grupos, os quais permaneceram em pastejo contínuo de Tifton 85 (*Cynodon dactylon*) com massa superior a 2500 kg de massa seca/ha e oferta de pasto por vaca superior a 10 kg MS/100 kg de peso vivo/ dia. Os piquetes com formato aproximadamente retangular tinham área com sombra natural de árvores na

sua extremidade menor. Durante os primeiros 14 dias, todas as vacas tinham livre acesso à sombra. As vacas do tratamento (SS) foram privadas do acesso à área sombreada pela colocação de uma cerca, evitando a sua entrada embaixo das árvores, entre os dias 15 a 24. Posteriormente, por mais 14 dias, todas as vacas tiveram acesso à área sombreada. Os piquetes ficavam distante 200 m da sala de ordenha e do galpão de alimentação. A área de sombra por animal foi superior a 10 m².

As vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia às 6h e 18h e a suplementação concentrado + silagem de milho foi fornecida após as duas ordenhas. A quantidade de concentrado foi calculada como 1 kg MV para cada 3 kg de leite produzido, e a silagem foi fornecida na quantidade diária de 5 kg/vaca na matéria natural. Este suplemento foi calculado para, juntamente com o pasto, aportar nutrientes compatíveis para permitir a produção de 20 kg de leite/vaca/dia (NRC, 2001) (Tabela 1).

Tabela 1. Composição percentual dos ingredientes dos alimentos

Alimentos	Teores médios de nutrientes (%MS)				
	MS	PB	EE	FDN	NDT
Silagem de Milho	30	8	2,5	49	68
Ração Comercial	88	20	3,0	20	75

MS - Massa Seca; PB - Proteína Bruta; EE - Extrato Etéreo; FDN - Fibra em Detergente Neutro; NDT - Nutrientes Digestíveis Totais.

Medidas realizadas

O peso dos animais foi estimado com uso da fita torácica ao início e final do experimento, pela manhã logo após a chegada dos animais no local de alimentação. A avaliação da condição corporal dos animais foi realizada concomitantemente de acordo com uma escala de 1 a 5 (Willdman et al., 1982). As frequências respiratória e cardíaca e temperatura corporal de vacas foram avaliadas diariamente às 6:30h e às 18:30h depois da ordenha. A temperatura corporal (°C) foi medida usando um termômetro veterinário clínico inserido perto da parede do reto do animal durante três minutos. A frequência cardíaca (batimentos por minuto) e frequência respiratória (número de respirações por minuto) foram medidos usando um estetoscópio e cronômetro por 30 segundos e multiplicando o resultado por dois, para obter estes resultados em minutos.

Foram realizadas coletas de sangue depois da ordenha da tarde nos dias 15, 18, 22, 24 e 38 após o início do experimento, por venipunção na veia coccígea, com tubos Vacutainer sem conservantes e/ou anticoagulantes. Imediatamente após a coleta do material se deixou a amostra em repouso por um período de 30 minutos para permitir a formação do coágulo e, em seguida se centrifugaram os tubos (3000 rpm por 15 min) com o fim de separar o soro que foi imediatamente removido e congelado em tubos de ependorff. As amostras foram enviadas para um laboratório de análises clínicas e foram determinados: hematócrito, glicose, creatinina, ureia e sódio. Alíquotas de sangue completo dos animais foram separadas para determinar hematócrito pelo método de microhematócrito conforme Oliveira (2007) no mesmo dia. A concentração sérica de glicose, ureia, creatinina foram determinadas em

espectrofotômetro semi automático. O sódio foi determinado por química seca (Thrall, 2007).

Experimento 2 - Realizado entre os dias 25 de janeiro de 2013 a 7 de fevereiro de 2013, no setor leiteiro da Universidade Estadual Fazenda de Santa Catarina (UDESC-CAV), localizado na cidade de Lages - SC Brasil (latitude -27 °48 '58' ', longitude 50 °19' 34 " e altitude de 950 metros acima do nível do mar), com umidade relativa média de 79,3%, caracterizada por clima temperado subtropical (Köppen, 1931).

Foram usadas 14 vacas em lactação, 10 Holandês e 4 mestiças Holandês x Jersey. As vacas foram selecionadas do rebanho experimental para constituir um grupo semelhante em relação à produção de leite, ordem de nascimento, raça, período de lactação (PL) e CCS. No início do experimento, os animais apresentaram $537,6 \pm 93,5$ kg de peso corporal, ECC de $2,8 \pm 0,3$, $2,7 \pm 1,5$ lactações, $20,6 \pm 6,5$ kg de leite / dia e $149,3 \pm 48,9$ dias em leite. Este grupo foi dividido em dois grupos com sete vacas cada, as quais foram colocadas em dois piquetes (A e B) com 0,8 ha cada, compostas por grama Sudão (*Sorghum sudanense L.*) e capim Papuã (*Brachiaria plantaginea*). Os piquetes apresentavam formato aproximadamente retangular e tinham área com sombra natural de árvores (Eucaliptos) na sua extremidade menor. A massa de pasto foi superior a 3000 kg de MS/ha e a oferta d pasto foi aproximadamente de 10 kg de MS /100 kg de peso vivo/dia.

Durante os primeiros 5 dias até 28/01, todas as vacas tinham livre acesso à sombra. Entre 29/01 a 01/02, as vacas do tratamento (SS) foram

privadas do acesso à área sombreada pela colocação de uma cerca, evitando a sua entrada embaixo das árvores. Dessa forma o período pré-estresse compreendeu os dias 1 a 5, e o período estresse compreendeu 4 dias (dias 6 a 9) e o período recuperação compreendeu 6 dias (dias 10 a 15).

As vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia às 6 e 18h e suplementação foi fornecida depois das duas ordenhas, na quantidade de 6 kg/vaca/dia. A suplementação concentrada foi composta de 200g/kg de farelo de soja, 750 g / kg de milho moído, 30g/kg de sal mineral novo bovigold de Tortuga e 20g/kg de bicarbonato de sódio. O suplemento continha 88% MS, 16% PB, 8% FDN e 75% NDT/kg (base da MS). A composição do pasto foi PB 16%, FB 21%, EE 4%, NDT 70%. A quantidade da suplementação concentrada e do pasto em oferta foi calculada para atender as exigências nutricionais de 25 kg de produção de leite (NRC, 2001).

Medidas realizadas:

As vacas foram pesadas individualmente e tiveram seu ECC atribuído nos dias 5 e 10 após iniciado o experimento, antes da ordenha da manhã (ECC: 1-5 escala; Edmonson et al., 1989).

As frequências respiratória e cardíaca e temperatura corporal de vacas foram avaliadas diariamente depois da ordenha da tarde. A temperatura corporal (°C) foi medida usando um termômetro veterinário clínico inserido perto da parede do reto do animal durante três minutos. A frequência cardíaca (batimentos por minuto) e frequência respiratória (número de respirações por

minuto) foram medidas usando um estetoscópio e cronômetro por 30 segundos e multiplicando o resultado por dois, para obter estes resultados em minutos.

Foram realizadas coletas de sangue depois da ordenha da tarde, mas antes da suplementação. Nos dias 5, 8, e 10 após o início do experimento foram coletadas amostras em tubos de 4 mL sem anticoagulante para as análises bioquímicas e sorológicas (BD Vacutainer Brasil, São Paulo, Brasil), através de venipunção jugular. As amostras de sangue para as análises bioquímicas foram centrifugadas, após a retração do coágulo, o soro foi separado e congelado até a realização dos testes bioquímicos. Foram realizadas determinações séricas de creatinina, ureia, glicose através de espectrofotometria semi automática (Bioplus 2000, São Paulo). Alíquotas de sangue completo dos animais foram separadas para determinar hematócrito pelo método de microhematócrito conforme Oliveira (2007) no mesmo dia. A concentração sérica de glicose, ureia, creatinina foram determinadas em espectrofotômetro semi automático (Bioplus, 2000). O sódio foi determinado com auxílio de gasômetro portátil (iSTAT, Abbot), através de punção da artéria auricular caudal.

A medição da temperatura do ar e UR do ar foi realizada por modelo coletor de dados portátil estação HT-500 tempo, colocado a 1,5 m acima do solo e instalado na área sombreada e ensolarada dos piquetes. O índice de temperatura e umidade (ITU) foi usado como um indicador de conforto térmico e foi calculada usando a temperatura do ar e umidade relativa para todos os dias do experimento que utilizam a fórmula (Rosenberg et al., 1983): $ITU = (0,8 \times TA + (UR/100) \times (TA - 14,4) + 46,4$, onde TA = temperatura do ar em °C e

UR = umidade relativa (%). O ITU foi utilizado para classificar o estresse calórico como ameno ou brando (72 a 78), moderado (79 a 88) e severo (89 a 98), conforme Smith et al. (2012).

Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram analisados separadamente. As vacas foram consideradas as unidades experimentais. Os dados de natureza contínua como os valores de temperatura corporal, frequências cardiorrespiratórias, hematócrito, concentrações de glicose, creatinina, ureia, sódio foram submetidos ao teste de normalidade e posteriormente foram submetidos à análise de variância considerando o efeito de dias, tratamento CS e SS hierarquizado dentro de tratamento e foram usados como covariáveis os mesmos atributos mensurados no período pré-estresse, quando todos os animais tiveram acesso à sombra. Foram usados os procedimentos univariate (teste de normalidade) e o mixed do SAS (enterprise guide 5.2). As médias foram separadas pelo Lsmeans opção pdiff. Foi adotado o nível de 0,05 de probabilidade para rejeição da hipótese de nulidade.

Resultados

Experimento 1 (Itapiranga)

Foram observadas grandes variações de temperatura e umidade relativa do ar entre manhã, tarde e noite, entre os piquetes na sombra e no sol, bem como entre os dias (Tabela 2). As temperaturas avaliadas às 9 e 15h para

o grupo (SS) foram superiores quando comparado com o grupo (CS). Com relação ao horário das 21h, a temperatura e a umidade foram semelhantes para os dois grupos avaliados. No grupo SS foram observados valores de ITU superiores às 9h e 15h quando comparados com o grupo CS. Além disso, valores severos de ITU, ou seja, iguais ou acima de 90 foram observados no dia 20 às 9h e 15h, nos dias 22 e 31 às 9h.

Tabela 2. Temperatura do ar, umidade relativa e ITU medidos nos piquetes com e sem sombra as 9h, 15h e 21h (experimento 1).

Fase	Com sombra						Sem sombra					
	pré	Experimental		Pós		Pré	Experimental		pós			
Dias experimento	14	18	22	24	31	38	14	18	22	24	31	38
ITU 09:00 h***	73,7	71,6	68,8	69,8	74,8	72,0	81,0	72,8	90,3	90,9	90,4	73,4
ITU 15:00 h***	77,5	78,0	78,2	81,2	73,6	76,5	85,4	82,4	89,7	83,7	78,0	80,4
ITU 21:00 h***	71,6	70,7	72,2	72,8	66,2	67,8	71,0	73,1	73,8	81,9	71,4	69,0

*TA = temperatura do ar (°C); **UR = umidade relativa (%); ***ITU = $(0,8 \times TA) + (UR/100) \times (TA - 14,4) + 46,4$

Quando privados do acesso à sombra, as vacas apresentaram maiores ($P < 0,05$) valores de frequência respiratória, temperatura corporal medidas às 18:30h, glicose, creatinina e sódio no plasma comparadas com aquelas com acesso à sombra. E não apresentaram diferenças quanto aos valores de frequência cardíaca medida às 6:30 e às 18:30 h, frequência respiratória e temperatura corporal medidas às 6:30 h, hematócrito e ureia. No 38º dia do experimento, ou seja, 14 dias após voltarem a ter acesso à sombra,

o grupo de vacas previamente privado de sombra apresentou menor valor de glicose ($P < 0,05$) que o grupo com acesso permanente à sombra. Em relação à sua evolução durante o experimento, o grupo de vacas privado de sombra apresentou menores valores de frequência respiratória e temperatura corporal medidas às 18:30 h, glicose, de creatinina, de ureia e sódio no período de pós-estresse em relação ao período de estresse. As vacas que tiveram acesso permanente à sombra não apresentaram diferenças nos valores de seus atributos entre o período de estresse e pós-estresse (Tabela 4).

Tabela 3. Valores da probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade dos efeitos de dia, tratamento hierarquizado dentro de dia e do ajuste por covariância dos fatores fisiológicos de vacas com e sem acesso à sombra em estresse térmico moderado a severo (experimento 1).

Fonte Variação	Dia	Trat (dia)	Cov (Pré)
FC 6h (bat/min) ¹	0,0003	0,9410	NS
FR 6h (mov/min) ²	0,0618	0,1124	0,0005
TR 6h (°C)	< 0,0001	0,2857	NS
FC 18:30h (bat/min) ¹	< 0,0001	0,8204	NS
FR 18:30h (mov/min) ²	< 0,0001	< 0,0001	0,0283
TR 18:30h (°C)	0,12	< 0,0001	0,0015

FC - frequência cardíaca; FR - frequência respiratório; TC - temperatura retal. (1)

batimentos/minuto, (2) movimentos respiratórios/minuto

Tabela 4. Valores médios dos atributos fisiológicos e hematológicos de vacas com e sem acesso à sombra sob estresse moderado à severo (experimento 1)

Atributo	Tratamento	Dias		
		Stress		Pós (recuperação)
		22	24	38
FC(bat/min)	SS	62,0 a A	76,5 a B	60 a A
6:30h	CS	59,5 a A	80 a B	59 a A
FR(mov/min)	SS	59,8 a	61,3 a	54,3 a
6:30h	CS	48,7 b	57,7 a	50,7 a
TR (°C)	SS	38,3 a	38,3 a	38,1 a
6:30h	CS	38,4 a	38,7 a	37,5 b
FC(bat/min) ¹	SS	83,0 a	77,0 a	78,0 a
18:30 h	CS	86,0 a	73,0 a	82,0 a
FR(mov/min) ²	SS	93,8 a A	147,8 a B	75,3 a C
18:30 h	CS	90,2 a A	85,2 b A	68,7 a B
TR (°C)	SS	40,4 a A	40,8 a A	39,7 a B
18:30 h	CS	39,8 b A	39,7 b A	40,0 a A
Hematócrito (%)	SS	26,8 a A	26,7 a A	25,4 a A
	CS	28 a A	27,3 a A	27,9 a A
Glicose	SS	70,2 a B	75 a A	56 b C
(mg/dL)	CS	61,8 b A	61,3 b A	60,3 a A
Creatinina	SS	0,91 a A	0,89 a A	0,74 a B
(mg/dL)	CS	0,76 b A	0,75 b A	0,72 a A
Ureia	SS	47,8 a A	51,7 a A	35,2 a B
(mg/dL)	CS	46,2 a A	45,8 a A	39,3 a A

Sódio (mmol/L)	SS	140,0 a A	140,7 a A	137,5 a B
	CS	137,4 b A	138,2 b A	137,4 a A

(1) batimentos/minuto, (2) movimentos respiratórios/minuto. (a,b) são avaliados na coluna, (A,B) são avaliados na linha, diferentes letras na coluna ou diferentes letras na linha representam diferença significativa ($P < 0,05$); (CS) com sombra; (SS) sem sombra. FC - frequência cardíaca; FR - frequência respiratório; TC - temperatura retal

Experimento 2 (Lages)

Foram observadas variações de temperatura e umidade relativa do ar entre manhã, tarde e noite, bem como entre os dias, mas diferenças moderadas foram observadas entre áreas com e sem sombra (Tabela 5). Em geral, a temperatura e ITU foram inferiores às 9h, em comparação com os valores medidos às 15h, e as medições às 21h foram intermediárias. Para umidade relativa do ar, os menores valores ocorreram geralmente às 15h nos piquetes sem sombra. Os valores de ITU foram mais elevados nos dias 6, 7 e 9 nos horários 15 e 21h.

Tabela 5. Temperatura do ar, umidade relativa e ITU medidos nos piquetes com e sem sombra as 9h, 15h e 21h (experimento 2).

	Com sombra					Sem sombra			
	Dia/Mês					Dia/Mês			
	Pré	Exp	Exp	Exp	Exp	Exp	Exp	Exp	Exp
	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9
Atributos	28/jan	29/jan	30/jan	31/jan	01/fev	29/jan	30/jan	31/jan	01/fev
ITU 09:00 h***	62.0	63.3	63.2	64.4	68.0	65.5	64.3	66.5	68.4
ITU 15:00 h***	73.5	72.7	74.8	76.4	78.6	77.1	75.5	76.8	79.6
ITU 21:00 h***	65.4	68.5	68.0	70.2	69.9	67.6	68.0	69.3	77.8

* Tbs = temperatura de bulbo seco (°C); ** UR = umidade relativa (%); ***ITU = $(1.8 \times Tbs + 32) - [(0.55 - 0.0055 \times UR) \times (1.8 \times Tbs - 26.8)]$.

Sob estresse por calor leve, a privação de sombra aumentou os valores de FR medida às 18:30h, mas não alterou os valores de FC e TC medidas às 18:30h assim como os valores de hematócrito, e teores de glicose, creatinina, ureia e sódio. O acesso à sombra dos animais reduziu os valores de FR medida às 18:30h a valores semelhantes aos animais permanentemente com acesso à sombra. (Tabela 7).

Em relação à sua evolução durante o experimento, o grupo de vacas privado de sombra apresentou valores maiores da análise cometa nos dias 8 e 9 (estresse) em relação ao primeiro dia sem acesso à sombra (dia 6) e em relação ao último dia do período pós-estresse, de creatinina, de ureia e sódio no período de pós-estresse em relação ao período de estresse. As vacas que

tiveram acesso permanente à sombra não apresentaram diferenças nos valores de seus atributos entre o período de estresse e pós-estresse.

Tabela 6. Valores da probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade dos efeitos de dia, tratamento hierarquizado dentro de dia e do ajuste por covariância dos fatores fisiológicos de vacas com e sem acesso à sombra em estresse térmico leve (experimento 2).

Fonte Variação	Dia	Trat (dia)	Cov (Pré)
FC 18:30h (bat/min) ¹	< 0,0001	0,1279	0,0444
FR 18:30h (mov/min) ²	< 0,0001	< 0,0001	NS
TR18:30h(°C)	< 0,0009	0,1530	NS

FC - frequência cardíaca; FR - frequência respiratório; TC - temperatura retal; (1) batimentos/minuto, (2) movimentos respiratórios/minuto

Tabela 7. Valores médios dos atributos fisiológicos e hematológicos de vacas com e sem acesso à sombra sob estresse por calor leve (experimento 2)

Atributo	Tratamento	Dias	
		Estresse	Pós (recuperação)
		8	10
FC	SS	91,2 a A	75,1 a B
(bat/min)18:30 h	CS	91,4 a A	78,5 a A
FR (mov/min)	SS	84,6 a A	36,6 a B
18:30 h	CS	63,7 b A	34,6 a B
	SS	39,9 a A	37,5 a B
TR (°C)18:30 h	CS	39,8 a A	38,2 a B
	SS	55,49 a B	63,0 a A
Glicose (mg/dL)	CS	57,68 a B	63,2 a A
Creatinina	SS	0,93 a A	0,68 a B
(mg/dL)	CS	0,85 a A	0,64 a B
	SS	48,9 a A	43,05 a A
Ureia (mg/dL)	CS	46,0 a A	41,2 a A
	SS	142,1 a A	137,6 a B
Sódio (mmol/L)	CS	141,0 a A	130,0 a B

(1) batimentos/minuto, (2) movimentos respiratórios/minuto. (a,b) são avaliados na coluna, (A,B) são avaliados na linha, diferentes letras na coluna ou diferentes letras na linha representam diferença significativa ($P < 0,05$); FC - frequência cardíaca; FR - frequência respiratório; TC - temperatura retal

Discussão

Atributos fisiológicos

O aumento da frequência respiratória era esperado em todos os animais, especialmente durante o período da tarde, quando se verificaram os maiores valores de ITU, pois com temperaturas ambiente acima da temperatura crítica mínima, as perdas de calor pelas vias não evaporativas perdem progressivamente sua importância e as perdas devido à dilatação vascular periférica e evapotranspiração se tornam cada vez mais importantes (Baccari Jr, 2001; Kadzere et al., 2002). O provimento de sombra às vacas reduziu a frequência respiratória tanto no estresse leve quanto no moderado a severo possivelmente por reduzir a exposição ao sol, diminuindo a sua carga térmica.

A compensação da respiração é um excelente mecanismo de perda de calor, mas quando realizado por longos períodos reduz a pressão arterial de CO₂ e ocasiona alcalose respiratória (Freitas et al., 2010). Além disso, o animal pode diminuir sua ingestão massa seca e ruminação como consequência do estresse térmico (NRC, 2001).

Todas as vacas podem ser consideradas em estresse por calor, se levarmos em conta que a temperatura média do corpo estava em valores acima daqueles relatados para animais não-estressados pelo calor: 38,0 a 39,3°C (Kadzere et al., 2002; Stöber et al., 2008). Quando a temperatura e umidade aumentam, as vias de dissipação de calor por evapotranspiração se incrementam como, por exemplo, a taxa de respiração, mas quando esses

mecanismos de dissipação de calor se tornam insuficientes, os animais não conseguem manter a temperatura do corpo nos valores observados durante a termoneutralidade e pode ocorrer a hipertermia (Stöber et al., 2008). O provimento de sombra não evitou a elevação dos valores de temperatura corporal além dos valores considerados como normais, mas houve um benefício no caso das vacas em estresse térmico moderado a severo. Nääs e Junior et al. (2001) mostraram que o sistema de sombreamento artificial permitiu aos animais apresentar valores de temperaturas retal mais próximos do desejável, evidenciando a importância e a eficiência destes sistemas na redução dos efeitos do estresse térmico nos parâmetros fisiológicos.

