

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

Uso de aditivos e variação do aporte de alimentos na dieta de vacas em lactação sobre a composição e estabilidade do leite

Marcelo Tempel Stumpf
Engenheiro Agrônomo (UFPEL)

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

Porto Alegre-RS, Brasil
2012

AGRADECIMENTOS

Pai e mãe/mãe e pai, as duas pessoas mais inteligentes, surpreendentes e humildes que alguém pode ter o prazer de conhecer. Sei que qualquer coisa que eu escrever agradará a eles, mas nada que eu possa vir a dizer me parece ser o bastante; assim, fico com o simples e direto. Amo vocês e vocês sabem.

Meu irmão, Felipe, sempre apontando um caminho novo e mostrando que novas conquistas são possíveis. Aprendi (o) muito com ele, desde os tapas até os conselhos que me foram dados, sem que ele mesmo soubesse que os estava dando. Ídolo. Fica registrado o meu agradecimento a Ana, esposa do Felipe, por ter tornado ele (finalmente) um homem completo.

Minha namorada, Helena. Teu sorriso é o meu melhor incentivo e esse é mais um meio, além dos muitos cartões que ainda trocaremos, pelo qual expresso meu amor por ti.

Aos meus avôs e avós por terem gerado a família com a qual tenho o prazer de conviver.

Ao dindo Renato e meus primos, Renato Jr. e Fernanda por terem ajudado a transformar os últimos dias de dissertação muito agradáveis.

Aos meus amigos e aos nossos sagrados churrascos.

Ao colega Giovani, pela boa vontade em ajudar nos experimentos.

À Professora Vivian, mais do que uma orientadora, uma amiga.

À Embrapa e seus funcionários.

À CAPES, pela bolsa oferecida.

À UFRGS, pelo ensino gratuito e de qualidade.

Uso de aditivos e variação do aporte de alimentos na dieta de vacas em lactação sobre a composição e estabilidade do leite¹

Autor: Marcelo Tempel Stumpf
Orientadora: Prof. Dra. Vivian Fischer

RESUMO

Durante o período de 2010 e 2011 dois experimentos foram conduzidos na Embrapa Clima Temperado, em Capão do Leão/RS. O primeiro envolveu a adição de citrato de sódio e bicarbonato de sódio na dieta de vacas Jersey, com o intuito de verificar influência destes aditivos no controle da incidência de LINA, como alegado por parte da(s) indústria(s) comercializadora (s) dos produtos. Dezesete vacas foram divididas em três tratamentos, em dois períodos experimentais com diferentes dietas. Grupo controle: 5 vacas sem receber aditivos na dieta; grupo Citrato: 6 vacas recebendo 100 g diárias de citrato de sódio; grupo Bicarbonato: 6 vacas com 40 g diárias de bicarbonato de sódio na dieta. Foram medidos os teores plasmáticos de glicose e ureia e o pH urinário, para monitoramento da fisiologia dos animais, assim como se determinou a composição físico-química do leite e a contagem de células somáticas. Não foi detectado efeito da adição de bicarbonato de sódio e citrato de sódio em nenhum dos parâmetros avaliados, demonstrando a ineficácia do uso destes aditivos no controle da incidência de LINA. Um segundo experimento, com duração de cinco semanas, também envolvendo vacas da raça Jersey, foi elaborado com o objetivo de determinar alterações na permeabilidade das *tigh junctions* das células epiteliais da glândula mamária provocadas por restrição alimentar severa. Doze vacas foram divididas em dois tratamentos contendo seis vacas cada: grupo Controle: animais recebendo dieta atendendo suas exigências nutricionais durante todo o experimento; grupo Restrição: animais recebendo dieta restrita em 50% somente durante a terceira semana. Determinou-se a permeabilidade das *tight junctions* através da mensuração dos níveis plasmáticos de lactose e dos teores lácteos de lactose e sódio. Foi determinada também a composição físico-química do leite e a contagem de células somáticas das amostras, assim como os teores de cortisol plasmático, para identificação da condição de estresse às quais os animais em restrição alimentar estavam submetidos. A restrição alimentar promoveu estresse aos animais do grupo Restrição, resultando em maior permeabilidade das *tight junctions* das células da glândula mamária, com efeitos sobre a redução da estabilidade do leite no teste do álcool.

Palavras-chave: estabilidade, álcool, bicarbonato, citrato, restrição alimentar, *tight junctions*.

¹ Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (68p) Março, 2012.

Use of additives and variation of feeding levels in lactating Jersey cows on milk composition and its stability¹

Author: Marcelo Tempel Stumpf
Adviser: Prof. Dra. Vivian Fischer

ABSTRACT

In the period between 2010 and 2011 two experiments were conducted at Embrapa Clima Temperado, in Capão do Leão/RS. The first study involved the inclusion of sodium citrate and sodium bicarbonate in Jersey cow diet to determine the influence of this inclusion on the incidence of unstable non-acid milk (LINA). Seventeen animals were divided into three groups, in two experimental periods with different diets: Control group: 5 animals without the inclusion of additives in the diet; Citrate group: 6 animals receiving each 100 g of sodium citrate per day in the diet; Bicarbonate group: 6 animals receiving 40 g of sodium bicarbonate per day. Plasma concentration of glucose, urea as well as urine pH was measured to assess the animals' physiologic status. Milk's physical-chemical composition and somatic cell count were also determined. The inclusion of sodium citrate and sodium bicarbonate had no influence on any of the parameters evaluated, demonstrating the inefficiency of this technique in controlling the incidence of LINA. A second experiment, with five weeks duration also using Jersey cows, was carried out to define alterations in the permeability of mammary gland cells tight junctions due severe feeding restriction. Twelve animals were divided into two treatments with 6 cows each: Control group: animals receiving full diet during the entire study; Restriction group: animals receiving a 50% restricted diet only during the third week. Tight junction permeability was determined through plasma and milk levels of lactose and milk levels of sodium. Milk physical-chemical composition and somatic cell count were also determined. Cortisol concentration was measured to assess the animals stress condition. Feeding restriction induced stress in animals in the Restriction group, which promoted higher permeability of mammary gland cell tight junctions, with influences on the reduction of milk stability to the ethanol test.

Keywords: stability, alcohol, bicarbonate, citrate, feeding restriction, tight junctions

¹ Master of Science dissertation in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (68p.) March, 2012.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Caseínas.....	4
2.2 Estabilidade do leite ao teste do álcool.....	5
2.2.1 Fatores que interferem a estabilidade do leite ao teste do álcool.....	7
2.2.1.1 Concentração de álcool na mistura.....	7
2.2.1.2 Cálcio iônico.....	7
2.2.1.3 pH	8
2.2.1.4 Oferta de alimento.....	9
2.2.1.5 Contagem de células somáticas e mastite.....	10
2.2.1.6 Estádio lactacional.....	11
2.2.1.7 Outros minerais.....	11
2.3 Permeabilidade das Junções Firmes (<i>Tight junctions</i>).....	12
2.3.1 Parâmetros lácteos e sanguíneos x permeabilidade das <i>tight junctions</i>	13
2.3.2 Fatores que alteram a permeabilidade das <i>tight junctions</i>	14
2.3.2.1 Frequência de ordenhas.....	14
2.3.2.2 Estádio lactacional.....	15
2.3.2.3 Mastite.....	16
2.3.2.4 Estresse.....	17
3. HIPÓTESES E OBJETIVOS.....	18
CAPÍTULO II.....	19
Inclusion of additives in the diet and their effects upon metabolic attributes, composition and stability of bovine milk.....	20
CAPÍTULO III	31
Severe feed restriction increases permeability of mammary gland cells tight junctions and reduces ethanol stability of milk.....	32
CAPÍTULO IV	56
4.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
4.2. CONCLUSÕES GERAIS.....	59
4.3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
4.4. VITA.....	68