Glicose

O maior gasto de energia durante o calor, mecanismos de dissipação combinado com a redução no consumo de alimentos, promovem um estado de equilíbrio energético negativo no animal (Drackley, 1999; Osorio et al., 2014; Wang et al., 2014;), o que direciona o uso da glicose para outros órgãos e tecidos mais relacionados com a sobrevivência do animal e que não estão envolvidos com a síntese de leite, reduzindo assim a produção além do esperado pela redução do consumo de nutrientes (Baumgard e Rhoads, 2013). No presente estudo, embora os níveis de glicose estivessem dentro dos parâmetros normais de 45 a 75 mg/dL (Kaneko et al., 1997; Fraser, 1991), os animais privados do acesso à sombra sob estresse moderado a severo apresentaram maiores valores de glicose. Nessim (2004) relatou aumento de glicose no plasma em dias quentes, e Chaiyabuter et al. (1987) verificaram que,

em altas temperatura e umidade, a concentração de glicose variou entre 52 a 72,8 mg/dL num período curto de cinco dias. Todavia, nosso resultado contraria aqueles encontrados por diversos autores que mostram redução do teor de glicose plasmático. Shafferi et al. (1981) e Kamal et al. (1972) atribuíram a diminuição da glicose no sangue sob clima quente, principalmente, à alta taxa de respiração, devido à elevada utilização da glicose pelos músculos respiratórios. A diminuição significativa da ingestão de alimentos também contribui para a diminuição da síntese de glicose e proteína. Du Preez (2000) ressalta que animais expostos prolongadamente ao calor diminuem os níveis de cortisol plasmático, o que pode reduzir a concentração de glicose na corrente sanguínea pelo menor estímulo da neoglicogênese. No entanto, Ronchi et al. (1995) registraram um decréscimo dos níveis de glicemia em novilhas da raça Holandesa, quando mantidas sob estresse térmico (85,9 THI) durante 4 semanas. Souza e Batista (2012) observaram valores de glicose de 75,67 mg/dL em vacas da raça Holandesa, mantidas sob temperatura elevadas. Fraser (1991) ressalta que os níveis considerados normais de glicose circulante em vacas leiteiras estão entre 42 e 74 mg/dL, variação está considerada normal. Haida et al. (1996) observaram níveis séricos de 71,16 mg/dL em vacas lactantes da raça Holandesa, entre o 3 e 4º meses de lactação, na região oeste do Paraná em dias quentes e os animais recém alimentados e deitados o nível de glicose chegava a 78,2 mg/dL.

Ureia e Creatinina

O aumento de creatinina verificado apenas nas vacas sem acesso à sombra e em estresse térmico moderado a severo é atribuído à hemoconcentração ocasionada pela desidratação. A creatinina é derivada da creatina presente no músculo. Os valores de creatinina do presente estudo estão abaixo do preconizado (Meyer e Harvey, 2004; Kaneko et al., 1997) para bovinos de 1 a 2 mg/dL, mas os animais que passaram por estresse calórico apresentam valores superiores (Ferreira et al., 2009; Habeeb et al., 2007; El-Masry et al., 1989; Salem, 1980). Contrariamente ao esperado, o provimento de sombra não alterou o teor de ureia plasmática. Outros autores verificaram o aumento das concentrações de ureia e creatinina nos animais estressados por calor e atribuíram ao aumento do catabolismo proteico (Ronchi et al., 1995) ou à diminuição da perfusão renal resultante da diminuição do líquido extracelular, o que leva à incapacidade de filtração normal da creatinina pelos rins (Srikandakumar e Johnson, 2004).

Sódio

O aumento de sódio verificado apenas nas vacas sem acesso à sombra e em estresse térmico moderado a severo pode ser atribuído à maior perda de água não proporcional à perda de Na^+ , que pode ocorrer em casos de suor profuso, hiperpneia prolongada e poliúria, o que foi constatado nesses animais (Burtis e Ashwood, 2001). Embora tenha ocorrido aumento nas concentrações de sódio, tais valores mantiveram-se dentro da faixa de referência para bovinos (Kaneko et al., 1997).

Hematócrito

A ausência de resultados do provimento de sombra sobre os valores de hematócrito em vacas sob estresse térmico leve ou moderado a severo não era esperado, uma vez que animais sob estresse térmico apresentam hemoconcentração causada pela perda de líquidos corporais resultante dos mecanismos de dissipação de calor (sudorese e ofego) na tentativa de manutenção da temperatura dentro dos limites fisiológicos (Olsson et al., 1995; Srikandakumar & Johnson, 2004;). Os valores do hematócrito para o presente estudo ficaram dentro da normalidade (experimento 1) ou um pouco abaixo do normal (experimento 2). Entretanto, uma possível explicação da semelhança dos valores de hematócrito nos animais com e sem acesso à sombra possa ser os efeitos contrários pelo aumento do consumo de água, maior nos animais sem acesso à sombra (Vizzotto et al., 2014) e da desidratação, também maior nesses mesmos animais. A diminuição do hematócrito resultante do aumento no consumo de água em animais sob estresse térmico foi relatada por Koga et al. (1998) e Brasil et al. (2000). A capacidade dos animais em adaptar-se a um determinado ambiente depende de um conjunto de ajustes no organismo que em condições ambientais estressantes podem causar alterações nos parâmetros hematológicos (Paes et al., 2000). O hematócrito corresponde, em porcentagem, ao volume de hemácias em relação ao volume total de sangue. Ao mesmo número de hemácias podem corresponder valores de hematócrito diferentes, conforme o estado de hidratação do animal: desidratação e redução no volume plasmático geram valores mais elevados; hipervolemia e aumento no volume plasmático

resultam em valores menores (Thrall, 2007). Animais que sofrem com estresse prolongado tendem a apresentar redução do hematócrito (Herz e Steinhaut, 1978). Alguns autores relataram que, com o aumento da temperatura ambiente, o animal perde líquido através do aparelho respiratório o que contribui para a redução do volume plasmático sanguíneo levando a um aumento na concentração do hematócrito (Souza et. al. 2011). Ferreira et al. (2009) estudando os valores para hematócrito em bovinos antes do estresse (manhã) e após (tarde) revelaram os valores do hematócrito 27,23% pela manhã e 28,42% a tarde, dentro dos valores considerados normais para bovinos.

Conclusões

O provimento de sombra reduz o incremento dos atributos fisiológicos como a frequência respiratória independentemente da intensidade do estresse térmico e apresenta efeitos benéficos sobre a temperatura corporal e alguns dos atributos hematológicos, como glicose, creatinina e sódio somente em animais submetidos ao estresse térmico moderado a severo.

Agradecimentos

A Fundação de Amparo a Pesquisa e a Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro para a execução das pesquisas.

À Família Eidt de Itapiranga que permitiu a realização de um dos experimentos com estresse calórico.

À Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC) que disponibilizou sua unidade de produção leiteira para que realizasse esse experimento.

Bibliografia

Avendaño-Reyes L, Álvarez-Valenzuela FD, Corre-Alderón A, Algáandar-Sandoval A, Rodríguez-González E, Pérez-Velázquez R, Macías-Cruz U, Díaz-Molina R 2010. Comparison of three cooling management systems to reduce heat stress in lactating Holstein cows during hot and dry ambiente conditions. *Livestock Science* 132, 48-52.

Baccari Jr F 2001. Manejo ambiental da vaca leiteira em climas quentes. Londrina: Universidade Estadual de Londrina. Brasil.

Baêta, f.c. 1998. Instalações para gado leiteiro na região do mercosul. In: congresso brasileiro de biometeorologia, 2, Goiânia: Sociedade de Biometeorologia, 162-73.

Barbosa OR, Boza PR, Santos GT, Sakagushi ES, Ribas NP 2004. Efeitos da sombra e da aspersão de água na produção de leite de vacas da raça Holandesa durante o verão. *Acta Scientiarum Animal Sciences* 26(1), 115-122.

Baumgard LH, Rhods RP 2013. Effects of heat stress on postabsorptive metabolism and energetics. *Annu. Revista Animal Bioscience* 1, 311-333.

Brasil LHA, Wechesler FS, Baccari Jr F 2000. Efeito do estresse térmico sobre a produção, composição química do leite e respostas termorreguladoras de cabras da raça Alpina. *Revista Brasileira Zootecnia* 29, 1632-1641.

Burtis, C. A., Ashwood, E. R. (2001). *Tietz fundamentals of clinical chemistry* (5th ed.). Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company.

Chaiyabuter N, Buranakarl C, Muangcharoen V, Loypetjra P, Pichaicharnarong A, 1987. Effects of acute heat stress on changes in the rate of liquid flow from the rumen and turnover of body water of swamp buffalo (*Bubalus Bubalis*). *J. Agric.Sci., (Camb.)*, 549–553.

Dias e Silva T P, Júnior SCS 2013. Produção de leite de vacas submetidas a diferentes períodos de exposição à radiação solar no sul do Piauí. *Revista Agrarian*. 6(21), 320-325.

Drackley JK 1999. Biology of dairy cows during the transition period :The final frontier? *Journal Dairy Science* 82, 2259–73.

Du Preez JH 2000. Parameters for the determination and evaluation of heat stress in dairy cattle in South Africa. *Journal of Veterinary Research* 67, 263 – 271.

Edmonson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T e Webster G 1989. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* 72, 68-78.

El-Masry KA, Kamal TH, Aboulnaga AI, Marai IFM 1989. Daily body weight gain, total body solids and biochemical responses of Friesian calves to mineral mixture and urea during heat stress. *Proceedings of the 3rd Egyptian British Conference on Animals, Fish and Poultry Production, Alexandria, Egypt*, 643–648.

Ferreira F, Campos WE, Carvalho AU, Pires MFA, Martinez ML, Silva MVGB, Verneque RS, Silva PF 2009. Taxa de sudação e parâmetros histológicos de bovinos submetidos ao estresse calórico. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia* 61, 763-768.

Fraser CM. *Manual merck de veterinária*. 6 ed. São Paulo: Roca, 1991.

Frazzi E, Calamari L, Calegari F 1996. Dairy cows heat stress index including air speed parameter. *AgEng'96, Conference on Agricultural Engineering, Madrid*, 23-26.

Freitas MD, Ferreira MG, Ferreira PM, Carvalho AU, Lage AP, Heinemann MB, Facury Filho EJ 2010. Equilíbrio eletrolítico e ácido-base em bovinos. *Ciência Rural* 40(12), 2608-2615.

Garcia-Ispuerto I, López-Gatius F, Santolaria P 2006. Relationship between heat stress durant the peri-implantation period and early fetal loss in dairy cattle. *Theriogenology* 65, 799-807.

Habeeb AAM, Fatma FIT, Osman SF 2007. Detection of heat adaptability using heat shock proteins and some hormones in Egyptian buffalo calves. *Egypt. J. Appl. Sci.* 22 (2A), 28–53.

Haida KS, González FHD, Parzianello N 1996. Estudo do perfil metabólico de um rebanho leiteiro do oeste do Paraná. *Semina: Ciências Agrárias* 17(1), 72-76.

Herz A, Steinhaut D 1978. The reaction of domestic animal to heat stress. *Animal Research Development*, 7, 7-38.

Huber H 1995. Manejo de animais em sistema de estabulação livre visando maximizar o conforto e a produção. In: *Congresso, Brasileiro de Gado Leiteiro*, 2, Piracicaba, p.41-68.

Kadzere CT, Murphy MR, Silanikove N, Maltz E 2002. Heat stress in lactating

dairy cows: a review. *Livestock Production Science* 77, 59-91.

Kamal TH, Kothy SE, Ei-Fouly HA 1972. Total body solids gain and thyroid activity as influenced by goitrogen, diuretics, sprinkling and air cooling in heat-stressed water buffaloes and Friesians. In *Isotope Studies in the Physiology of Domestic Animals*. Proceedings of the International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 177-182.

Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML 1997. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5 ed. New York: Academic Press.

Koga A, Kurata K, Furukawa R 1998. Rectal skin temperature difference regulated by blood volume in swamp buffaloes in hot conditions: comparative study of thermoregulation in buffaloes and cattle. *Anim. Sci. Tech.* 69, 81-89.

Köppen W 1931. *Climatologia*. Fundo da cultura econômica, Buenos Aires, Argentina.

Meyer DJ, Harvey JW 2004. *Veterinary laboratory medicine: interpretation & diagnosis*. 2.ed. Philadelphia: Saunders. 351p.

Nascimento TVC, Oliveira FA, Turco SHN, Cordeiro MF, Lopes Júnior ES 2014. Fatores meteorológicos sobre a atividade reprodutiva de cabras leiteiras na época seca do semiárido pernambucano. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 18(5), 539–544.

National Research Council 2001. Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition. *Nutrient requirements of dairy cattle*. Washington, DC: National Academy Press. 381p.

Nääs IA, Júnior IA 2001. influência de ventilação e aspersão em sistemas de sombreamento artificial para vacas em lactação em condições de calor. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 5 (1), 139-142.

Nessim MG 2004. Heat-induced biological changes as heat tolerance indices related to growth performance in buffaloes. Ph.D. Thesis, Faculty of Agriculture, Ain Shams University, Cairo, Egypt.

Nogueira DM, Voltolini TV, Moreira JN, Lopes Júnior ES, Oliveira VG 2011. Efeito de regimes alimentares sobre o peso corporal e parâmetros reprodutivos de cabras nativas. *Archivos de Zootecnia* 60, 339-1342.

Olsson K, Josäter-Hermelin M, Hossainihilali J, Hydbring E, Dahlborn K 1995. Heat stress causes excessive drinking in fed and food deprived pregnant goats. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 10, 309-317.

Osorio JS, Trevisi E, Ji P, Drackley JK, Luchini D, Bertoni G, Looor JJ 2014. Biomarkers of inflammation, metabolism, and oxidative stress in blood, liver,

and milk reveal a better immunometabolic status in peripartal cows supplemented with Smartamine M or MetaSmart. 97(12), 7437–7450.

Paes PR, Baironi G, Fonteque JR 2000. Comparação dos valores hematológicos entre caprinos fêmeas da raça Parda Alpina de diferentes faixas etárias. *Veterinária Notícias* 6(1), 43-49.

Perissinotto M, Moura DJ, Cruz VF, Souza SRL, Lima KAO, Mendes AS 2009. Conforto térmico de bovinos leiteiros confinados em clima subtropical e mediterrâneo pela análise de parâmetros fisiológicos utilizando a teoria dos conjuntos fuzzy. *Ciência Rural* 39(5), 1492-1498.

Ronchi B, Bernabucci U, Lacetera NG, Nardone A, Bertoni G 1995. Effects of heat stress on metabolic status of Friesian heifer calves. *Zootenica E. Nutrizione Animale* 21, 209–221.

Rosenberg LJ, Biad BL, Verns SB 1983. Human and animal biometeorology. In: *Microclimate, the biological environment*. New York: Wiley- Interscience Publication, 423-467.

Stöber M, Gründer HD 2008. Sistema Circulatório. In: Dirksen G, Gründer HD, Stöber M. *Rosemberger, Exame clínico dos bovinos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.101

Stöber M, Gründer HD 2008. Identificação, anamnese, regras básicas da técnica de exame clínico geral. Dirksen, G; Gründer, H.D; Stöber, M. *Rosemberger, Exame clínico dos bovinos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.74.

Stöber M 2008. Aparelho respiratório. Dirksen, G; Gründer, H.D; Stöber, M. *Rosemberger, Exame clínico dos bovinos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.143.

Salem A 1980. Seasonal variations in some body reactions and blood constituents in lactating buffaloes and Friesian cows. *J. Egyptian Veterinary Medicine Assoc.* 40, 63.

Shafferi I, Roussel JD, Koonce KX 1981. Effects of age, temperature, season and breed on blood characteristics of dairy cattle. *Journal Dairy Science* 64 (1), 63–68.

Silanikove N 2000. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. *Livestock Production Science* 67, 1-18.

Smith JF, Bradford BJ, Harner JP, Ito K, Keyserlingk M, Mullins CR, Potts JC, Allen JD and Overton MW 2012. Effect of cross ventilation with or without evaporative pads on core body temperature and resting time of lactating cows. *Journal of Dairy Science* (Submitted).

Souza BB, Assis DYC, Neto FLS, Roberto JVB, Marques BAA 2011. Efeito do clima e da dieta sobre os parâmetros fisiológicos e hematológicos de cabras da raça saanen em confinamento no sertão paraibano. *Revista Verde (Mossoró – RN – Brasil)* 6(1), 77-82.

Souza BB, Batista NL 2012. O efeito do estresse térmico sobre a fisiologia animal. *Agropecuária Científica no Semiárido* 8(3), 06-10.

Souza BB, Silva IJO, Mellace EM, Santos RFS, Zotti CA, Garcia PR 2010. Avaliação do ambiente físico promovido pelo sombreamento sobre o processo termorregulatório em novilhas leiteiras. *Agropecuária Científica no Semiárido* 6(2), 59-65.

Srikandakumar A, Johnson EH 2004. Effect of heat stress on milk production, rectal temperature, respiratory rate and blood chemistry in Holstein, Jersey and Australian Milking Zebu cows. *Tropical Animal Health Production* 36, 685-692.

Thrall MA, Backer DC, Campbell TW, DeNicola D, Fettman MJ, Lassen ED, Rebar A, Weiser G 2007. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 1 ed. São Paulo: Roca. 582 p.

Vizzotto EF 2014. Comportamento animal e atributos fisiológicos de vacas leiteiras submetidas a ambientes com e sem sombreamento durante a estação quente. *Dissertação (mestrado)*. PPG Zootecnia, UFRGS, Porto Alegre.

Wang P, Drackley JK, Stamey-Lanier JA, Keisler D, Looor JJ 2014. Effects of level of nutrient intake and age on mammalian target of rapamycin, insulin, and insulin-like growth factor-1 gene network expression in skeletal muscle of young Holstein calves, 383–391.

Willdman EE, Jones GM, Wagner PE 1982. A dairy body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *Journal Dairy Science* 65(3), 495-501.

CAPÍTULO VI

Acesso à sombra modifica o equilíbrio ácido básico, gasometria e reduz dano ao DNA em vacas da raça Holandesa sob estresse térmico leve⁷

⁷ Artigo escrito de acordo com as normas da *Animal*

Acesso à sombra modifica o equilíbrio ácido básico, gasometria e reduz dano ao DNA em vacas da raça Holandesa sob estresse térmico leve

Access to shade affects acid-base balance, arterial gases and reduces DNA damage of Holstein cows under mild heat stress

Resumo

O provimento de sombra reconhecidamente contribui para minimizar os efeitos deletérios do estresse por calor sobre a fisiologia e metabolismo de vacas leiteiras, porém seus benefícios em animais sob estresse térmico leve precisam ser melhor avaliados. O objetivo deste trabalho foi avaliar os benefícios do provimento de sombra em animais sob estresse térmico leve sobre os atributos do equilíbrio ácido-básico, gasometria, estresse oxidativo e dano ao DNA de vacas leiteiras. O estudo foi realizado em Lages/SC, entre os dias 24/01 a 07/02/2013 com 14 vacas em lactação. Os animais foram divididos em dois grupos: com e sem acesso à sombra e foram avaliados em três momentos: pré-estresse, estresse e pós-estresse, quando, respectivamente, os animais tiveram acesso à sombra, parte dos animais foi privado de sombra e posteriormente todos tiveram acesso à sombra. Foram avaliados atributos do equilíbrio ácido-básico, estresse oxidativo, gasometria, lactose plasmática e dano ao DNA. Sob estresse leve, a privação de sombra acarretou em maiores valores ($P < 0,05$) da análise cometa (dano ao DNA), valores menores ($P < 0,05$) da PO_2 , SO_2 , HCO_3^- e excesso de bases, mas não alterou os valores de

lactose plasmática, atributos do estresse oxidativo, teor de sódio, potássio, cálcio iônico, pH, PCO_2 e TCO_2 . Mesmo em clima subtropical de altitude, durante a estação quente, vacas leiteiras se beneficiam do acesso à sombra para manter seu equilíbrio ácido-básico e reduzir o dano ao DNA.

Palavras chave: dano ao DNA, equilíbrio ácido-básico, estresse por calor, estresse oxidativo, sombra

Abstract

Shade provision helps to minimize the deleterious effects of heat stress on the physiology and metabolism of dairy cows, but its benefits in animals under light heat stress need to be better evaluated. The objective of this study was to evaluate the benefits of shade provision on the attributes of the acid-base balance, arterial gases, oxidative stress and DNA damage of dairy cows under mild heat stress. The study was conducted in Lages / SC, from 24/01 to 07/02/2013 with 14 cows. The animals were divided into two groups: with and without access to shade and were evaluated in three stages: pre-stress, stress and post-stress when the animals had access to shade, part of the animals were deprived of shade and later all had access to shade, respectively. We evaluated attributes of the acid-base balance, oxidative stress, arterial gases, plasma lactose and DNA damage. Under mild stress, deprivation of shade values resulted in higher ($P < 0.05$) comet assay (DNA damage), lower values ($P < 0.05$) PO_2 , SO_2 , HCO_3 and base excess, but did not alter the plasma lactose values, oxidative stress attributes as sodium, potassium, ionized

calcium, pH, PCO₂ and TCO₂. In sub-tropical climate of altitude during the hot season, dairy cows benefit from access to shade to keep acid-base balance and reduce DNA damage.

Key words: acid-base balance, DNA damage, comet assay, heat stress, oxidative stress, shade

Introdução

O estresse por calor prejudica aspectos da fisiologia e metabolismo dos animais. Na região subtropical, animais mantidos em pastagem recebem radiação solar excessiva especialmente durante a estação quente (Silanikove, 2000) e podem se beneficiar do acesso à sombra. O acesso à sombra reconhecidamente reduz a carga térmica e a radiação solar sobre os animais (Frazzi et al., 1996) em zonas quentes como os trópicos, porém as evidências dos benefícios do provimento de sombra em região subtropical são ainda escassas (Barbosa et al., 2004).

Sob estresse por calor, os animais aumentam a frequência respiratória (Perissinotto et al., 2009; Baccari Jr, 2001), aumentando a perda de CO₂ pelos pulmões e provocando uma alcalose respiratória (González e Silva, 2006), parcialmente compensada pela eliminação de HCO₃⁻ pela urina, o que pode levar ao quadro de acidose metabólica (Kadzere, 2002), com alterações do equilíbrio ácido-básico (Sucupira e Ortolani, 2003; Freitas, 2010), gasometria (Pruden et al., 1994). Ocorre a diminuição da atividade enzimática oxidativa, da taxa metabólica e a concentração de vários hormônios são

alteradas (Nardone, 1998; Pereira et al., 2008). Resultados relacionando o provimento ou não de sombra para vacas em estresse térmico leve e alterações no equilíbrio ácido-básico, estresse oxidativo, gasometria são escassos e não encontramos referências quanto ao dano ao DNA ou modificação da permeabilidade das junções firmes da glândula mamária provocados pelo estresse térmico em vacas leiteiras. O conhecimento da interação entre os animais e o ambiente é fundamental para a tomada de decisões quanto a estratégias de manejo a serem utilizadas para maximizar as respostas produtivas. O entendimento das variações diárias e sazonais das respostas fisiológicas permite a adoção de ajustes que promovam maior conforto aos animais. Objetivou-se com este trabalho avaliar se em região subtropical de altitude, o provimento de sombra a vacas leiteiras em estresse térmico altera atributos do equilíbrio acidobásico, gasometria, estresse oxidativo, dano ao DNA e a permeabilidade das junções firmes das células epiteliais mamárias.

Material e métodos

Local, duração, animais

O estudo foi realizado em Lages-SC, entre os dias de 24 de janeiro de 2013 a 7 de fevereiro de 2013, no setor leiteiro da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC-CAV), localizado na cidade de Lages - SC Brasil (latitude -27 °48 '58' ', longitude 50 °19' 34 " e altitude de 950 metros acima do

nível do mar), com umidade relativa média de 79,3%, caracterizada por clima temperado subtropical.

Foram utilizadas 14 vacas em lactação, 10 da raça Holandesa e 4 mestiças Holandês x Jersey. As vacas foram selecionadas do rebanho experimental para constituir um grupo semelhante em relação à produção de leite, ordem de nascimento, raça, período de lactação e contagem de células somáticas (CCS). No início do experimento, os animais apresentaram $537,6 \pm 93,5$ kg de peso corporal, escore de condição corporal (ECC) de $2,8 \pm 0,3$, $2,7 \pm 1,5$ lactações, $20,6 \pm 6,5$ kg de leite / dia e $149,3 \pm 48,9$ dias em leite. Este grupo foi dividido em 2 grupos com 7 vacas cada, as quais foram colocadas em dois piquetes (A e B) com 0,8 hectares (ha) cada, compostas por grama Sudão (*Sorghum sudanense L.*) e Papua grass (*Brachiaria plantaginea*). Os piquetes apresentavam formato aproximadamente retangular e tinham área com sombra natural de árvores (eucaliptos) na sua extremidade menor. A massa de pasto foi superior a 3000 kg de Massa Seca/ha e a oferta de pasto foi aproximadamente de 10 kg de MS /100 kg de corporal vivo/dia.

Durante os primeiros 5 dias (até 28/01), todas as vacas tinham livre acesso à sombra. Entre 29/01 a 01/02, as vacas do tratamento sem sombra foram privadas do acesso à área sombreada pela colocação de uma cerca, evitando a sua entrada embaixo das árvores. Dessa forma o período pré-estresse compreendeu os dias 1 a 5, e o período estresse compreendeu 4 dias (dias 6 a 9) e o período recuperação compreendeu 6 dias (dias 10 a 15).

As vacas foram ordenhadas 2 vezes ao dia às 6h e 18h e suplementação foi fornecida depois das 2 ordenhas, na quantidade de 6

kg/vaca/dia). A suplementação concentrada foi composta de 200g/kg de farelo de soja, 750g/kg de milho moído, 30g/kg de sal mineral novo bovigold[®] da empresa Tortuga e 20g/kg de bicarbonato de sódio. O suplemento continha 88% MS, 16% PB, 8% fibra em detergente neutro (FDN) e 75% Nutriente Digestível Total/kg (base da MS). A composição do pasto foi Proteína Bruta (PB) 16%, Fibra Bruta (FB) 21%, EE 4%, NDT 70%. A quantidade da suplementação concentrada e do pasto em oferta foi calculada para atender as exigências nutricionais de 25 kg de produção de leite (NRC, 2001).

Medidas realizadas:

Foram realizadas coletas de sangue depois da ordenha da tarde, mas antes das vacas receberem a suplementação, nos dias 5, 6, 7, 8, 9, 11 foram coletadas amostras de sangue da veia jugular em tubos contendo heparina nas quais foram determinados indicadores do estresse oxidativos: TBARS (substância reativa ao ácido tiobarbitúrico), Carbonil, Nitrito/Nitrato, lactose plasmática e dano de DNA pelo ensaio de análise cometa. Para as análises de lactose foram colocadas em tubos sem anticoagulante. A determinação foi realizada por ensaio enzimático EnzyChrom Lactose Assay Kit (ELAC-100), usando leitor de microplacas (Bio-Tek Instruments, modelo EL808 Microplate, Winooski, EUA).

Como indicador dos efeitos do estresse oxidativo sobre os lípideos da membrana celular, foi utilizada a formação de TBARS, durante uma reação ácida de aquecimento, quando as amostras de sangue foram misturadas com 1 mL de ácido tricloroacético a 10% e 1 mL de ácido tiobarbitúrico 0,67%, e, em

seguida, aquecidas num banho de água fervente durante 15 min. TBARS foi determinada por colorimetria, pela absorbância a 535 nm, utilizando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão externo. Os resultados foram expressos como equivalentes de malondialdeído por miligrama de proteína.

O efeito do estresse oxidativo em proteínas do sangue foi avaliado por meio da determinação de grupos carbonil baseada na reação com dinitrofenilhidrazina. Resumidamente, as proteínas foram precipitadas por adição de ácido tricloroacético a 20% e dissolvidas em dinitrofenilhidrazina e a absorbância foi avaliada em 370 nm. Os resultados são expressos como níveis de proteínas carboniladas por miligrama de proteína.

Os níveis de óxido nítrico é possível formação de peroxinitrito e a concentração de nitrito/nitrato foram mensurados utilizando a reação de Griess, por adição de 100 µL de reagente de Griess [0,1% (w/v) em H₂O e 1% (w/v) de sulfanilamida em 5% (v/v) de H₃PO₄ concentrado, volume [1:1] para a 100 µL da amostra. A concentração de nitrito/nitrato foi avaliada em 550 nm com resultados expressos em nmol/mg proteína.

O ensaio cometa foi realizado em condições alcalinas com pH>13, sendo feito o ajuste do pH com HCl. O protocolo utilizado para a análise de dano ao DNA usou eritrócitos expostos a 200 µM H₂O₂ ou PBS os quais foram submetidos ao ensaio cometa e avaliados com o uso do sistema de análise de imagem ScionImage em níveis de limiar de 50,60,70,80 (Dhawan et al., 2004). Uma gota de sangue foi coletada em um microtubo contendo heparina, o que se constituiu no material de interesse. Cem células selecionadas aleatoriamente foram analisadas para cada amostra/animal. As células foram

classificadas de acordo com o formato da imagem em 5 classes (sem dano = 0, dano máximo = 4). Desse modo, constituindo um índice de dano para cada amostral/animal variável de 0 (sem dano algum) a 400 (dano máximo – 100 células x 4).

Foram coletadas amostras de sangue da artéria auricular caudal das vacas para realização da gasometria nos dias 5, 8 e 11 após o início do experimento. Após realização da tricotomia do local a ser puncionado, aplicou-se pomada dermatológica de lidocaína 25 mg e prilocaína 25 mg (EMLA, AstraZeneca) para facilitar a visualização da artéria. O período para ação do anestésico tópico era de aproximadamente 5 minutos, após este período foi realizada a coleta de 1mL de sangue arterial em seringas heparinizadas. Foram determinados pH, sódio, potássio, cálcio iônico, glicose, pO₂, tCO₂, HCO₃, sO₂, excesso de base e pCO₂ com auxílio de analisador de gases portátil (iStat, Abbott Point of Care, EUA).

A medição da TA e UR do ar foi realizada por modelo de coletor de dados portátil estação HT-500 tempo, colocado a 1,5 m acima do solo e instalado na área sombreada e ensolarada dos piquetes.

O índice de temperatura e umidade (ITU) foi usado como um indicador de conforto térmico e foi calculada usando a temperatura do ar (TA) e umidade relativa (UR) para todos os dias do experimento que utilizam a fórmula (Rosenberg et al., 1983): $ITU = (0,8 \times TA + (UR/100) \times (TA - 14,4) + 46,4$, onde TA = temperatura do ar em °C e UR = umidade relativa %. O ITU foi utilizado para classificar o estresse calórico como ameno ou brando (72 a 78), moderado (79 a 88) e severo (89 a 98), conforme Smith et al. (2013).

Delineamento experimental e análise estatística

As vacas foram consideradas as unidades experimentais. Os dados de natureza contínua como os valores de sódio, lactose plasmática, potássio, cálcio iônico, hemoglobina, pH, pO_2 , sO_2 , pCO_2 , HCO_3^- , excesso de bases, análise cometa, TBARS, carbonil e relação nitrito:nitrato foram submetidos ao teste de normalidade e posteriormente foram submetidos à análise de variância considerando o efeito de dias, tratamento (com e sem sombra) hierarquizado dentro de tratamento e foram usados como covariáveis os mesmos atributos mensurados no período pré-estresse, quando todos os animais tiveram acesso à sombra. Foram usados os procedimentos univariate (teste de normalidade) e o mixed do SAS (enterprise guide 5.2). As médias foram separadas pelo Lsmeans opção pdiff. Foi adotado o nível de 0,05 de probabilidade para rejeição da hipótese de nulidade.

Resultados

Foram observadas variações de TA e UR do ar entre manhã, tarde e noite, bem como entre os dias, mas diferenças moderadas foram observadas entre áreas com e sem sombra (tabela 1). Em geral, a temperatura e ITU foram inferiores às 9h, em comparação com as que estão em 15h, e as medições às 21h foram intermediárias. Para UR do ar, os menores valores ocorreram geralmente às 15h nos piquetes sem sombra. Os valores de ITU foram mais elevados nos dias 29, 30 de janeiro e 01 de fevereiro nos horários 15 e 21h.

Tabela 1. Temperatura do ar, umidade relativa e índice de temperatura e umidade medidos nos piquetes com e sem sombra as 9h, 15h e 21h.

	Com sombra					Sem sombra			
	Dia/Mês					Dia/Mês			
	Pré Dia 5	Exp Dia 6	Exp Dia 7	Exp Dia 8	Exp Dia 9	Exp Dia 6	Exp Dia 7	Exp Dia 8	Exp Dia 9
Atributos	28/jan	29/jan	30/jan	31/jan	01/fev	29/jan	30/jan	31/jan	01/fev
ITU 09:00 h***	62.0	63.3	63.2	64.4	68.0	65.5	64.3	66.5	68.4
ITU 15:00 h ***	73.5	72.7	74.8	76.4	78.6	77.1	75.5	76.8	79.6
ITU 21:00 h***	65.4	68.5	68.0	70.2	69.9	67.6	68.0	69.3	77.8

* Tbs = temperatura de bulbo seco (°C); ** UR = umidade relativa (%); ***ITU = (1.8x

Tbs + 32)-[(0.55-0.0055 x UR) x (1.8 x Tbs – 26.8)]

Quando privados do acesso à sombra, as vacas apresentaram maiores valores ($P < 0,05$) da análise cometa (dano ao DNA), mas valores menores ($P < 0,05$) da pO_2 , sO_2 e excesso de base em relação àquelas com acesso à sombra (tabelas 3, 4, 5). No entanto, as vacas não apresentaram ($P > 0,05$) valores distintos em relação àquelas com acesso à sombra quanto aos atributos hemoglobina, lactose plasmática, sódio, potássio, cálcio iônico, pH, pCO_2 e determinações do estresse oxidativo como TBARS, carbonil e proporção nitrito:nitrato (tabelas 2, 3, 4 e 5).

Tabela 2. Valores da probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade dos efeitos de dia, tratamento hierarquizado dentro de dia e do ajuste por covariância dos sanguíneos de vacas com e sem acesso à sombra em estresse térmico.

Fonte Variação	Dia	Tratamento (dia)	Cov (pré)
Cometa			
(n°)	< 0,0001	< 0,0001	0,0231
TBARS			
(MDA equiv/mg prot)	NS	NS	NS
Carbonil			
(carb prot/mg proteína)	NS	NS	0,0716
Nitrito/nitrato			
(nmol/mg proteína)	0,0082	NS	0,0431
Lactose Plasmática			
(mg/dL)	NS	NS	NS

TBARS - substância reativa ao ácido tiobarbitúrico

Tabela 3. Valores médios de dano ao DNA e atributos oxidativos de acordo com o acesso à sombra (com sombra = CS ou sem sombra = SS) nos períodos estresse e recuperação

Atributo	Trat.	Dias				
		Estresse			Pós (recuperação)	
		7	8	9	10	11
Cometa(nº)	SS	0,85 a D	1,55 a A	1,37 a B	1,03 a C	0,67 a E
	CS	0,52 b A	0,51 b A	0,52 b A	0,50 b A	0,52 b A
TBARS	SS	0,0006 a A	0,0004 a A	0,0005 a A	-----	0,0006 a A
	CS	0,0008 a A	0,0005 a A	0,0005 a A	-----	0,0006 a A
Carbonil	SS	0,0041 a A	0,0056 a A	0,004 a A	-----	0,005 a A
	CS	0,0042 a A	0,0074 a A	0,004 a A	-----	0,004 a A
Nitrito/ nitrito	SS	0,055 a A	0,055 a A	0,76 a A	-----	0,082 a A
	CS	0,061 a B	0,054 a B	0,1 a A	-----	0,085 a AB

a,b são avaliados na coluna, A,B são avaliados na linha, diferentes letras na coluna ou diferentes letras na linha representam diferença significativa ($P < 0,05$); (6,7,8,9 dias do período experimental; 10 e 11 pós experimental); TBARS - substância reativa ao ácido tiobarbitúrico

No 10º dia do experimento, ou seja, 1 dia após voltarem a ter acesso à sombra, o grupo de vacas previamente privado de sombra apresentou valores superiores da análise cometa (dano ao DNA), mas não apresentou diferenças ($P < 0,05$) quanto aos demais parâmetros hematológicos, gasometria e de estresse oxidativo e lactose plasmática comparada ao grupo de vacas com acesso permanente à sombra. Em relação a sua evolução durante o experimento, o grupo de vacas privado de sombra apresentou valores maiores da análise cometa nos dias 8 e 9 (estresse) em relação ao primeiro dia sem acesso à sombra (dia 5) e em relação ao último dia do período pós-estresse. As vacas previamente privadas de sombra apresentaram menores valores de

sódio, mas maiores valores de potássio, cálcio ionizável, hemoglobina, $p\text{CO}_2$, $p\text{O}_2$, $t\text{CO}_2$, HCO_3 , $s\text{O}_2$ e excesso de bases no período de pós-estresse em relação ao período de estresse. As vacas que tiveram acesso permanente à sombra não apresentaram diferenças nos valores de pH, $p\text{CO}_2$, $p\text{O}_2$, $s\text{O}_2$, $t\text{CO}_2$, HCO_3 e excesso de base entre o período de estresse e pós-estresse. No entanto, os valores de sódio dos animais permanentemente com acesso à sombra se reduziram no período pós-estresse, enquanto os valores de cálcio ionizável, potássio, hemoglobina aumentaram no período pós-estresse. Ambos os grupos de animais apresentaram maiores valores de lactose plasmática no período pós-estresse.

Tabela 4. Valores médios dos atributos do equilíbrio ácido-básico e gasometria de acordo com o acesso à sombra (com sombra = CS ou sem sombra = SS) nos períodos estresse e recuperação

Atributo	Tratamento	Dias	
		Estresse 8	Pós 10
Potássio	SS	3,09 a B	3,78 a A
(mEq/L)	CS	3,28 a B	3,89 a A
Cálcio	SS	0,54 a B	0,94 a A
Iônico (mEq/L)	CS	0,64 a B	0,83 a A
Sódio	SS	142,1 a A	137,6 a B
(mEq/L)	CS	141,0 a A	130,0 a B
Hemoglobina	SS	5,84 a B	7,31 a A

(g/dL)	CS	5,78 a B	7,4 a A
pH	SS	7,46 a A	7,47 a A
	CS	7,49 a A	7,48 a A
pCO ₂	SS	27,93 a B	33,11 a A
(mmHg)	CS	29,83 a A	32,23 a A
pO ₂	SS	71,0 b B	83,6 a A
(mmHg)	CS	80,6 a A	84,2 a A
sO ₂	SS	95,0 b B	96,9 a A
(%)	CS	96,7 a A	97,2 a A
tCO ₂	SS	21,28 a B	25,29 a A
(mmHg)	CS	23,50 a A	25,17 a A
HCO ₃	SS	20,17 a B	24,14 a A
(mEq/L)	CS	22,85 a A	24,19 a A
Excesso	SS	-3,78 b B	0,36 a A
Base (mEq/L)	CS	-0,25 a A	0,58 a A

a,b são avaliados na coluna, A,B são avaliados na linha, diferentes letras na coluna ou diferentes letras na linha representam diferença significativa (P<0,05); CS - com sombra; SS - sem sombra; pCO₂ - pressão parcial de gás carbônico; pO₂ - pressão parcial de oxigênio; sO₂ - saturação de oxigênio; tCO₂ - gás carbônico total; HCO₃ - bicarbonato;

Tabela 5. Valores médios de lactose plasmática de acordo com o acesso à sombra (com sombra = CS ou sem sombra = SS) nos períodos estresse e recuperação

Atributo	Tratamento	Dias				
		Estresse				Pós (recuperação)
		6*	7*	8*	9*	
Lactose (nM)	SS	1,15 a AB	0,80 a A	0,63 a A	0,76 a A	1,38 a B
	CS	0,80 a A	0,60 a A	0,63 a A	0,98 a A	1,45 a B

a,b são avaliados na coluna, A,B são avaliados na linha, diferentes letras na coluna ou diferentes letras na linha representam diferença significativa ($P < 0,05$); * (6,7,8,9 dias do período experimental; 11 pós experimental); SS - sem sombra; CS - com sombra

Discussão

Dano ao DNA Teste Cometa

O estresse oxidativo resultante do aumento da produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, e/ou uma diminuição da defesa antioxidante conduz a danos de macromoléculas biológicas e perturbação do metabolismo normal (Trevisan et al., 2001). No presente estudo, as vacas sem acesso à sombra apresentaram maior dano celular. Em estudos realizados com ratos foi verificado que o aquecimento do escroto foi associado ao dano ao DNA nos espermatozoides, redução da contagem espermática (Sailer et al. 1997, Banks et al. 2005) e redução do número de crias nascidas vivas (Paul et al., 2008). O estresse por calor danifica DNA, RNA e a síntese de proteínas, causando desnaturação de proteínas e condensação anormal da cromatina,

bem como redução da integridade do DNA (Banks et al., 2005). Vários mecanismos contribuem para a resposta celular ao estresse envolvendo o reparo do DNA, apoptose, resposta ao choque térmico, mecanismos de defesa antioxidante, e pontos de controle do ciclo celular. Há evidências de danos às mitocôndrias, com prejuízo ao metabolismo energético (Ruiz-Pesini et al., 1998). O calor incrementa a apoptose (Banks et al., 2005), causa dissociação e/ou fragmentação dos cromossomas (Van Zelst et al., 1995), mudanças nos níveis de oxigênio, água e transporte de íon e modifica a estrutura das células o que explica a elevação dos valores obtidos na análise cometa.

Os mecanismos através dos quais ocorre morte celular em resposta ao estresse térmico ainda não estão completamente elucidados, mas alguns estudos tem demonstrado que ocorre morte programada das células germinativas através de apoptose (Nichi et al., 2006). Este tipo de morte celular também ocorre em função da ação de substâncias oriundas do estresse oxidativo, como no caso de radicais livres, determinando alterações no metabolismo celular sistêmico (Guimarães et al., 2011). Conforme Sies (1993) espécies oxidativas podem ser formadas no interior das células e transportadas para outros locais onde poderão ser ativadas e provocar oxidação de componentes celulares.

Embora não seja bem conhecida a origem das espécies reativas de oxigênio (EROs) nos casos de estresse calórico, se sabe que estão aumentadas nestes casos (Kumagai et al., 2002). No organismo as EROs reagem com ácidos graxos poliinsaturados para formar lipoperóxidos que compõem a cascata de reações degenerativas dos lipídeos (Biesalsky, 2002).

Como consequência deste efeito, os radicais peroxil lipídicos são liberados para a circulação sanguínea elevando sua concentração, indicando a ocorrência de lesão de membrana celular (Yagi, 1987). Quando formas reativas de oxigênio são produzidas mais rápido do que podem ser neutralizadas de forma segura por mecanismos antioxidantes, aparecem os resultados do estresse oxidativo, com dano na membrana celular (Sies, 1991). Estas condições podem contribuir para levar ao aparecimento de problemas de saúde nos animais como mudanças na atividade sexual, produção qualitativa e quantitativa de sêmen, falhas no mecanismo de termoregulação (Guimarães et al., 2011; Miller et al., 1993;).

Estresse oxidativo

TBARS, Carbonil, Nitrito/Nitrato

O estresse oxidativo avaliado pela técnica de TBARS, Carbonil e relação Nitrito/nitrato não variou entre os grupos de vacas com e sem acesso a sombra, provavelmente porque as vacas deste estudo foram expostas estresse térmico leve. Nossos resultados estão em acordo com os de Trout et al. (1998) os quais usaram vacas no segundo terço da lactação e com Bernabucci et al., (2002), estudaram vacas no período de transição. Segundo Halliwell e Chirico (1994), Bernabucci et al., (2002) e Appasamy et al. (2008), o estresse calórico agudo causa aumento de TBARS e carbonil, onde o nitrito/nitrato é utilizado apenas como parâmetro para ver se ocorreu o aumento do dano em eritrócitos

de animais estressados e provoca alterações no status antioxidante destas células, com aumento das formas reativas de oxigênio.

Sódio, Cálcio Ionizável, Potássio e pH

A ausência de diferenças significativas nos teores de sódio, potássio, cálcio ionizável entre os grupos de vacas com e sem acesso à sombra durante a fase de estresse e de pós-estresse pode ser devido às condições moderadas de estresse, apesar da frequência respiratória das vacas privadas de sombra ter aumentado à tarde em comparação com as vacas com acesso a sombra. Entretanto, pode-se constatar (artigo 4) que as vacas conseguiram evitar aumento pronunciado da temperatura corporal e se supõe que mesmo hiperventilando, não modificaram expressivamente seu status metabólico, não alterando o pH do sangue nem os cátions. O sódio (Na⁺), o potássio (K⁺) e o cloro (Cl⁻) são íons fundamentais na manutenção da pressão osmótica e equilíbrio ácido-básico dos líquidos corporais. Os níveis de Na⁺, K⁺ e Cl⁻ do plasma também são afetados pelo estresse calórico. À medida que a temperatura aumenta, as concentrações de K⁺ e Na⁺ diminuem, enquanto que o Cl⁻ aumenta (Belay e Teeter, 1993; Borges et al., 2003).