RELAÇÃO DE TABELAS

Página

CAPÍTULO II:

Table 1. Amount (kilogram of dry matter) of ingredients supplied in Experimental periods 1 (E1) and 2 (E2) and the diets' composition...	23
Table 2. Dietary cation-anion difference (DCAD) from diets supplied to Control, Bicarbonate and Citrate groups in Experimental period 1 and 2 and the mean DCAD value between periods.....	23
Table 3. Productivity attributes, milk composition and blood parameters from cows in Control, Bicarbonate and Citrate groups.....	25

CAPÍTULO III:

Table 1. Mean value for all variables in Clusters 1, 2 and 3 and significance levels.....	43
---	----

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO I:	
Figura 1. Micelas de caseína e suas sub-micelas.....	4
Figura 2. Estabilidade do leite no teste do álcool frente alterações em seu pH.....	9
CAPÍTULO III:	
Figure 1. Figure 1. Variables projected in Principal Factors 1 and 2.....	39
Figure 2. Correspondence graphic relating high (G100) or low feeding levels (G50) with high (H_MS) or low milk stability to the ethanol test (L_MS), high (H_SCC) or low somatic cell count (L_SCC), high (H_ML) or low lactose in milk (L_ML), high (H_MNa) or low sodium concentration (L_MNa), high (H_PL) or low plasma lactose (L_PL) and high (H_CO) or low cortisol levels (L_CO).....	41
Figure 3. Correspondence graphic relating high (G100) or low feeding levels (G50) with high (H_MP) or low milk production (L_MP), high (H_ML) or low lactose in milk (L_ML), high (H_MF) or low milk fat (L_MF), high (H_MPr) or low milk protein (L_MPr) and high (H_DM) or low days in milking (L_DM).....	42
Figure 4. Plot of canonical variables identified by cluster.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

LINA	Leite Instável Não Ácido
pH	Potencial hidrogeniônico
RS	Rio Grande do Sul
CCS	Contagem de células somáticas
SCC	Somatic cell count
TJ	<i>Tight junctions</i>
°D	Graus Dornic
Mg	Magnésio
Na	Sódio
Cl	Cloro
K	Potássio
SILA	Síndrome do Leite Anormal
Ca ²⁺	Cálcio iônico
% v/v	Por cento, volume/volume
g/L	Gramas por litro
Kg/dia	Quilos por dia
NaCl	Cloreto de sódio
BCAD	Balanço cátion-aniônico da dieta
g/Kg	Gramas por quilo
MS	Matéria seca
CMT	<i>Californian mastitis test</i>
mg/dL	Miligramas por decilitro
g/100g	Gramas por cem gramas
g/ml	Gramas por mililitro
l/day	Liters per Day
cell/ml	Cells per mililiter
µg/dl	Micrograms per decilitre
PF	Principal factors
PFA	Principal factors analysis
DM	Days in milking
H_DM	High days in milking

L_DM	Low days in milking
MF	Milk fat
L_MF	Low milk fat
H_MF	High milk fat
MPr	Milk protein
L_MPr	Low milk protein
H_MPr	High milk protein
TSS	Total soluble solids
L_TSS	Low total soluble solids
H_TSS	High total soluble solids
MP	Milk production
L_MP	Low milk production
H_MP	High milk production
ML	Milk lactose
L_ML	Low milk lactose
H_ML	High milk lactose
MpH	Milk pH
TA	Titrateable acidity
MS	Milk stability
L_MS	Low milk stability
H_MS	High milk stability
PL	Plasma lactose
L_PL	Low plasma lactose
H_PL	High plasma lactose
G50	50% feeding restriction group
G100	No feeding restriction group
L_SCC	Low somatic cell count
H_SCC	High somatic cell count
L_CO	Low cortisol
H_CO	High cortisol
MNa	Milk sodium
H_MNa	High milk sodium

L_MNa	Low milk sodium
µg/min	Micrograms per minute
ppm	Parts per million

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Beta
α	Alfa
γ	Gama
κ	Kappa

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os produtores de leite se veem em constante desafio, sempre na busca de produzir matéria-prima de qualidade e que atenda as exigências estabelecidas tanto pela legislação como pelo mercado consumidor. Dentre estes desafios se encontra os fatores envolvidos com a estabilidade do leite frente o teste do álcool. Utilizado pelas indústrias para prever a aptidão do produto aos procedimentos de industrialização e que envolvem aquecimento do leite, o teste do álcool é responsável pelo descarte de matéria prima que apresenta resultado positivo quando este é misturado, em mesmas quantidades, ao álcool na concentração 72% v/v, seguindo o estabelecido na Instrução Normativa nº62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Leite positivo no teste é considerado ácido e impróprio à industrialização, porém, quantidade expressiva, mas variável de amostras positivas no teste apresentam acidez dentro do considerado normal e legal (14°D a 18°D; pH entre 6,6 e 6,8).

A realização de constantes pesquisas voltadas ao esclarecimento das causas que promovem redução na estabilidade do leite é de grande importância para a cadeia produtora de leite. A partir do momento em que os produtores, que por vezes não têm conhecimento dos motivos pelos quais seu produto é descartado pela indústria, se tornam mais esclarecidos, os mesmos têm possibilidade de manipular seu sistema produtivo, na tentativa de controlar as causas que possam provocar a redução de estabilidade do leite produzido. As causas de alterações na estabilidade do leite são multivariadas, e os fatores

envolvidos interagem de maneira ainda não totalmente elucidada, tornando um desafio a compreensão dos fenômenos envolvidos no processo de desestabilização do leite. Sabe-se, por exemplo, que alterações no pH e no equilíbrio salino do leite promovem modificações na estabilidade das proteínas, e que a oferta de alimento e o estágio lactacional também influenciam essas características. Necessita-se, porém, de um entendimento mais aprofundado sobre as alterações e/ou padrões fisiológicos que ocorrem nos animais com problemas de instabilidade do leite. Esse conhecimento pode vir a ser mais uma ferramenta ao esclarecimento dos fatores envolvidos no processo de desestabilização do leite.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Caseínas

As caseínas são as principais proteínas do leite, compondo 80% do total, o restante sendo constituído pelas proteínas do soro, como, principalmente, β -lactoglobulina e α -lactoalbumina (Hermansen et al., 1994). As caseínas se apresentam no leite como uma proteína globular, possuindo uma porção hidrofóbica interiorizada na estrutura micelar e uma porção hidrofílica superficial.

As micelas de caseínas são agregados mais ou menos esféricos, com diâmetro variando de 40 até 300 nm (Figura 1). Estas estruturas contêm basicamente seus quatro tipos de caseína [α_{s1} ; α_{s2} ; (β + γ); κ] na proporção aproximada de 3:1:3:1 (Cheftel et al., 1989) e apresentam alta variação em estrutura e tamanho (Walstra, 1990). As micelas de caseína contêm aproximadamente 96% de proteína, 2,8% de cálcio, 2,3% de fósforo orgânico, 2,9% de fósforo inorgânico, 0,4% de citrato, além de traços de Mg, Na e K (Sgarbieri, 1996).

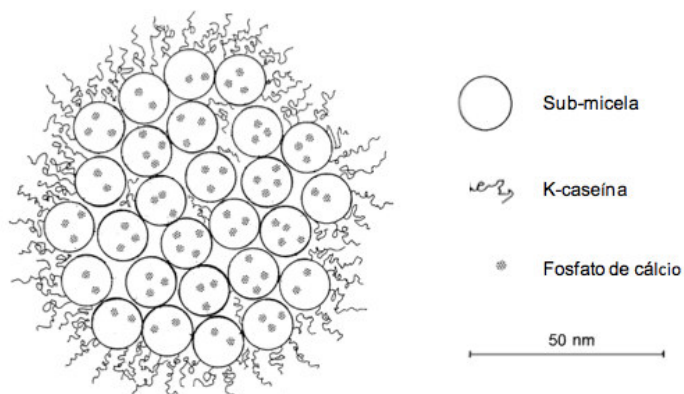


Figura 1: Micelas de caseína e suas sub-micelas (Walstra, 1999).