Gasometria

Os menores valores observados de pO₂, sO₂ e excesso de base nas vacas sem acesso à sombra em relação àquelas com acesso à sombra são atribuídos às respostas fisiológicas dos animais para aumentar as perdas de calor por evaporação e transpiração. O fato do estresse térmico ter sido leve

pode ter provocado uma acidose metabólica tênue, uma vez que não foram detectadas diferenças de pH sanguíneo, $p\text{CO}_2$ e HCO_3^- e os valores do excesso de bases são relativamente pequenos e provavelmente mostra os animais compensando o estresse por calor, elevando a frequência respiratória. Em condições de estresse mais severo, se espera que o aumento mais pronunciado na taxa respiratória resulte em perda de dióxido de carbono (CO_2), provocando a alcalose respiratória, com redução da pressão parcial de CO_2 ($p\text{CO}_2$), do ácido carbônico (H_2CO_3) e hidrogênio (SOUZA et al., 2002).

Lactose plasmática

A lactose plasmática é um indicador da permeabilidade das junções firmes (Stelwagem et al., 2000), uma vez que esse carboidrato é sintetizado exclusivamente na glândula mamária (Kuhn e Linzell, 1970) e secretado no lúmen alveolar. Portanto qualquer vestígio desse componente no sangue é um indicador do aumento da referida permeabilidade (Stumpf et al., 2013). O fato das vacas com e sem acesso à sombra não terem apresentado diferenças significativas quanto ao teor plasmático indica que não houve diferença de permeabilidade possivelmente por causa da baixa intensidade do estresse.

Conclusões

Em região subtropical de altitude, o provimento de sombra a vacas leiteiras em estresse térmico leve reduz os danos ao DNA, mas altera poucos atributos do equilíbrio ácido-básico e gasometria, não modifica a

permeabilidade das junções firmes das células epiteliais mamárias e os atributos do estresse oxidativo.

Agradecimentos

A Fundação de Amparo a Pesquisa e a Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro para a execução das pesquisas.

À Família Eidt de Itapiranga que permitiu a realização de um dos experimentos com estresse calórico.

À Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC) que disponibilizou sua unidade de produção leiteira para que realizasse esse experimento

Bibliografia

Appasamy M, Jauniaux E, Serhal P, Al-Qahtani A, Groome N, Muttukrishna S 2008. Evaluation of the relationship between follicular fluid oxidative stress, ovarian hormones, and response to gonadotropin stimulation. *Fertility and Sterility* 89, 912–921.

Baccari Jr. F 2001. Manejo ambiental da vaca leiteira em climas quentes. Londrina: Universidade Estadual de Londrina. 142p.

Banks S, King SA, Irvine DS, Saunders PT 2005. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction* 129, 505–514.

Barbosa OR, Boza PR, Santos GT, Sakagushi ES, Ribas NP 2004. Efeitos da sombra e da aspersão de água na produção de leite de vacas da raça Holandesa durante o verão. *Acta Scientiarum Animal Sciences* 26(1), 115-122.

Belay T, Teeter RG 1993. Broiler water balance and thermobalance during thermoneutral and high ambient temperature exposure. *Poult Science*. 72:116-24

Bernabucci B, Ronchi N, Lacetera, e Nardone A 2002. Markers of Oxidative Status in Plasma and Erythrocytes of Transition Dairy Cows During Hot Season. *Journal Dairy Science* 85, 2173–2179.

Biesalsky HK 2002. Free radicals theory of aging. *Current Opinion in Clinical Nutrition Metabolic Care, Amsterdam* 5(1), 5-10.

Borges SA, Maiorka A, Silva AVF 2003. Fisiologia do estresse calórico e a utilização de eletrólitos em frangos de corte. *Revista Ciência Rural* 33(5), 975-981.

Dhawan, A, Bajpayee, M, Pandey AK, Parmar, D. 2004. ITRC. The SCGE/comet assay protocol. 1. Protocol for the single cell gel electrophoresis: comet assay for rapid genotoxicity assesment. 10p. Disponível em www.comet.itrcindia.org

Frazzi E, Calamari L, Calegari F 1996. Dairy cows heat stress index including air speed parameter. *AgEng'96, Conference on Agricultural Engineering, Madrid*, 23-26.

Freitas MD, Ferreira MG, Ferreira PM, Carvalho AU, Lage AP, Heinemann MB, Facury Filho EJ 2010. Equilíbrio eletrolítico e ácido-base em bovinos. *Ciência Rural* 40, 2608-2615.

González FHD, Silva SC 2006. *Introdução a Bioquímica Clínica Veterinária*. Porto Alegre: UFRGS.

Guimarães JA, Xavier GC, Soares PC, Dantas AC, Soares FAP, Mendonça CL, Guerra MMP, Silva Júnior VA 2011. Perfil de marcadores do estresse oxidativo em caprinos suplementados ou não com selênio e vitamina E e submetidos à insulação escrotal. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina* 32, 1955-1964.

Halliwell B, e Chirico, C.E 1994. Oxygen-derived Species: Their relation to human disease and environmental stress. *Environmental Health Perspectives* 102, 5-12.

Kadzere CT, Murphy MR, Silanikove N, Maltz E 2002. Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Livestock Production Science* 77, 59-91.

Kuhn N, Linzell JL 1970. Measurement of the quantity of lactose passing into the mammary venous plasma and lymph in goats and in a cow. *Journal Dairy Reserch* 37, 203–208.

Kumagai A, Kodama H, Kumagai J, Fukuda J, Kawamura K, Tanikawa H, Sato N, Tanaka T 2002. Xanthine oxidase inhibitors suppress testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. *Molecular Human Reproduction* 8(1), 118-123.

Miller JK., Brzezinska-Slebodzinska E e Madsen FC 1993. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *Journal Dairy Science* 76, 2812–2823.

Nardone A 1998. Thermoregulatory capacity among selection objectives in dairy cattle in hot environment. *Zootecnia Nutrition Animal*. 24, 295-306.

National Research Council 2001. Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition. Nutrient requirements of dairy cattle. Washington, DC: National Academy Press. 381p.

Nichi, M, Bols, PEJ, Zuge, RM, Barnabe, VH, Goovaerts, IGF, Cortada, CNM. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. *Theriogenology*, New York, v. 66, n. 4, p. 822-828, 2006

Paul C, Murray AA, Spears N, Saunders PTK 2008. A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. *Reproduction* 136, 73–84.

Pereira AM, Baccari Jr F, Titto EA 2008. Effect of thermal stress on physiological parameters, feed intake and plasma thyroid hormones concentration in Alentejana, Mertolenga, Frisian and Limousine cattle breeds. *Int. J. Biometeorol.* 52, 199-208.

Perissinotto M, Moura DJ, Cruz VF, Souza SRL, Lima KAO, Mendes AS 2009. Conforto térmico de bovinos leiteiros confinados em clima subtropical e mediterrâneo pela análise de parâmetros fisiológicos utilizando a teoria dos conjuntos fuzzy. *Ciência Rural* 39(5), 1492-1498.

Pruden EL, Siggaard-Andersen O e Tietz NW 1994. Blood gases and pH. In: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. Eds: Burtis CA e Ashwood ER. Philadelphia, WB Saunders, 1375–1448.

Rosenberg LJ, Biad BL, Verns SB 1983. Human and animal biometeorology. In: *Microclimate, the biological environment*. New York: Wiley- Interscience Publication, 423-467.

Ruiz-Pesini E, Diez C, Lapena Ac, Perez-Martos A, Montoya J, Alvarez E, Arenas J, Lopez-Perez Mj. 1998. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. *Clin Chem* 44, 1616– 1620.

Sailer BL, Sarkar LJ, Bjordahl JA, Jost LK, Evenson DP 1997. Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *J Androl* 18, 294–301.

Sies H 1991. *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. Academic Press, San Diego, CA.

Sies, H. Strategies of antioxidant defense. *European Journal Biochemistry*, Berlin, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

Silanikove N 2000. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. *Livestock Production Science* 67, 1-18.

Smith DL, Smith T, Rude BJ, Ward SH 2013. Short communication: Comparison of the effects of heat stress on milk and component yields and somatic cell score in Holstein and Jersey cows. *Journal of Dairy Science* 96(5), 3028-303.

Souza BB, Bertechini AG, Teixeira AS, Lima JAF 2002. Efeito da suplementação de cloreto de potássio na dieta sobre o equilíbrio ácido básico no desempenho de frangos de corte no verão. *Revista Ciência Agrotécnica* 26(6), 1297- 1304.

Stelwagen K, Hopster H, Van Der Werf JTN, Blokhuis HJ 2000. Short communication: effects of isolation stress on mammary tight junctions in lactating dairy cows. *Journal Dairy Science* 83, 48-51

Stumpf MT, Fischer V, Mcmanus CM 2013. Severe feed restriction increases permeability of mammary gland cell tight junctions and reduces ethanol stability of milk. *Anim* 7, 1137-1142.

Sucupira MCA, Ortolani EL 2003. Uso de sangue arterial e venoso no exame do equilíbrio ácido-básico de novilhos normais ou com acidose metabólica. *Ciência Rural* 33, 863-868.

Trevisan M, Browne M, Ram P, Muti J, Freudenheim AN, Carpsella D, Armstrong D 2001. Correlates of markers of oxidative status in the general population. *Am. Journal Epidemiology* 154, 348–356.

Trout JP, Mcdowell LR e Hansen PJ 1998. Characteristics of the estrous cycle and antioxidant status of lactating Holstein cows exposed to heat stress. *Journal Dairy Science*. 81, 1244–1250.

Van Zelst SJ, Zupp JL, Hayman DL, Setchell BP 1995. X-Y chromosome dissociation in mice and rats exposed to increased testicular or environmental temperatures. *Reproduction Fertility Dev* 7, 1117–1121.

Yagi K 1987. Lipid peroxides and human diseases. *Chemistry and Physics of Lipids*, Amsterdam 45 (2/4), 337- 351.

CAPÍTULO VII

Produção de queijo prato a partir de leite com diferentes estabilidades ao teste do álcool⁸

⁸ Artigo escrito de acordo com as normas da Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB)

Produção de queijo prato a partir de leite com diferentes estabilidades ao teste do álcool

Cheese making with milk showing different ethanol stabilities

Resumo

A produção de queijos depende da qualidade do leite usado e um dos atributos que podem afetar esse processo é a estabilidade do leite no teste do álcool. O experimento foi realizado em um laticínio da região do Vale do Braço do Norte no Sul de Santa Catarina, com o objetivo de avaliar a produção de queijos de massa firme quanto as características físico-químicas e rendimento, usando leite de baixa, média e alta estabilidade no teste do álcool. Foram produzidos 25 partidas de queijo a partir de silos de leite cru com diferentes estabilidades no teste do álcool, as quais foram classificadas como baixa (<72%), média (> 72 e <78%) e alta estabilidade ($\geq 78\%$ etanol v/v). Foram coletadas amostras do leite cru, leite pasteurizado, leite com cloretos, soro do leite e massa do queijo. Cada silo de leite foi considerado uma unidade experimental. Foi utilizado o delineamento completamente casualizado. Os atributos físico-químicos do leite e queijos além de variáveis relacionadas com o rendimento foram submetidos às análises de variância, avaliando o efeito da estabilidade (n=3). O leite cru de alta estabilidade apresentou menores valores de acidez titulável, cálcio iônico, mas maior valor de pH que o leite de baixa estabilidade. O leite pasteurizado proveniente do leite de alta estabilidade apresentou maior valor de pH que o leite pasteurizado proveniente do silo de menor estabilidade. Houve tendência (P<0,10) do leite pasteurizado de alta estabilidade apresentar maior teor de gordura que o leite pasteurizado de média estabilidade, enquanto o leite de alta estabilidade após a adição de cloretos apresentou tendência (P<0,10) a ter maior teor de proteína e extrato seco desengordurado que aquele de baixa estabilidade. A estabilidade ao etanol não influenciou os demais parâmetros avaliados no leite, soro do leite e queijo, inclusive o rendimento. A estabilidade não influenciou o processamento industrial de queijo tipo prato. Leite cru

com estabilidade igual ou superior a 72% podem ser utilizados na produção de queijo tipo prato.

Palavras chave: atributos físico-químicos, estabilidade, queijo tipo prato

Abstract

Cheese production depends on the quality of the raw milk used and one of the attributes which might affect this process is the stability of the milk to the alcohol test. The experiment was conducted in the south region of Santa Catarina State, in order to evaluate the production of cheese-like plate and its physical and chemical traits and yield, using milk with low, medium and high ethanol stability. Twenty-five cheese making runs were produced from raw milk silos with different ethanol stabilities, which were classified as low (<72%), medium (> 72 and <78%) and high stability ($\geq 78\%$ ethanol v/v). Samples were collected from bulk raw milk, pasteurized milk and milk after chlorides addition, whey and the cheese. Every milk silo was considered an experimental unit. The physical and chemical properties of milk and cheeses as well as variables related to efficiency of transformation of milk into cheese process were subjected to analysis of variance, according to the completely randomized design, evaluating the effect of milk ethanol stability ($n = 3$). High stability raw milk showed lower values of acidity, ionic calcium, but higher pH value compared with low stability milk. High stability pasteurized milk showed higher pH than low stability pasteurized milk. We noticed a trend ($P < 0.10$) of pasteurized milk with high stability showing higher fat content than pasteurized milk with medium stability, and high stability milk after the addition of chloride tended ($P < 0.10$) to present higher protein content and dry defatted stratum than of low stability milk with chlorides addition. The ethanol stability did not affect the other parameters evaluated in milk, whey and cheese, such as yield. The stability did not affect the industrial processing of cheese-like plate. Raw milk with ethanol stability of 72% or higher can be used to produce cheese-like plate.

Key words: cheese, physical-chemical attributes, stability

Introdução

O Brasil já é o sexto maior produtor de queijos do mundo, porém possui um consumo per capita ainda muito baixo, de pouco mais de 4 kg por habitante por ano, enquanto a França apresenta um consumo per capita de 27 kg e a Itália 24 kg. O mercado ainda é regionalizado, pois mais de 90% do consumo de queijo está localizado na região Sul e Sudeste. O queijo tipo prato é um dos queijos mais populares do Brasil (22% do consumo total de queijos), introduzido em Minas Gerais por imigrantes dinamarqueses, tem sua origem no queijo danbo dinamarquês e no gouda holandês (Furtado, 1994).

Existem problemas na qualidade do leite cru, os quais podem comprometer o seu processo industrial. Entre eles, se citam as elevadas contagens bacteriana e de células somáticas (Gabbi et al., 2013) e a baixa estabilidade do leite não ácido (LINA) freqüentemente encontrada em vários estados do Brasil, como no Rio Grande do Sul (Marques et al., 2007; Zanela et al., 2009), em São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro (Donatele et al., 2001; Roma Junior et al., 2007; Oliveira et al., 2011). A maneira usual de avaliação da estabilidade é o teste do álcool (ou alizarol) efetuado antes do recolhimento do leite nas unidades de produção e na chegada à plataforma de recebimento pela indústria. Por sua rapidez e baixo custo, esse teste é usado por todos os transportadores de leite. Poucos trabalhos vêm sendo realizados no Brasil relacionando a estabilidade do leite com a produção de derivados lácteos.

Entre os derivados lácteos, aqueles obtidos de processos que devem evitar a gelificação ou sedimentação como a produção de leite em pó, leite UHT e leite esterilizado se beneficiariam de matéria prima de elevada estabilidade térmica. Deposição de leite em equipamentos da linha acontece se o leite cru apresenta instabilidade ao calor, causando redução de rendimento industrial (Shilton et al., 1992). Em relação aos queijos de massa firme, como o tipo prato, os quais inclusive se beneficiariam de uma coagulação mais precoce (Tsioulpas et al., 2007), existem dúvidas quanto à estabilidade mínima necessária para a sua industrialização (Ribeiro et al., 2006; Backes et al 2012). Estudos mostram poucas diferenças entre o leite estável 72 e 80% (etanol v/v) quanto à composição e rendimento industrial na produção de queijos

de massa firme (Oliveira et al., 2011; Marques et al., 2007; Costabel et al., 2009), iogurte.

Neste estudo objetivou avaliar a produção de queijos tipo prato quanto as características físico-químicas e rendimento usando leite cru com baixa, média e alta estabilidade no teste do álcool.

Material e Métodos

O experimento foi realizado em um laticínio da região do Vale do Braço do Norte no Sul de Santa Catarina de 31/07 a 22/09 de 2014. O leite foi proveniente de propriedades da região, todos vinculados à indústria beneficiadora. O leite foi transportado a granel e sua estabilidade no teste do álcool foi avaliada na plataforma antes de seu carregamento ao silo. Foram selecionados silos de leite cru com diferentes estabilidades, totalizando 12 silos com baixa (72% etanol v/v), 6 média (> 72 e < 78%) e 7 com alta estabilidade (>78%). Foram coletadas de amostras de leite cru, leite após a pasteurização, leite após a adição de cloretos, soro do leite e massa do queijo, as quais foram analisadas.

Análises realizadas no leite cru, pasteurizado e com cloretos no laboratório da indústria:

- estabilidade no teste do álcool: esse teste foi feito misturando 2 mL de leite com 2 mL de solução aquosa com concentrações de etanol de 72 a 84% v/v em intervalos de 2 em 2 % (Tronco, 2003), dividindo em três grupos: baixa, média e alta estabilidade respectivamente. Foram produzidos 12 queijos com baixa estabilidade, 6 com média e 7 unidades com alta estabilidade.

- crioscopia: após realização de calibração do equipamento, procedeu a leitura de 2,5mL de leite de cada amostra em tubo crioscópico;

- acidez titulável: utilizou-se titulação com solução de hidróxido de sódio, a técnica de Dornic (Tronco, 2003);

- acidez mensurável (pH): a determinação do potencial hidrogeniônico foi feita com um potenciômetro da Hanna (Órdoñez et al., 2005) durante todas as etapas do processo de

fabricação do queijo (leite cru, leite pasteurizado, leite com cloretos, soro do ponto do corte da coalhada, soro do ponto da massa, soro na saída do dreno, massa do queijo antes da salga e queijo pronto);

- cálcio iônico usando eletrodos seletivos Orion com os seguintes cuidados: o eletrodo foi sensibilizado por no mínimo 4h em solução de cálcio padrão (100ppm), formulada a partir da solução de 1000 PPM (n° 932011). Para a calibração, foram necessários 50 mL de solução a 10 PPM e 50 mL a 100 PPM, também formuladas a partir da solução Padrão de Cálcio (1000 PPM), sendo adicionado 1 mL de Padrão ISA. Usou-se 50mL de leite, 1 mL de Padrão ISA, em temperatura de 23°C, deixando o eletrodo imerso, por cerca de 15 segundos, para a visualização do resultado em PPM (Barros, 1999).

- densidade foi avaliada após a colocação do leite em uma proveta de 250 mL, adiciona-se o termolactodensímetro e faz-se a leitura, corrigindo para a temperatura;

- gordura, proteína, sólidos totais, lactose, caseína, ureia e CCS (pelo método de citometria de fluxo (Fonseca E Santos, 2000). As amostras para composição do leite e CCS eram coletadas em frascos contendo o conservante bronopol.

Após a realização das análises pela indústria, o leite cru foi pasteurizado e direcionado para confecção do queijo. O processo de pasteurização do leite foi rápida (72°C em 15 segundos), além do volume de leite, foi anotado o rendimento, quilos de queijo, a dose de coagulante, dose de fermento, velocidade das liras no início e final do corte, horários e temperaturas em todas os processos da fabricação. Realizado todo o processo de formação da massa do queijo, dessoragem, a massa do queijo foi colocada em formas e levado à prensa por 3h e depois para salga por 14 a 18h com 20% de sal.

Após esse processo, o queijo foi seco por 24h em câmara fria, embalados a vácuo em película plástica termoencolhível e levados à câmara de maturação (12 a 14°C), onde foram maturados por no mínimo 25 dias para o desenvolvimento da consistência e sabor ideais. Durante o processamento na produção do queijo, foram avaliados o pH em diversos momentos como no ponto de separação do soro (pH no ponto), da massa antes da salga para decidir quando desenformar (pH precisa estar entre 5,5 a 5,7). No total foram 25 batidas: 12, 6 e 7, usando, respectivamente, leite de baixa, média e alta estabilidade. Em cada batida foram utilizados 6000 L de leite com média de 670 kg de queijos produzidos.

De cada batida foi tomado aleatoriamente 1 queijo para efetuar as análises de:

- gordura pela metodologia do butirômetro de Gerber;
- pH: utilizando-se um medidor de pH digital da marca Sensoglass modelo SP 769T;
- umidade usando um filtro de papel Whatman #1 para que 2 a 3 gramas da amostra fossem espalhadas e prensadas entre uma placa de Petri. Após isso, deixou-se o material por 4 horas em uma estufa a vácuo – 13,3 Kpa – a 100°C e pesou-se novamente para cálculo da umidade;
- acidez titulável (TRONCO, 2003);
- proteína determinada subtraindo-se o valor do nitrogênio não proteico do nitrogênio total. Após esse cálculo, o resultado foi multiplicado por 6,38;
- Cloretos determinados a partir de cinzas. São titulados contra nitrato de prata, precipitando sob a forma de cloreto de prata, em pH levemente alcalino. Cromato de potássio é usado como indicador. O final da titulação é visualizado pela formação do precipitado vermelho tijolo de cromato de prata (Castanheira, 2010).

Análise estatística

Cada queijo produzido a partir do leite de um silo foi considerado uma unidade experimental. Os dados numéricos de natureza contínua foram submetidos à análise de variância considerando o efeito da estabilidade ao teste do álcool ($n = 3$, estabilidades baixa ($\leq 72\%$ v/v) média (> 72 e $< 78\%$ v/v) e alta ($\geq 78\%$ v/v), segundo o delineamento completamente casualizado. Foram usados os procedimentos univariate (teste de normalidade) e o mixed do SAS (enterprise guide 5.2). As médias foram separadas pelo Lsmeans opção pdiff. Foi adotado o nível de 0,05 de probabilidade para rejeição da hipótese de nulidade.

Resultados

O leite cru de alta estabilidade apresentou menores valores de acidez titulável e cálcio iônico, mas maior valor de pH (Tabela 4) que o leite de baixa estabilidade (Tabela 1). O leite pasteurizado proveniente do leite de alta estabilidade apresentou menor valor de CBT, mas maior valor de pH (Tabela 4) que o leite pasteurizado proveniente do silo de menor estabilidade.

Houve tendência ($P < 0,10$) do leite pasteurizado de alta estabilidade apresentar maior teor de gordura que o leite pasteurizado de média estabilidade, enquanto o leite de alta estabilidade após a adição de cloretos apresentou tendência ($P < 0,10$) de maior teor de proteína e extrato seco desengordurado, mas apresentou menor ($P < 0,05$) CBT que aquele de baixa estabilidade (Tabelas 2 e 3). A estabilidade ao etanol não influenciou os demais parâmetros avaliados no leite, soro e queijo, evolução dos valores de pH e demais atributos do processamento do leite, inclusive o rendimento (Tabelas 1, 2, 3, 4, 5 e 6).