De acordo com Walstra (1999) as micelas são constituídas de sub-micelas, sendo que a presença de fosfatos de cálcio tem a função de mantê-las ordenadas. Estas sub-micelas variam em composição, podendo ser de dois tipos distintos: um tipo formado por α_s , β e κ -caseínas; outro constituído pelas caseínas α_s e κ . Dentre estas, possuem destaque as moléculas de κ -caseína, as quais se localizam predominantemente na superfície das micelas (Walstra, 1990; Holt, 1992) e apresentam fundamental importância na manutenção da estrutura protéica. Sua porção hidrofílica, conhecida como zona C-terminal, na maioria dos casos se exterioriza do núcleo micelar em direção ao solvente sob a forma de filamentos; tais filamentos possuem cargas e a repulsão eletrostática entre estas estruturas presentes em diferentes micelas de caseína são essenciais para a manutenção da estabilidade do leite contra o processo de coagulação (Walstra, 1990; Sgarbieri, 2005).

Segundo Smiddy et al. (2006), a estabilidade das micelas de caseína pode ser dividida em duas categorias: intermicelar e intramicelar. No contexto deste trabalho, cabe destaque o primeiro caso. A estabilidade intermicelar ou coloidal das micelas de caseína denotam a estabilidade das mesmas contra processos que promovam sua agregação, como, por exemplo, calor, etanol e acidificação.

2.2 Estabilidade do leite ao teste do álcool

O leite estável ao álcool se caracteriza pela não formação de grumos quando é misturado ao etanol em uma determinada graduação. O teste do álcool foi utilizado inicialmente pela indústria para medir o pH natural do leite, pois a acidez elevada provocaria a perda de estabilidade e a floculação das

caseínas em altas temperaturas. Justamente por isso, o teste é uma ferramenta para a classificação do leite das queijarias, determinando a aptidão do leite à coagulação por pressão (Barros, 2001).

Outros países, como Irã, Itália, Uruguai, Argentina, Chile e Japão também se utilizam do teste para avaliar a qualidade do leite (Oliveira et al., 2007; Marques, 2008).

A maior gama de trabalhos relativos ao teste do álcool se refere à estabilidade do leite bovino, porém, pesquisas já vêm sendo desenvolvidas com outras espécies, sendo encontrados trabalhos envolvendo bubalinos (Oliveira, 2009; Zanela et al., 2011), caprinos (Silva et al., 2008; Silva & Santos, 2010; Fros et al., 2011) e ovinos (Leitner et al., 2011).

A percepção de casos de amostras positivas ao teste do álcool e sem acidez elevada se traduziu na linha de pesquisa voltada ao fenômeno, conhecido com leite instável não ácido (LINA).

Além do LINA, outras síndromes passaram a ser estudadas e que se relacionam com caracteres relacionados à estabilidade do leite ao teste do álcool. Ponce e colaboradores, em 1996, denominaram SILA (Síndrome do Leite Anormal) o distúrbio no qual o leite é positivo no teste do álcool, porém, alcalino (Ponce & Hernández, 2001). Encontram-se relatos sobre o comportamento da fração protéica do leite frente o teste do álcool em muitos países como, além do Brasil (Donatele et al., 2003; Oliveira e Timm, 2006; Marques et al., 2007; Zanela et al., 2009), Itália (Pecorari et al., 1984), Japão (Yoshida, 1980), Argentina (Negri et al., 2001), Uruguai (Barros et al., 2000) e Irã (Sobhani et al., 2002).

2.2.1 Fatores que interferem na estabilidade do leite ao teste do álcool

2.2.1.1 Concentração de álcool na mistura

Existe uma relação entre a concentração de álcool utilizada e a estabilidade do leite ao teste em que, em uma mesma amostra de leite, quanto maior o teor alcoólico utilizado maior será a precipitação da amostra. Este fato se deve à diminuição da constante dielétrica da mistura em níveis mais elevados de etanol, reduzindo a repulsão eletrostática (Walstra, 1990) entre as micelas de caseína e ocasionando a formação dos grumos.

2.2.1.2 Cálcio iônico

A concentração de etanol necessária para coagular uma amostra de leite varia de maneira inversamente proporcional à quantidade de cálcio iônico (Zadow, 1993; Barros, 2001). White & Davies (1958a, 1958b, 1958c, 1958d) obtiveram resultados os quais levaram à sugestão de que aproximadamente 60% das variações de estabilidade do leite frente ao álcool se devem às alterações nos teores de cálcio iônico. Segundo Mikheeva et al. (2003), a forte ligação de íons específicos a grupos carregados das proteínas pode reduzir a repulsão eletrostática e favorecer a auto associação das mesmas. O excesso de sais tende a dominar as cargas presentes no solvente (água) e reduzir a quantidade de carga para se ligar ao soluto (proteínas), induzindo, assim, o aumento da interação soluto/soluto - precipitação das proteínas (Riegel, 2001). DeMan & Batra (1964) observaram redução de 84% para 66% na concentração de álcool necessária para desestabilizar amostras quando da adição de 10mg de íons de cálcio em amostras de 100 mL de leite desnatado.

Os valores de cálcio iônico encontrados em amostras de leite estáveis e instáveis no teste do álcool variam. Barros et al. (1998) notaram valores médios de $0,110 \pm 0,014$ e $0,083 \pm 0,017$ g/L de Ca^{2+} em amostras de leite positivas e negativas no teste do álcool, respectivamente. Tsioulpas et al. (2010), acrescentaram dois tipos de sais estabilizantes na tentativa de reduzir os teores de cálcio iônico de amostras de leite, percebendo, assim como Tsioulpas et al. (2007b) e Chavez et al. (2004), valores mais elevados para estabilidade do leite ao teste do álcool quando os valores de cálcio iônico foram menores.

2.2.1.3 pH

As micelas de caseína sofrem grandes transformações em suas propriedades em função da redução no pH do leite (Walstra, 1990). Van Vliet et al. (1989) relatam que em baixo pH o aumento da atração eletrostática entre moléculas de caseína mantém as micelas mais firmemente agrupadas. Em consonância, Kauzmann (1959) observou que, a partir do momento em que o pH lácteo é rebaixado a ponto de ultrapassar o ponto isoelétrico das caseínas (pH 4,6), sua solubilidade é reduzida, promovendo associação e subsequente coagulação das mesmas.

Reduções do pH promovem incremento nos níveis de cálcio iônico do leite (Rose, 1968; Horne & Muir, 1990; Tsioulpas, 2007a), cujos efeitos sobre a estabilidade já foram previamente discutidos.

Assim, amostras de leite com pH abaixo do normal tendem a coagular quando submetidas ao teste do álcool em concentrações mais baixas de etanol (Horne & Parker, 1981a), como demonstrado na Figura 2 (Horne &

Muir, 1990). Apesar disso, segundo Barros et al. (1999), o pH não pode, isoladamente, ser considerado uma ferramenta capaz de prever o comportamento do leite na prova do álcool.

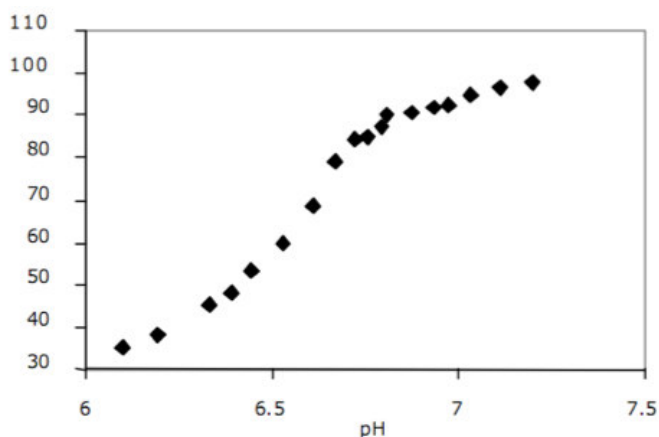


Figura 2: Estabilidade do leite no teste do álcool frente alterações em seu pH (Adaptado de Horne & Muir, 1990)