Tabela 1. Valores dos atributos físico-químicos do leite cru, conforme a estabilidade no teste do álcool

Fonte de Variação	P=F	Instável no teste do álcool		
		Baixa 72%	Média >72% e <78%	Alta ≥78%
Densidade (g/mL)	NS	1030,5	1030,8	1030,9
ESD (g/100g)	NS	8,68	8,69	8,70
Acidez titulável (°D)	0,0038	18,13 a	17,20 ab	16,71 b
Crioscopia (°H)	NS	-0,530	-0,530	-0,530
Gordura leite (g/100g)	NS	4,09	3,99	3,99
Proteína (g/100g)	NS	3,41	3,38	3,39
Lactose (g/100g)	NS	4,31	4,32	4,32
Caseína (g/100g)	NS	2,71	2,70	2,70
NUL (mg/dL)	NS	13,94	14,84	14,34
CCS (x1000cél/mL)	NS	603	595	576
Cálcio iônico (mg/L)	0,0521	139,6 a	147,04 a	112,4 b
Sódio (mg/L)	NS	454,5	446,9	426,5

Tabela 2. Valores dos atributos físico-químicos do leite pasteurizado, conforme a estabilidade no teste do álcool

Fonte de Variação	P=F	Instável no teste do álcool		
		Baixa 72%	Média >72% e <78%	Alta ≥78%
Densidade (g/mL)	NS	1030,0	1030,8	1030,0
ESD (g/100g)	NS	8,71	8,75	8,72
Acidez titulável (°D)	NS	17,5	17,3	16,9
Crioscopia (°H)	NS	-0,530	-0,530	-0,530
Gordura leite (g/100g)	NS	3,97	3,94	4,02
Proteína (g/100g)	NS	3,41	3,43	3,39
Lactose (g/100g)	NS	4,32	4,35	4,28
Caseína (g/100g)	NS	2,71	2,72	2,71
Ureia (mg/dL)	NS	14,09	15,01	14,80
CCS (x1000cél/mL)	NS	547	563	569
Cálcio iônico (mg/L)	NS	110,4	107,3	95
Sódio (mg/L)	NS	453,3	459,0	440,5

Tabela 3. Valores dos atributos físico-químicos do leite com cloretos, conforme a estabilidade no teste do álcool

Fonte de Variação	P=F	Instável no teste do álcool		
		Baixa 72%	Média >72% e <78%	Alta ≥78%
Densidade (g/mL)	NS	1029,5	1030,6	1030,6
ESD (g/100g)	NS	8,71	8,69	8,73
Acidez titulável (°D)	NS	17,5	17,3	16,9
Crioscopia (°H)	NS	-0,530	-0,490	-0,530
Gordura leite (g/100g)	0,0593	3,18 ab	3,09 b	3,26 a
Proteína (g/100g)	NS	3,41	3,37	3,40
Lactose (g/100g)	NS	4,32	4,34	4,20
Caseína (g/100g)	NS	2,74	2,72	2,72
Ureia (mg/dL)	NS	15,06	15,96	14,68
CCS (x1000cél/mL)	NS	482	716	440
Cálcio iônico (mg/L)	NS	157,3	153,6	146,6
Sódio (mg/L)	NS	435,3	468,7	462,0

Tabela 4. Evolução dos valores de pH do leite, soro e queijo durante o processo de fabricação conforme a estabilidade do leite cru no teste do álcool

Atributos	P>F	Instável no teste do álcool		
		Baixa (<72%)	Média (>72 e <78%)	Alta (≥78%)
pH leite cru	NS	6,73	6,76	6,78
pH leite pasteurizado	0,0199	6,64 b	6,72 ab	6,77 a
pH leite cloretos	0,0322	6,57 b	6,60 a	6,68 a
pH soro no corte	NS	6,44	6,45	6,48
pH soro ponto (separação da massa e do soro)	NS	6,37	6,39	6,40
pH soro na saída do dreno	NS	6,31	6,30	6,34
pH da massa de queijo antes da salga	NS	5,35	5,42	5,38
pH queijo	NS	5,61	5,57	5,51

Os valores de temperatura durante o processo, bem como as velocidades das liras, doses de coagulante e tempo até a salga não diferiram significativamente entre as classes de estabilidade do leite no teste do álcool (tabela 3).

Tabela 5. Valores referentes a algumas etapas do processo de fabricação conforme a estabilidade do leite cru no teste do álcool

Fonte de Variação	P>F	Instável no teste do álcool		
		Baixa (<72%)	Média (>72 e <78%)	Alta (≥78%)
Temperatura coagulação (°C)	NS	37,5	36,5	38,1
Velocidade inicial liras (unidade)	NS	3,75	3,80	3,90
Velocidade final liras (unidade)	NS	6,63	6,60	6,71
Temperatura corte (°C)	NS	36,0	37,1	37,7
Temperatura ponto da massa (°C)	NS	46,75	49,2	48,7
Dose coagulante (unidade)	NS	205	215	219
Tempo até a salga (min)	NS	164,0	163,0	171,3

Tabela 6. Valores referentes produção, rendimento e atributos dos queijos conforme a estabilidade do leite cru no teste do álcool

Atributos	P>F	Instável no teste do álcool		
		Baixa (<72%)	Média (>72 e <78%)	Alta (≥78%)
Produção queijo (kg)	NS	703,9	689,9	701,3
Rendimento (L leite/kg)	NS	8,74	8,92	8,93
Umidade queijo indústria (%)	NS	45,9	45,2	45,8
Gordura bruta queijo indústria (%)	NS	25,8	25,8	26,2
Gordura extrato indústria (%)	NS	47,8	47,3	48,4
Acidez queijo (%)	NS	0,18	0,17	0,17
Cloretos queijo (%)	NS	1,15	0,96	1,10
Gordura queijo Laboratório (%)	NS	26,0	26,6	26,2
Proteína queijo Laboratório (%)	NS	23,65	23,23	23,79

Discussão

Na produção dos queijos deste estudo, os silos de leite cru foram escolhidos conforme sua estabilidade ao teste do álcool. Essas diferenças se mantiveram nas amostras de leite pasteurizado, mostrando haver consistência na estabilidade após o processo de pasteurização rápida. Esse tratamento térmico é considerado leve e normalmente não desafia a estabilidade das caseínas quando não há acidez excessiva, o que foi o presente caso (Lewis e Deeth, 2009).

A adição de soluções de etanol em concentrações mais elevadas acentua o processo de desestabilização da micela de caseína devido à desidratação, favorecendo a coalescência das proteínas do leite (Mikheeva *et al.*, 2003). A Tetra Pak recomenda um produto estável a 75% de álcool, sem precipitação (negativo) como um mínimo, enquanto a Federação Internacional do Leite IDF sugere 72% de álcool, no mínimo. As diferenças de pH observadas entre os leites de alta e baixa estabilidades, ainda que todos dentro da faixa normal de variação (6,6 a 6,8) já foram observadas por outros autores como Tsioulpas *et al.*, (2007b), Lewis e Deeth (2009), Lin *et al.*, (2009). O menor valor de pH observado nos leites de menor estabilidade apresentam relação com a maior

concentração em cálcio iônico, reportado como um dos fatores causadores da menor estabilidade do leite (Horne e Muir, 1990; Chavez et al., 2004; Lewis, 2011), pois a saída do cálcio da estrutura micelar leva à maior exposição das porções hidrofóbicas das caseínas, aumentando a sua propensão em se agregar (Philippe et al., 2003). Dentro da faixa de valores 6,5 a 6,7 enquanto o pH aumenta, a concentração do cálcio iônico se reduz e as micelas de caseína se tornam mais estáveis (Negri et al., 2011). O pH interfere na estabilidade térmica do leite, uma vez que em pH ácido (abaixo de 6,5), reduz força iônica para a manutenção da estrutura micelar (Rose, 1961), o que determina um deslocamento do cálcio da fase coloidal para solúvel, aumentando o cálcio iônico (Van Boekel, 1993). Na maioria dos leites, a máxima estabilidade térmica se dá em um pH próximo a 6,7 e, isso ocorre porque nessa faixa, há uma agregação de proteínas do soro (albumina e globulina), com a superfície micelar (Singh, 2004). Entre 6,7 e 7,0 as κ -caseínas se separam das micelas, reduzindo a estabilidade do leite. Acima de 7,0, a concentração de cálcio iônico diminui e a estabilidade do leite aumenta novamente (Horne e Muir 1990; Singh, 2004).

O menor valor de pH observado nos leites de menor estabilidade poderia ter sido devido a conversão da lactose a ácido lático produzido por bactérias ou durante o aquecimento (Negri et al., 2004). Efetivamente, foram observados maiores valores de CBT nos leites de menor estabilidade, sobretudo os leites pasteurizado e após a adição de cloretos, embora o leite cru tenha exibido apenas valores numericamente superiores. Entretanto não houve diferenças estatísticas quanto aos teores de lactose no leite (Tabela 1), o que praticamente invalida essa suposição.

Os valores de acidez titulável acompanharam a variação de pH, ou seja, leites de menor estabilidade apresentaram maiores valores (Tabelas 1, 2 e 3), embora os valores tenham permanecido dentro da faixa normal de variação (14 a 18°D) (Tronco, 2003). No entanto, não se constataram diferenças significativas quanto ao teor de proteína, e embora não se tenha mensurado, pode-se especular que as diferenças quanto à acidez titulável possam ter sido devido às diferenças nas concentrações de fosfatos, citrato, entre outros. Por outro lado, há indícios de que mesmo sem haver diferenças no teor de proteínas, o tipo de proteína produzido no leite LINA (proporção de caseínas, proporção de proteínas do soro, alelos das caseínas) possa ter influência na estabilidade do leite. Existe contradição entre os resultados publicados a esse respeito. A proporção de κ -

caseína (Robitaille et al., 2001) e o polimorfismo genético das proteínas (Paterson et al., 1999) foram associados à estabilidade do leite. Barros (1999) encontrou maiores teores de κ -caseína e β -lactoglobulina no leite estável, ao contrário de Oliveira et al. (2011), os quais não encontraram diferenças nas frações proteicas entre o leite estável e instável ao teste do álcool e de Botaro et al. (2007) que não observaram diferenças entre o leite instável e estável quanto ao polimorfismo da β -lactoglobulina e da κ -caseína. E Barbosa et al. (2012) relataram que o leite instável apresentou maiores porcentagens de β -caseína e de proteínas totais, mas menor porcentagem de κ -caseína comparado ao leite estável.

Embora os leites cru tenham apresentado as diferenças de estabilidade no teste do álcool expressivas, não foram constatadas diferenças nos teores de ureia e lactose, o que vai contra os resultados encontrados por Negri et al. (2004), os quais observaram que leites com maior estabilidade térmica (tempo de coagulação) apresentavam menores teores de lactose após a pasteurização e maiores teores de ureia, e atribuíram seus efeitos às suas ações de respectivamente, reduzir e manter o pH. A variação do teor de lactose encontrada em outros estudos pode ser devida às variações de CCS e CBT, efeito do processamento térmico, efeito sazonal (Garnworthy et al., 2006) e aporte nutricional (Silva, 2004; Stumpf et al., 2013; Gabbi et al., 2013).

Além disso, há citações da ação de microrganismos como causa da instabilidade, porém existem controvérsias a esse respeito. Elevadas contagens bacterianas são às vezes relacionadas com baixa estabilidade, o que ocorreu no presente estudo com os leites pasteurizado e após a adição de cloretos, vide tabelas 2 e 3, devido à sua ação proteolítica e degradação da lactose, levando a menores valores de pH e aumento do cálcio iônico (Auldist e Hubble 1998; Negri et al., 2004; Chavez et al., 2004; Bueno et al., 2008; Lewis e Deeth, 2009). Mas Donatele et al. (2003) and Kolling (2012) não encontraram relação entre CBT, CCS e estabilidade do teste do álcool. Porém as diferenças de CBT foram significativas apenas para os leites pasteurizados e aquele após a adição de cloretos, o que eventualmente pode ter ocorrido como contaminação durante o processo, embora a tendência numérica tenha sido observada no leite cru. Talvez isso explique a semelhança nos valores de lactose.

Embora alguns dos atributos do leite cru tenham diferido conforme a sua estabilidade, notadamente pH, acidez titulável e cálcio iônico, outros atributos diferiram entre os leites após a sua pasteurização (pH, CBT) e adição de cloretos (teores de

gordura, proteína, pH e CBT). No entanto não foram observadas diferenças quanto ao rendimento queijeiro nem sua composição, o que está de acordo com resultados previamente publicados por Costabel et al. (2009) e Ribeiro et al. (2009), mas em discordância com Ponce Ceballo (2009), o qual relatou ocorrência de alterações na fabricação de derivados lácteos, como a redução no rendimento, o aumento no tempo de coagulação, surgimento de características indesejáveis no coágulo, alta retenção de água e perda de proteínas. Costabel et al. (2009) concluíram que leites positivos ao teste do álcool 72% e 80% e em boas condições higiênico-sanitárias apresentam boa aptidão para a coagulação, de modo que eles podem ser utilizados para a fabricação de queijos.

Conclusão

A instabilidade do leite no teste do álcool de 72, 76 e > 78 %v/v não alterou as características físico-químicas e rendimento do queijo prato.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro para a execução das pesquisas.

Referências

- AULDIST, M.J.; HUBLLE, I.B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. **Austr. J. Dairy Technol.**, v.53, p.28-36, 1998.
- BACKES, R.G. STEFANI, L.M; PASETTI, M; Leite termicamente instável – problemas e soluções tecnológicas. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. Lages, v.11, n.3, p. 254-260, 2012

BARBOSA, R.S.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M.E.R.; ZANELA, M.B.; STUMPF, M.T.; KOLLING, G.J.; SCHAFHÄUSER, J. JR.; BARROS, L.E.; EGITO, A.S. (2012). Caracterização eletroforética de proteínas e estabilidade do leite em vacas submetidas à restrição alimentar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.47, p.621-628.

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

BOTARO, B.G. Polimorfismo da betalactoglobulina não afeta as características físico-químicas e a estabilidade do leite bovino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, p.747-753, 2007.

BRASIL. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: II – Métodos físicos e químicos**. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal / Brasília, 1981.

BRASIL. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado. Instrução normativa nº 62**, de 29 de dezembro de 2011. . In: :BRASIL (Ed.). Diário Oficial da União. Brasília, v.1. 2011. p.6.

BUENO, V. F. F. et al. Contagem bacteriana total do leite: relação com a composição centesimal e o período do ano no Estado de Goiás. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. v. 15, n. 1, p. 40-44, 2008.

CASTANHEIRA, A.C.G. **Manual Básico: Controle de qualidade de leite e derivados**. Baseado nas metodologias de análises físico-químicas e microbiológicas, contidas nas instruções normativas 68/2006 e 62/2003. Cap-Lab. 2010

CHAVEZ, M., NEGRI, L., TAVERNA, M.A. et al. Bovine milk composition parameters affecting the ethanol stability. **Journal of Dairy Research**, v.71, p.201-206, 2004.

COSTABEL, L. M. Estudio de la relación entre aptitud a la coagulación por cuajo y prueba de alcohol en muestras de leche de vacas individuales. In: I CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE LEITE INSTÁVEL. 1., 2009, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009.

DONATELE, D.M.; VIEIRA, L.F.P.; FOLLY, M.M. Relação do teste de Alizarol a 72% (v/v) em leite “in natura” de vaca com acidez e contagem de células somáticas: análise microbiológica. **Rev. Higiene Alimentar**, v. 7, n.110, 2003.

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

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. de M. **Tecnologia de queijos**. São Paulo: Dipemar, 1994.

GABBI A.M., MCMANUS, C.M., SILVA, A.V., MARQUES, L.T. , ZANELA, M.B. , STUMPF, M.T., FISCHER, V. 2013. Typology and physical–chemical characterization of bovine milk produced with different productions strategies. **Agricultural Systems** 121 (2013) 130–134.

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**, v.89, p.1604-1612, 2006.

HORNE, D. S.; MUIR, D. D. Alcohol and heat stability of milk protein. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 3613–3626, 1990.

KOOLING, G.J. Influência da mastite na qualidade do leite e leite instável não ácido em diferentes quartos mamários. 2013. 75p. **Dissertação**. (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Agronomia – UFRGS – Porto Alegre-RS

LEWIS MJ, DEETH HC. 2009. **Heat treatment of milk**. In: TAMINE AY. (Ed.), Milk Processing and Quality Management, Chichester: Wiley-Blackwell, Chichester, UK, p. 168-204.

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.

LIN MJ, LI YC, LIN YC, CHEN KJ. 2009. Study on cow's milk quality in the eastern Taiwan during hot season. **J Chin Soc Anim Sci** 38: 87-95.

MARQUES, L.T., ZANELA, M.B., RIBEIRO, M.E.R., STUMPF, W. JR, 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.

MIKHEEVA, L.M. et al. Thermodynamics of micellization of bovine β -casein studied by high-sensitivity differential scanning calorimetry. **Langmuir**, v.19, 2913-2921. 2003.

NEGRI LM, CHAVEZ M, COSTABEL L AND TAVERNA M. 2011. Composición de leche de tanque, silo y derivados, relaciones con la estabilidad térmica y variables de manejo. In: CONFERENCIA INTERNACIONAL SOBRE LECHE INESTABLE, 2, Colonia del Sacramento **Proceedings**, Colonia del Sacramento: INIA, p. 6-9.

NEGRI, T L.M., CHAVEZ, M.S. TAVERNA, M.A., CUATRIN, A.L., RUBIOLO, A.C. 2004. The Effect of Silo Milk Composition Parameters on Heat Stability of Whole Milk Powder. **Food Science and Technology International**, v.10, p.415-420.

OFFICIAL **Methods of analysis** of AOAC (Association of Analytical Communities) international. 16th. 3rd rev, 1997.

OLIVEIRA, C.A.F. de; LOPES, L.C.; FRANCO, R.C. *et al.* Composição e características físico-químicas do leite instável não ácido recebido em laticínio do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 12, n. 2, p. 508-515, 2011.

OLIVEIRA, D. dos S. et al. Ocorrência de leite com instabilidade da caseína em Santa Vitória do Palmar, RS. **Revista Brasileira Ciências Veterinárias**, v. 14, n. 2, p. 101-104, 2007.

ORDÓÑEZ, P. J. A *et al.* **Tecnologia de Alimentos**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005.

PATERSON, G.R.; MacGIBBON, A.K.H.; HILL, J.P. Influence of kappa-casein and beta-lactoglobulin phenotype on the heat stability of milk. Int. **Journal Dairy Science.**, v.9, p.375-376, 1999.

PHILIPPE, M. et al. Physicochemical characterization of calcium-supplemented skim Milk. **Lait**. Le Ulis, v. 83, p.45-59, 2003.

PONCE CEBALLO, P.; AGUILERA, G. P. Síndrome de Leche Anormal: un enfoque integral sobre las alteraciones em lãs características físico-químicas de la leche en las condiciones de Cuba. In: I CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE LEITEINSTÁVEL. 1., 2009, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009.

RIBEIRO, M. E. R. *et al.* Ensaio preliminares sobre o efeito do Leite Instável NãoÁcido (LINA) na industrialização do iogurte batido. In: I CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE LEITE INSTÁVEL. 1., 2009, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009.

RIBEIRO, M.E.R. et al. Ensaio preliminares sobre o efeito de leite instável não ácido na industrialização do iogurte batido. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 9., 2006, Goiânia, **Anais...** Goiânia: Gráfica e Editora Talento, 2006.

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

ROMA JÚNIOR, L.C. et al. Efeito de diferentes tipos de fraudes sobre os componentes do leite e influência nos programas de pagamento de qualidade. In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 2007, Jaboticabal. 44ª Reunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Viçosa.

ROSE, D. Variation in the heat stability and composition of milk from individual cows during lactation. **Journal of Dairy Science**. n. 44, p. 430-441, 1961.

SHEW, D. I. 1981. **Technical aspects of quality assurance**. Pages 115–121 in IDF Document 133, New Monograph on UHT Milk. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.

SHILTON, N.; JOHNSON, A.; LEWIS, M.J. An investigation of a possible relationship between the ethanol stability of milk and the fouling of milk in an ultra high temperature process. **Journal of Society of Dairy Technology**, n.45, p.9-10, 1992.

SILVA PHF. 2004. **Leite UHT: fatores determinantes para sedimentação e gelificação**, Juiz de Fora: Templo Gráfica e Editora, 128 p.

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

STUMPF MT, FISCHER V, MCMANUS C.M. 2013. Severe feed restriction increases permeability of mammary gland cell tight junctions and reduces ethanol stability of milk. **Animal**. 7, 1137-1142.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: Editora da UFSM, 2003.

TSIOULPAS, A., LEWIS, M.J., GRANDISON, A.S. Effect of minerals on casein micelle stability of cow's milk. **Journal of Dairy Research**, v.74, p.167-173, 2007b.

TSIOUPAS, A; LEWIS, M; GRANDISON, A. Effect of Minerals on Casein Micelle Stability of Cows' Milk. **Journal of Dairy Research** (2007a) 74 167–173.

VAN BOEKEL, W.H.M. (1992) **Interactions of Phaeocystis sp. with organic compounds and the microbial foodweb**. PhD thesis, University of Groningen.

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.

CAPÍTULO VIII

8.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção leiteira em SC é majoritariamente realizada por pequenos produtores rurais, com perfil familiar, sendo que 70% possuem até 25 ha de área total, 65,5 % entregaram até 300L de leite/dia, 65% dos estabelecimentos usam sala de ordenha mecanizada com sistema canalizado, e as práticas de limpeza do úbere são variáveis, mas mostram que em torno de 50% dos produtores não usam pré-imersão, embora 75% utilizem a pós-imersão dos tetos. O teste da mastite clínica é usado por cerca de $\frac{1}{4}$ dos produtores enquanto $\frac{1}{2}$ declara usar o teste CMT para mastite subclínica. No entanto entre as principais questões em termos de sua composição dizem respeito à acidez mensurável, já que apenas 30 a 40% das amostras apresenta valores entre 6,6 a 6,8. Em relação à estabilidade ao teste do álcool, 7% das amostras foram instáveis ao teste com concentração alcoólica inferior ou igual a 72%v/v, enquanto 78% das amostras de leite precipitaram em álcool entre 72 e 80%v/v. Da mesma forma os atributos que medem a qualidade higiênica e sanitária do leite não estão adequados, pois apenas 1,6% das amostras apresentaram valores de CCS inferiores a 100 (x1000 cel/mL), enquanto 35% das amostras resultaram em valores de CBT abaixo de 100 (x1000UFC/mL).