2.2.1.4 Oferta de alimento

A influência do aporte de alimentos sobre a incidência de leite instável não ácido (LINA) (Barros et al., 1999; Zanela, 2004) pode ser evidenciada quando se observa os resultados experimentais de Ponce & Hernández (2001), Marques (2004) e Machado (2010), os quais indicam maior incidência de leite instável em épocas do ano em que a oferta de alimentos é reduzida.

Animais submetidos a restrições alimentares e/ou nutricionais apresentam maior ocorrência de leite instável. Os resultados variam em função da magnitude da restrição, sua duração, do potencial produtivo e estágio lactacional dos animais. Por outro lado, o aumento do aporte alimentar e/ou nutricional melhora a estabilidade do leite, embora igualmente os seus

resultados variem conforme a magnitude, duração, potencial produtivo e estágio lactacional dos animais.

Zanela et al. (2006), encontraram aumento significativo na incidência de LINA quando restringiram o fornecimento nutricional em 40%. Abreu (2008) observou redução de 75% no número de amostras instáveis ao álcool 76% v/v quando do fornecimento de dietas ajustadas às necessidades das vacas.

2.2.1.5 Contagem de células somáticas e mastite

A influência da contagem de células somáticas (CCS) sobre a estabilidade do leite frente ao teste do álcool não se encontra totalmente esclarecida, dado a dicotomia dos resultados experimentais encontrados.

Escherichia coli, uma das bactérias presentes em quartos mamários mastíticos, contém grande quantidade de proteases capazes de degradar as caseínas e outras proteínas do leite (Rozcov, 2001). Este fato leva a crer que a atividade proteolítica dos agentes causadores da mastite possa reduzir a estabilidade do leite. De fato, Molina et al. (2001), ao analisar amostras de leite em tanque, encontraram maior CCS em amostras instáveis ao álcool 73,75%, quando comparadas com outras instáveis ao álcool 78%.

Em contrapartida ao apresentado, Machado (2010), ao comparar CCS de leite estável ou instável ao álcool 78%, não encontrou diferenças significativas. Donatele et al. (2001), Zanela (2004) e Abreu (2008) demonstraram não haver relação entre positividade do leite ao teste do álcool e alta CCS. Kolling et al. (2011) coletaram, individualmente, amostras de quartos mamários saudáveis e de quartos positivos no teste CMT e compararam as características do leite produzido, não evidenciando influência da mastite sobre

a incidência de LINA nas vacas utilizadas.

2.2.1.6 Estádio lactacional

Existe uma relação entre estágio lactacional da vaca e positividade do seu leite na prova do álcool, já que se constata aumento no número de amostras positivas no fim e no início da lactação (Barros et al., 1999). Com o avançar do período lactacional há um incremento na estabilidade do leite (White & Davies, 1958b). Tsioulpas et al. (2007b), em um trabalho medindo estabilidade à prova do álcool do leite produzido nos primeiros 90 dias de lactação, encontraram concentração alcoólica necessária para coagular as amostras passando de 53% no dia 1 para 70% no dia 5 e 85% no dia 90. A baixa estabilidade evidenciada no início da lactação (Mitamura, 1937) pode ser uma consequência da baixa estabilidade do colostro - contendo altos níveis de cálcio iônico - ao teste do álcool (White & Davies, 1958b), a qual se estenderia aos primeiros dias pós parto.

Garnsworthy *et al.* (2006) relacionaram lactação prolongada com alteração no equilíbrio salino do leite, provocada pelo aumento significativo nos teores de cálcio e magnésio e redução de citratos+fosfatos, o que reduz a estabilidade do leite no teste do álcool (Chavez *et al.*, 2004).