As duas regiões estudadas, oeste e sul diferem em alguns pontos em relação a escala de produção, pois os produtores do oeste ocupam uma maior área de verão com milho para silagem, implantando pastagens anuais nessas áreas no inverno, entretanto a região sul possui mais área de pastagem perene de verão, com menor produção de silagem. A região oeste possui maior número de animais com 57% de vacas em lactação, 12% vacas secas e 30,5% de novilhas com média de 34 animais por propriedade, enquanto a região sul possui menos vacas em lactação e mais novilhas com 100% da raça Jersey, enquanto a região oeste na sua maioria os animais são mestiços, entretanto a genética superior na região sul pode ser um dos motivos para maior produção de leite neste região. As características físico-químicas não interferem muito em relação ao nível de produção e sim o volume de leite produzido.

Entre os fatores que podem influenciar as características físico-químicas do leite, foi estudado mudanças no emprego de alimentos, como as proporções de feno de tifton e silagem de milho e observado que mantendo a proporção do volumoso em 55%, o aumento do uso do feno de Tifton de 20 até 60% do volumoso, não alterou a produção leiteira nem a maioria das características físico-químicas do leite, com exceção da proteína e da acidez titulável, mesmo com o emprego do feno de composição bromatológica inferior em relação à silagem. Isso demonstra a plasticidade e as opções de emprego de alimentos por parte do produtor, representando alternativas válidas, especialmente para pequenos produtores.

O aquecimento global, a subdivisão dos campos e o emprego escasso de medidas para melhorar o conforto térmico dos bovinos leiteiros fez com que estudasse o efeito do estresse térmico sobre a produção leiteira, composição do leite e efeitos sobre o metabolismo dos animais em duas regiões importantes do setor leiteiro, mas contrastantes em termos do desafio térmico aos animais, regiões do oeste (Itapiranga) e do sul (Lages) catarinense.

A região oeste historicamente apresenta valores de temperatura ambiente mais elevados que a região sul, especialmente na parte das montanhas.

A privação de sombra em condições de estresse moderado a severo em Itapiranga reduziu a produção de leite, estabilidade do leite no teste do álcool, os teores de proteína, lactose, enquanto aumentou o valor de acidez titulável, os teores de gordura e de nitrogênio ureico. Em condições amenas em Lages, a privação de sombra tendeu a reduzir o teor de lactose sem modificar a produção e demais características físico-químicas. Somente os animais em estresse térmico moderado a severo apresentaram respostas produtivas ao acesso à sombra.

Em estresse por calor moderado a severo, a privação de sombra acarretou em maiores valores de frequência respiratória, temperatura corporal medidos às 18:30 h, glicose, creatinina e sódio no plasma, mas não modificou os valores de frequência cardíaca medida às 6:30 e às 18:30h, frequência respiratória e temperatura corporal medidas às 6:30 h, assim como os valores de hematócrito e ureia. Em estresse leve por calor, a privação de sombra aumentou os valores de frequência respiratória medida às 18:30 h, mas não alterou os valores de frequência cardíaca e temperatura corporal medidas às 18:30 h assim como os valores de hematócrito, teores de glicose, creatinina, ureia e sódio. O acesso à sombra dos animais previamente privados da mesma reduziu os valores de frequência respiratória medida às 18:30 h a valores semelhantes aos animais permanentemente com acesso à sombra. O provimento de sombra especialmente quando o estresse por calor for moderado a severo melhora o bem estar dos animais, mantendo seus atributos fisiológicos e hematológicos dentro da faixa normal.

Sob estresse leve, a privação de sombra provocou mais dano ao DNA, acarretou valores menores da pO_2 , sO_2 , HCO_3^- e excesso de bases, mas não alterou os valores de lactose plasmática, atributos do estresse oxidativo, teor de sódio, potássio, cálcio iônico, pH, pCO_2 e tCO_2 . Mesmo em clima subtropical de altitude, durante a estação quente, vacas leiteiras se beneficiam do acesso à sombra para manter seu equilíbrio ácido-básico e reduzir o dano ao DNA.

As indústrias laticinistas aumentaram o teor de etanol na mistura alcoólica de 72 para 76, 78 e mesmo 80%, o que, por sua vez, pode aumentar o número de resultados positivos ao teste. No entanto não há indicação técnica que ampare esse aumento da concentração do etanol na solução teste para a produção de todos os produtos. Há poucos estudos sobre qual seria a concentração de etanol recomendável, e entre eles, Shew (1981) sugeriu que, para fins de processamento térmico UHT e leite em pó, o leite cru deveria ser estável no teste do álcool a uma concentração de etanol de pelo menos 74%v/v.

Entre os derivados lácteos, aqueles obtidos de processos que devem evitar a gelificação ou sedimentação como a produção de leite em pó, leite UHT e leite esterilizado se beneficiariam de matéria prima de elevada estabilidade térmica. Deposição de leite em equipamentos da linha acontece se o leite cru apresenta instabilidade ao calor, causando redução de rendimento industrial. Em relação aos queijos de massa firme, como o tipo prato, os quais

inclusive se beneficiariam de uma coagulação mais precoce, mas existem dúvidas quanto à estabilidade mínima necessária para a sua industrialização. Estudos mostram poucas diferenças entre o leite estável 72 e 80% (etanol v/v) quanto à composição e rendimento industrial na produção de queijos de massa firme, iogurte e queijo minas frescal.

Houve algumas diferenças no pH, acidez titulável entre os leite cru com diferentes estabilidade. O leite cru de alta estabilidade apresentou menores valores de acidez titulável, cálcio iônico, mas maior valor de pH que o leite de baixa estabilidade, mas a estabilidade ao etanol não influenciou os demais parâmetros avaliados no leite, soro do leite e queijo, inclusive o rendimento. Leite cru com estabilidade igual ou superior a 72% podem ser utilizados na produção de queijo tipo prato

8.2 CONCLUSÃO GERAL

Existe variabilidade nas características de infra-estrutura das propriedades leiteiras, entretanto o nível de produção esteve relacionado com a área e animais, mas não teve relação com as práticas de ordenha, apresentando particularidades específicas em cada região.

A inclusão de feno em dietas na substituição a silagem de milho se mostrou como uma boa alternativa.

O provimento de sombra é benéfico para minimizar os efeitos do estresse calórico, principalmente durante o estresse moderado a severo, trazendo benefícios para o animal.

É possível a fabricação de queijo prato em diferentes estabilidades sem alteração de suas características físico-químicas e de rendimento.

8.3 APÊNDICES

PESQUISA AGROPECUÁRIA BRASILEIRA (PAB)

Diretrizes para Autores:

Escopo e política editorial

A revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB) é uma publicação mensal da Embrapa, que edita e publica trabalhos técnico-científicos originais, em português, espanhol ou inglês, resultantes de pesquisas de interesse agropecuário. A principal forma de contribuição é o Artigo, mas a PAB também publica Notas Científicas e Revisões a convite do Editor.

Análise dos artigos

A Comissão Editorial faz a análise dos trabalhos antes de submetê-los à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se aspectos como escopo, apresentação do artigo segundo as normas da revista, formulação do objetivo de forma clara, clareza da redação, fundamentação teórica, atualização da revisão da literatura, coerência e precisão da metodologia, resultados com contribuição significativa, discussão dos fatos observados em relação aos descritos na literatura, qualidade das tabelas e figuras, originalidade e consistência das conclusões. Após a aplicação desses critérios, se o número de trabalhos aprovados ultrapassa a capacidade mensal de publicação, é aplicado o critério da relevância relativa, pelo qual são aprovados os trabalhos cuja contribuição para o avanço do conhecimento científico é considerada mais significativa. Esse critério é aplicado somente aos trabalhos que atendem aos requisitos de qualidade para publicação na revista, mas que, em razão do elevado número, não podem ser todos aprovados para publicação. Os trabalhos rejeitados são devolvidos aos autores e os demais são submetidos à análise de assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo.

Forma e preparação de manuscritos

Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos (não terem dados – tabelas e figuras – publicadas parcial ou integralmente em nenhum outro veículo de divulgação técnico-científica, como boletins institucionais, anais de eventos, comunicados técnicos, notas científicas etc.) e não podem ter sido encaminhados simultaneamente a outro periódico científico ou técnico. Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no trabalho.

- São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas Científicas e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor.

- Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são: Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética, Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia.

- O texto deve ser digitado no editor de texto Microsoft Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, com margens de 2,5 cm e com páginas e linhas numeradas.

Informações necessárias na submissão on-line de trabalhos

No passo 1 da submissão (Início), em “comentários ao editor”, informar a relevância e o aspecto inédito do trabalho.

No passo 2 da submissão (Transferência do manuscrito), carregar o trabalho completo em arquivo Microsoft Word.

No passo 3 da submissão (Inclusão de metadados), em “resumo da biografia” de cada autor, informar o link do sistema de currículos lattes (ex.: <http://lattes.cnpq.br/0577680271652459>). Clicar em “incluir autor” para inserir todos os coautores do trabalho, na ordem de autoria.

Ainda no passo 3, copiar e colar o título, resumo e termos para indexação (key words) do trabalho nos respectivos campos do sistema.

No passo 4 da submissão (Transferência de documentos suplementares), carregar, no sistema on-line da revista PAB, um arquivo Word com todas as cartas (mensagens) de concordância dos coautores coladas conforme as explicações abaixo:

- Colar um e-mail no arquivo word de cada coautor de concordância com o seguinte conteúdo:

“Eu, ..., concordo com o conteúdo do trabalho intitulado “.....” e com a submissão para a publicação na revista PAB.

Como fazer:

Peça ao coautor que lhe envie um e-mail de concordância, encaminhe-o para o seu próprio e-mail (assim gerará os dados da mensagem original: assunto, data, de e para), marque todo o email e copie e depois cole no arquivo word. Assim, teremos todas as cartas de concordâncias dos coautores num mesmo arquivo.

Organização do Artigo Científico

A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:

- Artigos em português - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras.

- Artigos em inglês - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Abstract, Index terms, título em português, Resumo, Termos para indexação, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, tables, figures.

- Artigos em espanhol - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumen, Términos para indexación; título em inglês, Abstract, Index terms, Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias, cuadros e figuras.

- O título, o resumo e os termos para indexação devem ser vertidos fielmente para o inglês, no caso de artigos redigidos em português e espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês.

- O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível.

Título

- Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções.
- Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como “efeito” ou “influência”.
- Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário.
- Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos.
- As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura.

Nomes dos autores

- Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção “e”, “y” ou “and”, no caso de artigo em português, espanhol ou em inglês, respectivamente.
- O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, entre parênteses, correspondente à chamada de endereço do autor.

Endereço dos autores

- São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico, entre parênteses, em forma de expoente.
- Devem ser agrupados pelo endereço da instituição.
- Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

Resumo

- O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda, e separado do texto por travessão.
- Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos.
- Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos, os resultados e a conclusão.
- Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas.
- O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

Termos para indexação

- A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula.
- Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras.
- Não devem conter palavras que componham o título.
- Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada.
- Devem, preferencialmente, ser termos contidos no AGROVOC: Multilingual Agricultural Thesaurus ou no Índice de Assuntos da base SciELO.

Introdução

- A palavra Introdução deve ser centralizada e grafada com letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto.
- O último parágrafo deve expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do Resumo.

Material e Métodos

- A expressão Material e Métodos deve ser centralizada e grafada em negrito; os termos Material e Métodos devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais.
- Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica.
- Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar os tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental.
- Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis.
- Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas.
- Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento.
- Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente.
- Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.
- Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.

Resultados e Discussão

- A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos.

- As tabelas e figuras são citadas seqüencialmente.
- Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos em relação aos apresentados por outros autores.
- Evitar o uso de nomes de variáveis e tratamentos abreviados.
- Dados não apresentados não podem ser discutidos.
- Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados.
- As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada.
- Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.
- As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

Conclusões

- O termo **Conclusões** deve ser centralizado e grafado em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser apresentadas em frases curtas, sem comentários adicionais, com o verbo no presente do indicativo.
- Devem ser elaboradas com base no objetivo do trabalho.
- Não podem consistir no resumo dos resultados.
- Devem apresentar as novas descobertas da pesquisa.
- Devem ser numeradas e no máximo cinco.

Agradecimentos

- A palavra **Agradecimentos** deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser breves e diretos, iniciando-se com “Ao, Aos, À ou Às” (pessoas ou instituições).
- Devem conter o motivo do agradecimento.

Referências

- A palavra *Referências* deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser de fontes atuais e de periódicos: pelo menos 70% das referências devem ser dos últimos 10 anos e 70% de artigos de periódicos.
- Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 6023 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.
- Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-vírgula, sem numeração.
- Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra.
- Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito.
- Devem conter somente a obra consultada, no caso de citação de citação.
- Todas as referências devem registrar uma data de publicação, mesmo que aproximada.

- Devem ser trinta, no máximo.

Exemplos:

- Artigos de Anais de Eventos (aceitos apenas trabalhos completos)

AHRENS, S. A fauna silvestre e o manejo sustentável de ecossistemas florestais. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 3., 2004, Santa Maria. **Anais**. Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, 2004. p.153-162.

- Artigos de periódicos

SANTOS, M.A. dos; NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.67-75, 2006.

- Capítulos de livros

AZEVEDO, D.M.P. de; NÓBREGA, L.B. da; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; BELTRÃO, N.E. de M. Manejo cultural. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.121-160.

- Livros

OTSUBO, A.A.; LORENZI, J.O. **Cultivo da mandioca na Região Centro-Sul do Brasil**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 116p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de produção, 6).

- Teses

HAMADA, E. **Desenvolvimento fenológico do trigo (cultivar IAC 24 - Tucuruí), comportamento espectral e utilização de imagens NOAA-AVHRR**. 2000. 152p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- Fontes eletrônicas

EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. **Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais da pesquisa da Embrapa Agropecuária Oeste**: relatório do ano de 2003. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 97p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 66). Disponível em: . Acesso em: 18 abr. 2006.

Citações

- Não são aceitas citações de resumos, comunicação pessoal, documentos no prelo ou qualquer outra fonte, cujos dados não tenham sido publicados. - A autocitação deve ser evitada. - Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 10520 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.

- Redação das citações dentro de parênteses

- Citação com um autor: sobrenome grafado com a primeira letra maiúscula, seguido de vírgula e ano de publicação.

- Citação com dois autores: sobrenomes grafados com a primeira letra maiúscula, separados pelo "e" comercial (&), seguidos de vírgula e ano de publicação.

- Citação com mais de dois autores: sobrenome do primeiro autor grafado com a primeira letra maiúscula, seguido da expressão et al., em fonte normal, vírgula e ano de publicação.

- Citação de mais de uma obra: deve obedecer à ordem cronológica e em seguida à ordem alfabética dos autores.
- Citação de mais de uma obra dos mesmos autores: os nomes destes não devem ser repetidos; colocar os anos de publicação separados por vírgula.
- Citação de citação: sobrenome do autor e ano de publicação do documento original, seguido da expressão “citado por” e da citação da obra consultada.
- Deve ser evitada a citação de citação, pois há risco de erro de interpretação; no caso de uso de citação de citação, somente a obra consultada deve constar da lista de referências.
- Redação das citações fora de parênteses
- Citações com os nomes dos autores incluídos na sentença: seguem as orientações anteriores, com os anos de publicação entre parênteses; são separadas por vírgula.

Fórmulas, expressões e equações matemáticas

- Devem ser iniciadas à margem esquerda da página e apresentar tamanho padronizado da fonte Times New Roman.
- Não devem apresentar letras em itálico ou negrito, à exceção de símbolos escritos convencionalmente em itálico.

Tabelas

- As tabelas devem ser numeradas seqüencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após as referências.
- Devem ser auto-explicativas.
- Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora dos tratamentos ou das variáveis.
- Os elementos complementares são: notas-de-rodapé e fontes bibliográficas.
- O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve ser claro, conciso e completo; deve incluir o nome (vulgar ou científico) da espécie e das variáveis dependentes.
- No cabeçalho, os nomes das variáveis que representam o conteúdo de cada coluna devem ser grafados por extenso; se isso não for possível, explicar o significado das abreviaturas no título ou nas notas-de-rodapé.
- Todas as unidades de medida devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades.
- Nas colunas de dados, os valores numéricos devem ser alinhados pelo último algarismo.
- Nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia no corpo da tabela; dados não apresentados devem ser representados por hífen, com uma nota-de-rodapé explicativa.
- Na comparação de médias de tratamentos são utilizadas, no corpo da tabela, na coluna ou na linha, à direita do dado, letras minúsculas ou

maiúsculas, com a indicação em nota-de-rodapé do teste utilizado e a probabilidade.

- Devem ser usados fios horizontais para separar o cabeçalho do título, e do corpo; usá-los ainda na base da tabela, para separar o conteúdo dos elementos complementares. Fios horizontais adicionais podem ser usados dentro do cabeçalho e do corpo; não usar fios verticais.

- As tabelas devem ser editadas em arquivo Word, usando os recursos do menu Tabela; não fazer espaçamento utilizando a barra de espaço do teclado, mas o recurso recuo do menu Formatar Parágrafo.

- Notas de rodapé das tabelas

- Notas de fonte: indicam a origem dos dados que constam da tabela; as fontes devem constar nas referências.

- Notas de chamada: são informações de caráter específico sobre partes da tabela, para conceituar dados. São indicadas em algarismo arábico, na forma de expoente, entre parênteses, à direita da palavra ou do número, no título, no cabeçalho, no corpo ou na coluna indicadora. São apresentadas de forma contínua, sem mudança de linha, separadas por ponto.

- Para indicação de significância estatística, são utilizadas, no corpo da tabela, na forma de expoente, à direita do dado, as chamadas ns (não-significativo); * e ** (significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente).

Figuras

- São consideradas figuras: gráficos, desenhos, mapas e fotografias usados para ilustrar o texto.

- Só devem acompanhar o texto quando forem absolutamente necessárias à documentação dos fatos descritos.

- O título da figura, sem negrito, deve ser precedido da palavra Figura, do número em algarismo arábico, e do ponto, em negrito.

- Devem ser auto-explicativas.

- A legenda (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura, no título, ou entre a figura e o título.

- Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas, e devem ser seguidas das unidades entre parênteses.

- Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas; as fontes devem ser referenciadas.

- O crédito para o autor de fotografias é obrigatório, como também é obrigatório o crédito para o autor de desenhos e gráficos que tenham exigido ação criativa em sua elaboração. - As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.

- Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).

- Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante.

- As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.

- Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e medir 8,5 ou 17,5 cm de largura.
- Devem ser gravadas nos programas Word, Excel ou Corel Draw, para possibilitar a edição em possíveis correções.
- Usar fios com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura.
- No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%, para cinco variáveis).
- Não usar negrito nas figuras.
- As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser gravadas em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto.
- Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.

Notas Científicas

- Notas científicas são breves comunicações, cuja publicação imediata é justificada, por se tratar de fato inédito de importância, mas com volume insuficiente para constituir um artigo científico completo.

Apresentação de Notas Científicas

- A ordenação da Nota Científica deve ser feita da seguinte forma: título, autoria (com as chamadas para endereço dos autores), Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, texto propriamente dito (incluindo introdução, material e métodos, resultados e discussão, e conclusão, sem divisão), Referências, tabelas e figuras.

- As normas de apresentação da Nota Científica são as mesmas do Artigo Científico, exceto nos seguintes casos:

- Resumo com 100 palavras, no máximo.
- Deve ter apenas oito páginas, incluindo-se tabelas e figuras.
- Deve apresentar, no máximo, 15 referências e duas ilustrações (tabelas e figuras).

Outras informações

- Não há cobrança de taxa de publicação.
- Os manuscritos aprovados para publicação são revisados por no mínimo dois especialistas.
- O editor e a assessoria científica reservam-se o direito de solicitar modificações nos artigos e de decidir sobre a sua publicação.
- São de exclusiva responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos.
- Os trabalhos aceitos não podem ser reproduzidos, mesmo parcialmente, sem o consentimento expresso do editor da PAB.

Contatos com a secretaria da revista podem ser feitos por telefone: (61)3448-4231, via e-mail: sct.pab@embrapa.br ou pelos correios:

Embrapa Informação Tecnológica Pesquisa Agropecuária Brasileira

– PAB

Caixa Postal 040315 CEP 70770 901 Brasília, DF

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. O manuscrito deve ser inédito e não pode ter sido submetido, simultaneamente, a outro periódico, e seus dados (tabelas e figuras) não podem ter sido publicados parcial ou totalmente em outros meio de publicação técnicos ou científicos (boletins institucionais, anais de eventos, comunicados técnicos, notas científicas, etc.).

2. O texto deve ser submetido no formato do Microsoft Word, em espaço duplo, escrito na fonte Times New Roman 12, tamanho de papel A4, com páginas e linhas numeradas; e o arquivo não deve ultrapassar o tamanho de 20 MB.

3. O artigo deve ter, no máximo, 20 páginas e tem que estar organizado na seguinte ordem: Título; nome completo dos autores, seguido de endereço institucional e eletrônico; Resumo; Termos para indexação; Title, Abstract; Index terms; Introdução; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusões; Agradecimentos; Referências; tabelas e figuras.

4. Os padrões de texto e de referências bibliográficas devem ser apresentados de acordo com as orientações, para a apresentação de manuscritos, estabelecidas nas Diretrizes aos autores, as quais se encontram na página web da revista PAB.

5. Mensagens de concordância dos coautores com o conteúdo do manuscrito e sua submissão à revista devem ser compiladas pelo autor correspondente em um arquivo do Microsoft Word e carregadas no sistema como um documento suplementar, no quarto passo do processo de submissão.

6. Diante do grande número de trabalhos recebidos para publicação (média de 110 por mês), solicitamos sua concordância com os seguintes procedimentos adotados pela revista PAB:

Os trabalhos são analisados pela Comissão Editorial, antes de serem submetidos à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se os seguintes aspectos, entre outros: escopo, apresentação do artigo segundo as normas da revista; formulação do objetivo de forma clara; clareza da redação; fundamentação teórica; atualização da revisão da literatura; coerência e precisão da metodologia; discussão dos fatos observados em relação aos descritos na literatura; resultados com contribuição significativa; qualidade das tabelas e figuras; e, finalmente, originalidade e consistência das conclusões.

Após a aplicação desses critérios, caso o número de trabalhos aprovados ultrapasse a capacidade de publicação mensal, é aplicado o critério da **relevância relativa**. Segundo esse critério, os trabalhos com contribuição mais significativa para o avanço do conhecimento científico são aprovados. Esse critério é aplicado apenas

aos trabalhos que atendam aos requisitos de qualidade, mas que, por excederem a capacidade de publicação mensal da revista, não podem ser todos aprovados. Por esse mesmo motivo, informamos que não aceitamos pedido de reconsideração.

Normas para submissão da Agricultural Systems

DESCRIPTION . Agricultural Systems is an international journal that deals with interactions - among the components of agricultural systems, among hierarchical levels of agricultural systems, between agricultural and other land use systems, and between agricultural systems and their natural, social and economic environments. Manuscripts submitted to Agricultural Systems generally should include both of the following: Substantive natural science content (especially farm- or landscape-level biology or ecology, sometimes combined with social sciences), and Substantive analysis and discussion of the interactions within or among agricultural systems components and other systems.

Preference is given to manuscripts that address whole-farm and landscape level issues, via integration of conceptual, empirical and dynamic modelling approaches. The scope includes the development and application of systems analysis methodologies in the following areas: Systems approaches in the sustainable intensification of agriculture; pathways for sustainable intensification; crop-livestock integration; farm-level resource allocation; quantification of benefits and trade-offs at farm to landscape levels; integrative, participatory and dynamic modelling approaches for qualitative and quantitative assessments of agricultural systems and decision making; The interactions between agricultural and non-agricultural landscapes; the multiple services of agricultural systems; food security and the environment; Global change and adaptation science; transformational adaptations as driven by changes in climate, policy, values and attitudes influencing the design of farming systems; Development and application of farming systems design tools and methods for impact, scenario and case study analysis; managing the complexities of dynamic agricultural systems; innovation systems and multi stakeholder arrangements that support or promote change and (or) inform policy decisions. The following subjects are discouraged: Econometric, descriptive or other statistical (correlation) analysis of farm, farming systems or household survey data that exclude systems analytical approaches (particularly cross-sectional adoption or economic efficiency studies), landscapes (including the development of typologies), land use change studies, results from crop or livestock trials or other economic analyses without substantive natural science content; Conceptual frameworks without empirical implementation (unless submitted as a short communication) Studies focusing on specific chemical constituents of plant or animal species or their products; Studies of the operation or efficiency of agricultural or food processing machinery, or of agricultural supply chains without a substantive biological component; Such subjects are not considered for publication unless they clearly provide substantive and highly generalizable new insights regarding processes

operating at farm or landscape levels or describe novel analytical methods applicable to a wide variety of agricultural systems. The journal publishes original scientific papers, short communications. Review articles and book reviews should only be submitted after consultation with the editors. Review papers generally should focus on the application of specific methods rather than descriptive analyses of agricultural production systems or supply chains.

GUIDE FOR AUTHORS . Your Paper Your Way We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article. To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION Agricultural Systems is an international journal that deals with interactions - among the components of agricultural systems, among hierarchical levels of agricultural systems, between agricultural and other land use systems, and between agricultural systems and their natural and social environments. In particular, its aim is to encourage integration of knowledge among those disciplines that underpin agriculture. Many contributions will therefore be multi- or inter-disciplinary. Papers generally focus on either methodological approaches to understanding and managing interactions within or among agricultural systems, or the application of holistic or quantitative systems approaches to a range of problems within agricultural systems and their interactions with other systems. Because of the nature of the readership of Agricultural Systems, the contents of papers should be easily accessible (properly introduced, presented and discussed) to readers from a wide range of disciplines. The scope includes the development and application of systems methodology, including system modeling, simulation and optimization; ecoregional analysis of agriculture and land use; studies on natural resource issues related to agriculture; impact and scenario analyses related to topics such as GMOs, multifunctional land use and global change; and the development and application of decision and discussion support systems; approaches to analyzing and improving farming systems; technology transfer in tropical and temperate agriculture; and the relationship between agricultural development issues and policy.

Types of paper The journal publishes original scientific papers, short communications, review articles and book reviews. Review articles and book reviews should be submitted only after consultation with the editors.

Length of Papers Although there is no absolute word or page limit for manuscripts submitted to AGSY, a recommended maximum is 8000 words for research papers and 4000 words for short communications. Contributions longer than these recommendations may result in a request for modifications to bring the manuscript within these limits.

BEFORE YOU BEGIN Ethics in publishing For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Conflict of interest All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other

relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923. Submission declaration and verification Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>. Changes to authorship This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts: Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed. After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum. Copyright Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>. For open access articles: Upon

acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>). Author rights As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <http://www.elsevier.com/copyright>. Role of the funding source You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Funding body agreements and policies Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Open access This journal offers authors a choice in publishing their research: Open access • Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse • An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution Subscription Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<http://www.elsevier.com/access>). • No open access publication fee payable by authors. Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards. For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses: Creative Commons Attribution (CC BY) Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation. Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND) For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article. The open access publication fee for this journal is USD 3300, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>. Language (usage and editing services) Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site

(<http://support.elsevier.com>) for more information. **Submission** Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail. Submit your article Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/agsy/> **Reviewers** Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 4 potential reviewers and indicate briefly per reviewer what the relevant expertise of the reviewer is. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used. **PREPARATION NEW SUBMISSIONS** Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process. As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately. **References** There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. **Formatting requirements** There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections. Please ensure the text of your paper is double-spaced this is an essential peer review requirement. **Figures and tables embedded in text** Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. **REVISED SUBMISSIONS** Use of word processing software Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-

check' and 'grammar-check' functions of your word processor. Article structure

Subdivision - numbered sections Divide your article into clearly defined and numbered sections. The abstract is not included in section numbering, so the Introduction is section 1. Subsections should also be numbered (for instance 2.1 (then 2.1.1, 2.1.2, 2.2, etc.) Do not use more than three levels of numbering. Use the section numbering also for internal cross-referencing, if necessary. Any subsection should be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Material and Methods Manuscripts in general should be organized in the following manner:

- Title
- Name(s) of author(s)
- Affiliations
- Abstract
- Key words (indexing terms), normally 3-6 items
- Introduction
- Material studied, area descriptions, methods, techniques
- Results
- Discussion
- Conclusion
- Acknowledgements and any additional information concerning research grants, etc.
- References
- Appendices
- Tables
- Figures

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author. Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract A concise and factual abstract of no more than 400 words is required. The abstract should state briefly the objective the research, methods used, principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system.

Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with

all technical requirements: Illustration Service. Highlights Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples. Keywords Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes. Abbreviations Define abbreviations that are not standard in this field in the text at first use. Ensure consistency of abbreviations throughout the article. Acknowledgements Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article just before the References section. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.) and institutions that provided funding for the research. Nomenclature and Units Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI. Authors and Editor(s) are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature. All botica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified. For chemical nomenclature, the conventions of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the official recommendations of the IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature should be followed. Math formulae Present simple formulae in the line of normal text where possible. In principle, variables are to be presented in italics. Subscripts and superscripts should be clear. Greek letters and other non-Roman or handwritten symbols should be explained in the margin where they are first used. Take special care to show clearly the difference between zero (0) and the letter O, and between one (1) and the letter l. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Also powers of e are often more conveniently denoted by exp. Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are: *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001.

In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g., Ca²⁺, not as Ca⁺⁺. Isotope numbers should precede the symbols, e.g., ¹⁸O. Footnotes Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively

throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

- EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.
- TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.
- TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.
- TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in

the article. Please avoid using vertical rules. References Citation in text Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be used. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication. Minimize references to non-English publications as these are not easily accessible for the majority of the readership. Reference links Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged. Web references As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list. References in a special issue Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue. Reference management software Most Elsevier journals have a standard template available in key reference management packages. This covers packages using the Citation Style Language, such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and also others like EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to word processing packages which are available from the above sites, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style as described in this Guide. The process of including templates in these packages is constantly ongoing. If the journal you are looking for does not have a template available yet, please see the list of sample references and citations provided in this Guide to help you format these according to the journal style. If you manage your research with Mendeley Desktop, you can easily install the reference style for this journal by clicking the link below: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/agricultural-systems>. When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice. For more information about the Citation Style Language, visit <http://citationstyles.org>. Reference formatting There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must

be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples: Reference style Text: All citations in the text should refer to: 1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication; 2. Two authors: both authors' names and the year of publication; 3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown' List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication. Examples: Reference to a journal publication: Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. Reference to a book: Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York. Reference to a chapter in an edited book: Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304. Journal abbreviations source Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>. Video data Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content. AudioSlides The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research

in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper. Supplementary material Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, detailed model descriptions, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Data deposit and linking Elsevier encourages and supports authors to share raw data sets underpinning their research publication where appropriate and enables interlinking of articles and data. Please visit <http://www.elsevier.com/about/research-data> for more information on depositing, sharing and using research data. Interactive plots This journal encourages you to include data and quantitative results as interactive plots with your publication. To make use of this feature, please include your data as a CSV (comma-separated values) file when you submit your manuscript. Please refer to <http://www.elsevier.com/interactiveplots> for further details and formatting instructions. Submission checklist The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item. Ensure that the following items are present: One author has been designated as the corresponding author with contact details: • E-mail address • Full postal address All necessary files have been uploaded, and contain: • Keywords • All figure captions • All tables (including title, description, footnotes) Further considerations • Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked' • All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa • Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet) Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white • Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required. • For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes. For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>. AFTER ACCEPTANCE Use of the Digital Object Identifier The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in

the journal Physics Letters B): <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change. Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at <http://www.elsevier.com/track-submission>. You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

Normas da Animal Journal

animal An International Journal of Animal Bioscience
Instructions for authors Last updated November 2013

Introduction

animal – an International Journal of Animal Bioscience (animal) is published in English in one volume of 12 issues per year, as a printed journal and in electronic form. Additional special issues may also be produced. No page charges are required from the authors (the Open Access option requires payment of an article processing fee: see below). animal attracts the best research in animal biology and animal systems from across the spectrum of the agricultural, biomedical, and environmental sciences; it is the central element in a collaboration between the British Society of Animal Science (BSAS), the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and the European Federation for Animal Science (EAAP) and represents the merger in 2006 of three scientific journals: Animal Science; Animal Research; Reproduction, Nutrition, Development.

Scope

animal publishes original, cutting-edge research and horizon-scanning reviews on animal-related aspects of the life sciences at the molecular, cellular, organ, whole animal and production system levels. Papers will be considered in aspects of both strategic and applied science in the areas of Animal Breeding and Genetics, Nutrition, Physiology and Functional Biology of Systems, Behaviour, Health and Welfare, Livestock Farming Systems and Environment, and Product Quality, Human Health and Well-being. Emphasis is placed on managed animals and on the integrative nature of biological systems. The use of laboratory animal models for the benefit of farmed livestock is within the scope. Studies using farm animals with the aim of improving human health are also acceptable but they must also indicate benefits to farmed livestock. Wild animals which are marginally bred in a few countries or which could be bred in the future, and wild animals raised in captivity are not considered as farm animals. Papers dealing with the translation of basic and strategic science into whole animal and system impacts on Productivity, Product Quality, the Environment and Humans (health, nutrition and well being) will be particularly welcome. Papers should also be of international relevance, appeal to an international readership and then not limited to national or regional conditions. The full scope of the journal is available on <http://www.animal-journal.eu/scope.htm> and should be consulted before submitting a paper. animal is essential reading for all animal scientists interested in biochemistry, microbiology, nutrition, physiology, modelling, genetics, behaviour, immunology, epidemiology, engineering, economics, sociology, food science and technology, human health, farming systems, and land-use management, environmental impact and climate change.

Type of articles

animal publishes different types of articles:

- Full research papers which correspond to a full account of a complete project. The approach can be experimental or theoretical, provided the work has been

carried out in a systematic way. Routine studies, descriptive experiments without an experimental design controlled by the author, papers based on repetition of published experiments with other breeds, or in other geographical conditions are discouraged. Papers presenting a detailed description of a new technique are within the scope and are encouraged. Comparison of existing methods is considered, provided similar comparisons have never been published. Full papers, including meta-analyses, should be comprehensive and should include an in-depth discussion. Papers in a numbered series are not accepted unless all are presented at the same time. The maximum length including references, tables and figures must not exceed 9 journal pages; this represents approx. 7,000 words as text plus tables (and 2-3 figures in 2 addition). More than 8 tables plus figures are discouraged. For guidance, 7,000 words correspond to approx. 25-28 pages of text plus tables written in font Arial 12, double spacing, 2.5 cm margins. Large tables are discouraged in the manuscript but they may be submitted as Supplementary Material (see below). Manuscripts that are too long will be sent back to the author. A style sheet summarizing these indications is available on our website.

- Short communications will only be accepted in special cases where, in the Editor's judgement, the contents are exceptionally exciting, novel or timely. Partial data or complete studies with a very limited amount of results will not be considered as short communications. The maximum length should not exceed 4 journal pages (approx. 3,000 words) including a maximum of 3 tables and/or figures and a maximum of 10 references. These short communications will be peer-reviewed in the same way as full papers. Very short publications which are not considered as short communications by the editorial board will be handled as full papers.

- Review papers can be invited or unsolicited. They have to be contemporary and comprehensive, and add information to published reviews on the same topic. When relevant, a statistical analysis of data and a meta-analysis approach are recommended. Mini-reviews on limited topics are accepted. The maximum length is 12 journal pages (approx. 9,500 words as text plus tables; and 3-4 figures in addition). More than 10 tables plus figures are discouraged. For guidance, 9,500 words correspond to approx. 35-38 pages of text plus tables written in font Arial 12, double spacing, 2.5 cm margins. Manuscripts that are too long will be sent back to the author. As for full research papers, supplementary material can be proposed.

- Conference/Symposia papers The journal will consider for publication the results of original work and critical reviews that are presented at conferences/symposia. Acceptance of such papers will be subject to: * the content being within the scope of the journal's interests * the journal's standard peer review process * reports of original work; the papers being full reports; short abstracts or reports of incomplete work will not be considered * symposium organisers agreeing to comply with the journals standards of acceptance. Symposium organisers who intend to publish papers from the symposium in animal should first contact Sarah Maddox from Cambridge University Press (smaddox@cambridge.org) for information on the management of these papers. If the papers do not fit the requested conditions

for publication in *animal*, the papers may be referred to *Advances in Animal Biosciences*, a companion publication of *animal* published by Cambridge University Press, for consideration for publication. If papers are accepted for publication in *animal*, subject to the Editor-in-Chief's discretion, they will be published either within the normal issues of the journal or as a special issue. The number of pages allocated to symposia papers will also be at the discretion of the Editor-in-chief and the Series Editor in consultation with symposium organisers and may be lower than the number of pages normally allocated to full research papers. Book reviews are not accepted. Letters to the editors may be published when the Editor-in-Chief believes that an exceptional topic has been raised that warrants debate through this medium. Submitted manuscripts should not have been published previously, except in a limited form (e.g. short communication to a symposium), part of MSc or PhD theses, and should not be under consideration for publication by other journals. Papers of which most of the content has previously been published in another language will not be considered for publication in *animal*. All co-authors should agree with the content of the manuscript. Authors should have obtained permission to use any copyrighted material in the manuscript prior to submission. The work described in the manuscript must comply with ethical guidelines available on the website http://www.animal-journal.eu/ethical_policy.htm.

Recommendations for preparation of papers

The responsibility for the preparation of a paper in a form suitable for publication lies in the first place with the author. Authors should consult a free issue or a free article of *animal*, available at <http://journals.cambridge.org/anmsample>, in order to make themselves broadly familiar with the layout and style of *animal*.

The English must be acceptable for publication. If the English is not good enough, editors may ask for a linguistic revision by a third-party service at any stage of the review process and at the author's cost. The copyeditor will check and correct minor grammatical errors and journal styles in the accepted manuscripts, but he will not perform language editing. A variety of third-party services specialising in language editing and/or translation can be found here: <http://journals.cambridge.org/action/stream?pagelId=8728&level=2&menu=Authors&pagelId=3608>. Manuscripts should be prepared using a standard word processing program, presented in a clear, readable format with easily identified sections and headings and typed with double-line spacing with wide margins (2.5 cm). The use of small paragraphs with less than 8 lines must be minimised. The lines must be continuously numbered (on left side); the pages must also be numbered. Font Arial 12 should be used for the text, and Arial 11 for tables and references, in order to easily evaluate manuscript length. The typographical and other conventions to be adopted are set out below. A style sheet is available on our website in order to help the authors to organise their manuscript and to comply with *animal* style format. Manuscripts which do not follow the below mentioned conventions will be sent back to the author. Title A title needs to be concise and informative. It should: (a) arrest the attention of a potential reader scanning a journal or a list of titles; (b) provide sufficient information to allow the reader to judge the relevance of a paper to his/her interests and whether it will

repay the effort of obtaining a copy; (c) incorporate keywords or phrases that can be used in indexing and information retrieval, especially the animal species on which the experiment has been carried out; (d) avoid inessentials such as 'A detailed study of ...', or 'Contribution to ...'; (e) not include the name of the country or of the region where the experiment took place; (f) be shorter than 170 characters including spaces. Authors and affiliation The names and affiliations of the authors should be presented as follows: J. Smith^{1,a}, P.E. Jones², J.M. Garcia^{1,3} and P.K. Martin Jr² ¹Department of Animal Nutrition, Scottish Agricultural College, West Main Road, Edinburgh EH9 3JG, UK ² Animal Science Department, North Carolina State University, Raleigh, NC 27695-7621, USA ³ Laboratorio de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, C. Miguel Servet, 177, 50013, Zaragoza, Spain a Present address: Dairy Science Laboratory, AgResearch, Private Bag 11008, Palmerston North, New Zealand (for any author of the list whose present address differs from that at which the work was done) Corresponding author: John Smith. E-mail: John.Smith@univ.co.uk The corresponding author indicated in the manuscript who will be the correspondent for a published paper can be different from the corresponding author who submits and manages the manuscript during the review process; the latter corresponding author will need to be registered on Editorial Manager. Running head Authors should propose a running head of no more than 50 characters. If the proposed running head is not appropriate, it could be modified by the Editorial Office, with the author's agreement. Abstract Every paper should have a one-paragraph abstract of not more than 400 words which is complete and understandable without reference to the paper. It should state succinctly the problem, the experimental methods, results and conclusions but should not be overburdened by numerical values or probability values. References to tables and figures, and undefined abbreviations are not acceptable. Keywords Up to a maximum of five keywords selected from CAB Thesaurus (1995) or from an equivalent volume should be selected. Keywords are essential in information retrieval and should be indicative of the content of the paper (animal species, etc.). If the proposed keywords are not appropriate, the manuscript will be returned to the authors. The use of non-standard abbreviations in the list of keywords is discouraged. 4 Implications Authors must write maximum 100 words explaining the implications of their work. Implications explain the expected importance or economic, environmental and/or social impact. This must be in simple English suitable for non science readers. This section is mandatory and will be peer-reviewed. Introduction The Introduction should briefly present the current issues that the authors are addressing while outlining the context of the work, ensuring that the objectives are clearly defined, and that the main features of the experiment or of the work are clear to the reader. Increasing the knowledge on a subject is not an objective per se. References in the Introduction should be limited as it should not be a preliminary discussion or a literature review. Material and methods Material and Methods should be described in sufficient detail within this section, so that it is possible for others to repeat the experiment. If the methods are numerous, authors should refer to one of their previous publications in which they are described in detail. If a proprietary product is used as a source of

material in experimental comparisons, this should be described using the appropriate chemical name. If the trade name is helpful to the readers, provide it in parentheses after the first mention. Authors who have worked with proprietary products, including equipment, should ensure that the manufacturers or suppliers of these products have no objections to publication if the products, for the purpose of experimentation, were not used according to the manufacturer's instructions. Results - Discussion They can be presented together (Results and Discussion) or in 2 different sections (Results followed by Discussion). Conventions for presenting these sections or the Materials and Methods section (subheadings, etc.) are presented later in this document.

Tables These should be as simple and as few as possible. The same material should not normally be presented in tabular and graphical form. When both forms are possible, authors should present tables. Generally, variables are in rows and treatments in columns. In designing tables, authors should refer to the page size and column widths of animal as guidance. Each table should be typed, preferably in double spacing, on a page separate from the main body of the text (one table per page) and an indication given in the text where it should be inserted. Tables which are created in Word should not use tabs but should use the table function within the programme. Tables should not be prepared with vertical lines between columns and horizontal lines between rows of data. Tables should be given Arabic numbering and each should have its own explanatory title, footnotes and definitions of abbreviations which are sufficient to permit the table to be understood without reference to the text ("Effect of fat source and animal breed on carcass composition in pigs" is preferred to "Carcass composition"). The title should not contain too many details about the protocol, the definition of abbreviations, etc. Such details are preferred as footnotes. All tables must be cited consecutively in the text. Column headings should be concise and units should be clearly stated using standard abbreviations; any non-standard abbreviation 5 should be defined. Only the first letter of the first word is in capitals. Sub-items describing the data in the rows should be indented relative to crossheadings; where they involve printing on more than one line, they should be indented in the second and subsequent lines. Sub-sub-items should also be indented. Footnotes should be used sparingly and kept brief. They must provide the bases for statistics (levels of significance, statistical model, etc.). The reference symbols used in footnotes are numbers in low cases. The values in the tables should be given with meaningful decimals; practically, the last digit should correspond to about one tenth of the standard error. The number of decimals for mean treatment values and the corresponding indicator of residual variability (RSD, SEM, RMSE, etc.) should be consistent in all the tables, either identical or one more for the variability indicator, but not both possibilities. Values such as efficiencies or digestibilities are preferred as percentages. Figures It is recommended that the width of any diagram submitted should be either 175 mm (2 columns) or 83 mm (1 column) including the legend at the side(s). In choosing ornaments, solid symbols should be used before open symbols, and continuous lines before dotted or dashed lines. The size of symbols should be appropriate (neither too small nor too big and clumsy). The use of colour in figures should be avoided,

unless it is essential to understanding the figure. Figures are then usually supplied as black and white and as one file per figure. Colour figures are reproduced at no cost to the author for the online version. But the authors are liable to cover the additional costs for printing figures in colour. Publication charges can be found at http://www.animal-journal.eu/documents/Reprints_cost.pdf. All figures must be numbered consecutively in the text. Captions for all figures should be typed on a separate page at the end of the manuscript and should be sufficiently detailed to allow the figure to be understood without reference to the text; figures are submitted without their captions. An indication of where a figure should appear should be given within the text. Diagrams and plates are referred to within the text as Figure 1, etc., and the captions begin with Figure 1, etc. For details of submission requirements, refer to section on 'Submission and evaluation of the manuscript'.

Acknowledgements In this section, the authors may acknowledge (briefly) their support staff, their funding sources, their credits to companies or copyrighted material, etc. All papers with a potential conflict of interest must include a description/explanation under the Acknowledgements heading.

References It is the author's responsibility to ensure that all references are correct. The references should adhere to the guidelines, be relevant to the text content and they should all be cited in the text. The maximum number of references is 10 for short communications, 35 for original articles and 50 for review papers, except when the editor agrees a higher number. No more than 3 references can be given for the same statement (except for reviews and meta-analyses). Authors should minimise the number of references to conference proceedings, reports, PhD theses, and other references which cannot easily be obtained by the reader. The accuracy of the references is the responsibility of the authors. Authors should carefully check authors' surnames and first names, article title, journal title, volume and page numbers, book publisher's information, proceedings exact description. Literature cited should be listed in alphabetical order of authors and references should not be numbered. For a same first author, the rank of references will be i) publications with one author ranked by year; ii) publications with two authors ranked by year; iii) publications with more than two authors ranked by year then, if necessary, by alphabetical order of the second author. Typical references are: Journal article or abstract: Format: Author(s) surname and Initials Year. Title. Full title of the journal volume, pages. The issue within the volume is not mentioned, except if the numbering is per issue and not per volume (ex: newspapers). The word 'abstract' if applicable is not mentioned. Titles which cannot be written in Latin characters will be translated in English, followed by (in xxx) where xxx is the original language. Examples: Martin C, Morgavi DP and Doreau M 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* 4, 351-365. Morgavi DP, Martin C, Jouany JP and Ranilla MJ 2012. Rumen protozoa and methanogenesis: not a simple cause-effect relationship. *British Journal of Nutrition* 107, 388-397. When the article is online but not yet printed, the right format is: 6 Zamaratskaia G and Squires EJ. Biochemical, nutritional and genetic effects on boar taint in entire male pigs. *Animal*, doi:10.1017/S1751731108003674, Published online by Cambridge University

Press 17 December 2008. Book: Format: Author(s) or editor(s) surname and Initials, or institution Year. Title, number of volumes if more than 1, edition if applicable. Name of publisher, place of publication (i.e. city, state (if applicable) and country). Example: Association of Official Analytical Chemists 2004. Official methods of analysis, 2 vol., 18th edition. AOAC, Arlington, VA, USA. Book chapter or edited conference proceedings: Format: Author(s) surname and Initials Year. Title. In Title of the book or of the proceedings (eds followed by the editor(s)), volume number when applicable, pages. Name of publisher, place of publication (i.e. city, state (if applicable) and country). For edited proceedings, it is not necessary to mention the date and place of the symposium. Example: Nozière P and Hoch T 2006. Modelling fluxes of volatile fatty acids from rumen to portal blood. In Nutrient digestion and utilization in farm animals (eds E Kebreab, J Dijkstra, A Bannink, WJJ Gerrits and J France), pp. 40–47. CAB International, Wallingford, UK. Report at an event (conference, meeting, etc) not included in a book or edited proceedings: Format: Author(s) surname and Initials Year. Title. Nature of the event, date of the event (i.e. day month year), place of the event (i.e. city, state (if applicable) and country), pages or poster/article number (if applicable). Examples: Martuzzi F, Summer A, Malacarne M and Mariani P 2001. Main protein fractions and fatty acids composition of mare milk: some nutritional remarks with reference to woman and cow milk. Paper presented at the 52nd Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Budapest, 26-29 August 2001, Budapest, Hungary Bispo E, Franco D, Monserrat L, González L, Pérez N and Moreno T 2007. Economic considerations of cull dairy cows fattened for a special market. In Proceedings of 53rd International Congress of Meat Science and Technology, 5-10 August 2007, Beijing, China, pp. 581–582. Thesis: Format: Author surname and Initials Year. Title. Type of thesis, University with English name, location of the University (i.e. city, state (if applicable) and country). Example: Vlaeminck B 2006. Milk odd- and branched-chain fatty acids: indicators of rumen digestion for optimisation of dairy cattle feeding. Thesis PhD, Ghent University, Ghent, Belgium. Website addresses can be used when no other reference is available. They should be presented as for standard references but, in addition, they should include the date when the document was retrieved: Bryant P 1999. Biodiversity and Conservation. Retrieved on 4 October 1999, from <http://darwin.bio.uci.edu/~sustain/bio65/Titlepage.htm>

Citation of references In the text, references with three or more authors should be cited on all occasions with the first author followed by *et al.* (in italics; e.g. Smith *et al.*). References with two authors should be cited in full on all occasions. Names of organizations used as authors (e.g. Agricultural and Food Research Council) should be written out in full in the list of references and on first mention in the text. Subsequent mentions may be abbreviated (e.g. AFRC). Ampersands (&) are not to be used. Multiple references should be as follows: Wright *et al.*, 1993 and 1994; Wright *et al.*, 1993a and 1993b. When several references are cited simultaneously, they should be ranked by chronological order (e.g. Smith *et al.*, 1995; Fabre *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1998; Fabre *et al.*, 1999). ‘Personal communication’ or ‘unpublished results’ should follow the name of the author in the text where appropriate. The author’s initials but not his

title should be included, and such citations are not needed in the reference list. Check that all of the references in the text are in the list of references and vice versa. Bibliographic database softwares can be used. The output styles for Endnote, Procite and Reference Manager may be found on the journal website http://animal-journal.eu/instructions_to_authors.htm. 7 Supplementary material Authors can include supplementary material in any type of text (full research paper, review paper, short communication, etc.). Supplementary material will appear only in the electronic version, and is not limited in length. It will be peer-reviewed along with the rest of the manuscript, but will not be copyedited. Authors are entirely responsible for its content and must check carefully the format and styles. This supplementary material could contain original modus operandi, tables or figures which are not necessary for understanding the text within the main body of the paper, mathematical models, references of publications which are used, for example, in a meta-analysis and which do not appear in the text, or pictures improving the understanding of the text. The manuscript must stand alone without the supplementary material for those readers who will be reading the hard copy only. This should be submitted with the main manuscript in a separate file and identified as "Supplementary File – for Online Publication Only". Each figure should have its own title embedded in the figure (below). Supplementary material should be identified and mentioned in the main text as Supplementary Table S1, Supplementary Table S2, etc. for tables or Supplementary Figure S1, Supplementary Figure S2, etc. for figures or Supplementary Material S1, Supplementary Material S2, etc. for other material). For example: "The list of references used for the meta-analysis is given in Supplementary Material S1". A link to this on-line supplementary material will be included by the Production Editor at the proof preparation stage.

Typographical conventions and consistencies Headings As illustrated and detailed above and in the style sheet (see website), the animal convention is as follows. (a) Title of the paper is in bold with only the first letter in capitals. Authors' names are in lower case with initial capitals and their addresses are in italics. (b) Main section headings (Abstract, Introduction, Implications, Material and methods, Results, Discussion, Acknowledgement(s), References) are printed in bold throughout and placed by the left margin. (c) Subheadings are italicized and only the initial letter is in capitals. The two classes are: (i) side italics unpunctuated (shoulder headings); (ii) italics, punctuated and text run-on (side headings). The sequence is always (i) to (ii). Abbreviations When abbreviations are defined in the text, they should be written in bold capitals at first occurrence. The abbreviations listed below do not require the full spelling.

ACTH Adrenocorticotropic hormone
 ADF Acid detergent fibre
 ADL Acid detergent lignin
 ADP Adenosine diphosphate
 ANOVA Analysis of variance
 ATP Adenosine triphosphate
 BLUP Best linear unbiased prediction
 BW Body weight
 CoA Coenzyme A

CP Crude protein
 DNA Deoxyribonucleic acid
 ELISA Enzyme-linked immunosorbent assay
 FSH Follicle-stimulating hormone
 GLC Gas-liquid chromatography
 GLM General Linear Model
 HPLC High performance (pressure) liquid chromatography
 IGF Insulin-like growth factor
 IR Infrared
 LH Luteinising hormone
 MS Mass spectrometry n Number of samples
 NAD Nicotinamide adenine dinucleotide 8
 NADP Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
 NADPH₂ Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
 NDF Neutral detergent fibre
 NIRS Near infrared spectrophotometry
 PAGE Polyacrylamide gel electrophoresis
 PCR Polymerase chain reaction
 PMSG Pregnant mare's serum gonadotropin
 RNA Ribonucleic acid
 SDS Sodium dodecyl sulfate
 UV Ultraviolet

The names of the chemicals do not need to be written out in full; chemical symbols are sufficient. Fatty acids are abbreviated using the following rules: cis-18:1 for the sum of cis octadecenoic acids. When isomers are described, the double bond positions are identified by numbering from the carboxylic acid end: c9,t11-18:2; iso-15:0. The terms "omega 3" and "omega 6" are banned and replaced by "n-3" and "n-6", e.g. 18:3n-3. Trivial names can be used for the most known fatty acids (myristic, palmitic, oleic, linoleic, linolenic) and abbreviations in some cases: CLA for conjugated linoleic acids, EPA for eicosapentaenoic acid, DHA for docosahexaenoic acid. Chemical names and trivial names cannot be mixed in a same table. Capitals (a) Initial capitals are used for proper nouns, for adjectives formed from proper names, for generic names and for names of classes, orders and families. (b) Names of diseases are not normally capitalized. Italics Use italics for: (a) titles of books and names of periodicals in the text; (b) authors' addresses; (c) subheadings (see above); (d) titles for tables (but not captions for figures); (e) most foreign words, especially Latin words, e.g. ad hoc, ad libitum, et al., in situ, inter alia, inter se, in vitro, per se, post mortem, post partum but no italics for c.f., corpus luteum, e.g., etc., i.e., N.B., via (f) mathematical unknowns and constants; (g) generic and specific names; (h) letters or numbers in the text which refer to corresponding letters or numbers in an illustration; (i) letters used as symbols for genes or alleles e.g. HbA, Tf D (but not chromosomes or phenotypes of blood groups, transferrins or haemoglobins, e.g. HbAA, TfDD); (j) first occurrence of a special term; (k) repeated emphasis of a special term (use cautiously); (l) Latin names of muscles (but not of bones), e.g. m. biceps femoris. Spelling All papers must be written in English. Spelling may be in

British or American English but must be consistent throughout the paper. Please refer to standard dictionaries e.g. Webster's, Collins, Concise Oxford for the correct spelling of words and to Fowler's Modern English Usage (3rd edition, edited by R.W. Burchfield, Oxford University Press) for usage. Care should be exercised in the use of agricultural terminology that is ill-defined or of local familiarity only.

Numerals (a) In text, use words for numbers zero to nine and figures for higher numbers. In a series of two or more numbers, use figures throughout irrespective of their magnitude. (b) Sentences should not, however, begin with figures. (c) For values less than unity, 0 should be inserted before the decimal point. (d) For large numbers in the text substitute 10ⁿ for part of a number (e.g. 1.6 10⁶ for 1 600 000). (e) To facilitate the reading of long numbers in tables, the digits should be grouped in three about the decimal sign but no point or comma should be used. (f) The multiplication sign between numbers should be a cross (x). (g) Division of one number by another should be indicated as follows: 136/273. 9 (h) Use figures whenever a number is followed by a standard unit of measurement (e.g. 100 g, 6 days, 4th week). (i) Use figures for dates, page numbers, class designations, fractions, expressions of time, e.g. 1 January 2007; type 2. (j) Dates should be given with the month written out in full in the text and with the day in figures (i.e. 12 January not 12th January). Single non-calendar years should be written 2006/07; periods of two calendar years as 2006-07. (k) For time use 24-h clock, e.g. 0905 h, 1320 h.

Units of measurement The International System of Units (SI) should be used. A list of units is found for example at <http://physics.nist.gov/cuu/Units/units.html>. Recommendations for conversions and nomenclature appeared in Proceedings of the Nutrition Society, 31: 239-247, 1972. Some frequently used units which are not in the SI system are accepted: l for litre, ha for hectare, eV for electron-volt, Ci for curie. Day, week, month and year are not abbreviated. A product of two units should be represented as N·m and a quotient as N/m (e.g. g/kg and not g.kg⁻¹), except in case of two quotients (e.g. g/kg per day and not g/kg/day). Concentration or composition Composition expressed as mass per unit mass or mass per unit volume should have as denominator the unit of mass, the kilogram, or the unit of volume, the litre. Values should thus be expressed as nanograms, micrograms, milligrams or grams per kilogram or per litre. The term content should not be used for concentration or proportion.

Statistical terms chi square χ^2 coefficient of determination R² coefficient of variation CV correlation multiple R sample coefficient r degrees of freedom d.f. expectation of mean square e.m.s. least significant difference LSD mean square m.s. non-significant P>0.0.

Normas Tropical Animal Health and Production

Instructions for Authors TYPES OF ARTICLES Manuscripts should be presented preferably in Times New Roman font, double spaced, using A4 paper size. Please use the automatic page and line numbering function to number the pages and lines in your document and number the lines in a single continuous sequence. Regular Articles: Articles should be as concise as possible and should not normally exceed approximately 4000 words or about 8 pages of the journal including illustrations and tables. Articles should be structured into the

following sections; (a) Abstract of 150250 words giving a synopsis of the findings presented and the conclusions reached. The Abstract should be presented as a single continuous paragraph without subdivisions. (b) Introduction stating purpose of the work (c) Materials and Methods (d) Results (e) Discussion (conclusions should be incorporated in the discussion!) (f) Acknowledgements (g) Statement of Animal Rights (h) Conflict of Interest Statement (i) References Short Communications and Technical Notes: Short Communications and Technical Notes should not normally exceed approximately 2000 words or about 4 pages of the journal, including illustrations, tables and references. An abstract of 150250 words should be included and a minimum number of subheadings may be included if it adds clarity to the article. Short Communications report original scientific data. Technical Notes describe innovative methodologies. Reviews: Review articles will be welcomed. However, authors considering the submission of review articles are advised to consult the EditorinChief in advance. Correspondence: Letters on topics relevant to the aims of the Journal will be considered for publication by the EditorinChief who may modify them. It is the authors responsibility to ensure that submitted manuscripts comply with journal format as indicated in the current instructions to authors and free sample articles on the springer.com journal homepage.

ETHICAL STANDARDS Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human and animal studies have been approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted. These statements should be added in a separate section before the reference list. If these statements are not applicable, authors should state: The manuscript does not contain clinical studies or patient data. The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the abovementioned requirements. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the abovementioned requirements

MANUSCRIPT SUBMISSION Manuscript Submission Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all coauthors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally

responsible should there be any claims for compensation. **Permissions** Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors. **Online Submission** Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

TITLE PAGE Title Page The title page should include: The name(s) of the author(s) A concise and informative title The affiliation(s) and address(es) of the author(s) The email address, telephone and fax numbers of the corresponding author **Abstract** Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references. **Keywords** Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes. **TEXT** Text Formatting Manuscripts should be submitted in Word. Use a normal, plain font (e.g., 10point Times Roman) for text. Use italics for emphasis. Use the automatic page numbering function to number the pages. Do not use field functions. Use tab stops or other commands for indents, not the space bar. Use the table function, not spreadsheets, to make tables. Use the equation editor or MathType for equations. Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions). Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

Headings Please use no more than three levels of displayed headings. **Abbreviations** Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter. **Footnotes** Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables. Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lowercase letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes. **Acknowledgments** Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full. Please note: Use the automatic page and line numbering function to number the pages and lines in your document. **REFERENCES** 1. All publications cited in the text should be presented in the list of references. The typescript should be carefully checked to ensure that the spelling of the authors' names and dates are exactly the same as in the reference list. 2. In the text, refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed, if necessary, by a short reference to appropriate pages. Examples: 'Peters (1985) has shown that "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1984, pp. 1216)' 3. If reference is made in the text to a publication by three or more authors, the abbreviation et al. should be used. All names should be given in the list of references. 4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically by authors' surname(s) and chronologically by author. If an author in the list is also mentioned with coauthors the following order should be used: publications by the single author, arranged according to publication dates; publications of the same author with coauthors. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1986a, 1986b, etc. 5. Use the following system for arranging each reference in the list: • For journal articles: Ahl, A.S., 1986. The role of vibrissae in behaviour: a status review, *Veterinary Research Communications*, 10, 245268

• For books: Fox, J.G., Cohen, B.J. and Lowe, F.M., 1984. *Laboratory Animal Medicine*, (Academic Press, London) • For a paper in published symposia proceedings or a chapter in multiauthor books: Lowe, K.F. and Hamilton, B.A., 1986. Dairy pastures in the Australian tropics and subtropics. In: G.T. Murtagh and R.M. Jones (eds), *Proceedings of the 3rd Australian conference on tropical pastures*, Rockhampton, 1985, (Tropical Grassland Society of Australia, St. Lucia; Occasional Publication 3), 6879 • For unpublished theses, memoranda etc: Crowther, J., 1980. *Karst water studies and environment in West Malaysia*, (unpublished PhD thesis, University of Hull) • For Online documents: Doe J. Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. 1999. <http://www.rsc.org/dose/title> of subordinate document. Do not abbreviate the titles of journals mentioned in the list of references.

7. Titles of references should be given in the original language, except for the titles of publications in nonLatin alphabets, which should be transliterated, and a notation such as '(in Russian)' or '(in Greek, with English abstract)' added.

8. Citations of personal communications should be avoided unless absolutely necessary. When used, they should appear only in the text, using the format: 'E. Redpath, personal communication, 1986' and should not appear in the Reference List. Citations to the unpublished data of any of the authors should not be included unless the work has already been accepted for publication, in which case a reference should be given in the usual way with "in press" in place of the volume and page numbers.

TABLES All tables are to be numbered using Arabic numerals. Tables should always be cited in text in consecutive numerical order. For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table. Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption. Footnotes to tables should be indicated by superscript lowercase letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission Supply all figures electronically. Indicate what graphics program was used to create the artwork. For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable. Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files. Name your figure files with "Fig" and the figure number, Figure Lettering To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts). Keep lettering consistently sized throughout your finalized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt). Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8pt type on an axis and 20pt type for the axis label. Avoid effects such as shading, outline letters, etc. Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering All figures are to be numbered using Arabic numerals. Figures should always be cited in text in consecutive numerical order. Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.). If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions Each figure should have a concise caption

describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file. Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type. No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption. Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs. Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption. **Figure Placement and Size** Figures should be submitted separately from the text, if possible. When preparing your figures, size figures to fit in the column width. For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm. For books and booksized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm. **Permissions** If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used. **Accessibility** In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that All figures have descriptive captions (blind users could then use a texttospeech software or a texttoBraille hardware) Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements) Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form. **Submission** Supply all supplementary material in standard file formats. Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and email address of the corresponding author. To accommodate user downloads, please keep in mind that largesized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading. **Audio, Video, and Animations** Resolution: 16:9 or 4:3 Maximum file size: 25 GB Minimum video duration: 1 sec Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp **Text and Presentations** Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for longterm viability. A collection of figures may also be combined in a PDF file. **Spreadsheets** Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended. If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel). **Specialized Formats** Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied. **Collecting Multiple Files** It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file. **Numbering** If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables. Refer to the

supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4". Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf". Captions For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file. Processing of supplementary files Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting. Accessibility In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk) ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct. Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include: The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration. The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the reuse of material to avoid the hint of textrecycling ("selfplagiarism")). A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. "salamipublishing"). No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ("plagiarism"). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted. Important note: the journal may use software to screen for plagiarism. Consent to submit has been received explicitly from all coauthors, as well as from the responsible authorities tacitly or explicitly at the institute/organization where the work has been carried out, before the work is submitted. Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results. In addition: Changes of authorship or in the order of authors are not accepted after acceptance of a manuscript. Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted. Justification for changes in authorship must be compelling and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance or publication, the request and documentation must be sent via the Publisher to the EditorinChief. In all cases,

further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the EditorinChief of the journal and may be turned down. Therefore authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission. Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the EditorinChief's implementation of the following measures, including, but not limited to: If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author. If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note. The author's institution may be informed.

COMPLIANCE WITH ETHICAL To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals. Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" on the title page when submitting a paper: Disclosure of potential conflicts of interest Research involving Human Participants and/or Animals Informed consent Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the Instructions for Authors carefully. The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication. The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the abovementioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the abovementioned guidelines.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests that are directly or indirectly related to the research may include but are not limited to the following: Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number) Honoraria for speaking at

symposia Financial support for attending symposia Financial support for educational programs Employment or consultation Support from a project sponsor Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships Multiple affiliations Financial relationships, for example equity ownership or investment interest Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights) Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (nonfinancial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research. The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found here: The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s). See below examples of disclosures: Funding: This study was funded by X (grant number X). Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z. If no conflict exists, the authors should state: Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

RESEARCH INVOLVING HUMAN PARTICIPANTS AND/OR ANIMALS

1) Statement of human rights When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards. If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study. The following statements should be included in the text before the References section: Ethical approval: "All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards." For retrospective studies, please add the following sentence: "For this type of study formal consent is not required."

2) Statement on the welfare of animals The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists). For studies with animals, the following

statement should be included in the text before the References section: Ethical approval: "All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed." If applicable (where such a committee exists): "All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted." If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements: "This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors." "This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors." "This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors."

INFORMED CONSENT All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning. The following statement should be included: Informed consent: "Informed consent was obtained from all individual participants included in the study." If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included: "Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article."

AFTER ACCEPTANCE Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color. Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs. Open Choice In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscriptionbased article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. Springer Open Choice Copyright transfer Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws. Open Choice articles do not require transfer

of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License. Offprints Offprints can be ordered by the corresponding author. Color illustrations Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs. Proof reading The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor. After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article. Online First The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers. DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH LANGUAGE SUPPORT? Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

8.4 VITA

Nome: Alexandre Susenbach de Abreu.

Filiação: Eurico Menezes de Abreu e Inalda Susenbach de Abreu.

Data de nascimento: 22/03/1975.

Local de nascimento: Cachoeira do Sul/RS, Brasil.

Formado na escola Francisco Manoel no ensino fundamental e na Escola Érico Veríssimo no município de Restinga Seca. Médico Veterinário formado pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) no ano de 2000. Mestre em Zootecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2006). Professor titular na Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL). Consultor na área de laticínios e bovinocultura de leite, ingressante no curso de doutorado do Programa de Pós Graduação em Zootecnia (UFRGS) no ano de 2011, sob orientação da Professora Doutora Vivian Fischer na área de nutrição e alimentação de ruminantes.