2.2.1.7 Outros minerais

O leite é uma solução coloidal apresentando proteínas (albuminas e caseínas) na presença de sais contendo Ca^{2+} e Mg^{2+} , fosfatos e citratos. É de se esperar, pois, que a estabilidade das proteínas lácteas seja influenciada pela quantidade e proporção destes sais (Sommer & Binney, 1923).

Enquanto a adição de citrato e fosfato tornaram o leite mais estável, o acréscimo de Ca e Mg teve efeito contrário (Horne & Parker, 1981b). Apesar do encontrado, Rose (1963), citado por Negri et al. (2002), afirma que não há evidências suficientes para comprovar o efeito desestabilizador do Mg. O papel dos citratos e fosfatos no aumento da estabilidade fundamenta-se na quelação do Ca^{2+} (Horne & Muir, 1990), sequestrando-o e reduzindo seus efeitos.

Morrissey (1969) relata que altas concentrações de K e Na tornam a caseína mais instável ao etanol. Esta afirmação encontra sustentação nos resultados experimentais de Chavez et al. (2004), onde foi constatado maiores teores de Cl, Na e K em amostras de leite instáveis ao álcool 72% v/v ou menos. O aumento da força iônica, a qual é regulada por estes íons, reduz a constante dielétrica do meio, enfraquecendo as barreiras que previnem a coagulação. Tsioulpas et al. (2007b) constataram teores de sódio mais baixos em amostras mais estáveis; em relação ao potássio, leite mais instável apresentou teores similares ao mais estável.

2.3 Permeabilidade das Junções Firmes (*Tight Junctions*)

Junções firmes, *Tight junctions* (TJ) ou *zonulae occludens* são estruturas semipermeáveis localizadas em proximidade à borda apical tanto de células epiteliais como endoteliais, circundando as mesmas (Stelwagen, 1998a) e permitindo a manutenção do contato célula-célula (Pitelka, 1978, citado por Zettl et al., 1992) entre células adjacentes. Apresentam funções específicas denominadas ‘cerca’ e ‘barreira’, as quais atuam simultaneamente. No primeiro caso, atua separando os conteúdos apical (lúmen alveolar) e basolateral (fluido intersticial) (Schneeberger & Lynch, 1992); no segundo, seu funcionamento

possibilita a existência de um diferencial iônico e/ou de pequenas substâncias entre os dois lados da células (Stelwagen et al., 1998a).

Na glândula mamária, elas são fundamentais para a síntese e manutenção da qualidade do leite, impedindo a perda de componentes para o sangue e a entrada de substâncias desse ao interior alveolar (Stelwagen et al., 1997).

Quando em estado ideal, essas junções se configuram impermeáveis, exercendo suas funções de barreira, cerca e controlando o fluxo paracelular de substâncias como íons e pequenas moléculas (Schneeberger & Lynch, 1992) de maneira ótima. As TJ da glândula mamária, porém, são dinâmicas e podem ser reguladas por um certo número de estímulos (Nguyen & Neville, 1998), os quais podem reduzir a impermeabilidade e impedir o pleno funcionamento destas estruturas.

2.3.1 Parâmetros lácteos e sanguíneos x permeabilidade das *tight junctions*

Como relatado anteriormente, a redução da impermeabilidade das TJ traz consigo o aumento do fluxo de substâncias entre o lúmen alveolar (conteúdo apical) e o plasma (conteúdo basolateral). Desta forma, percebe-se alterações na composição láctea, bem como o surgimento de traços de substâncias em níveis não naturais em ambos os compartimentos.

O parâmetro mais utilizado e confiável para a detecção do aumento da permeabilidade das TJ é a lactose sanguínea (Stelwagen et al. 1997; 2000). Já que este carboidrato é sintetizado exclusivamente na glândula mamária (Kuhn and Linzell, 1970) e sua secreção ocorre ao interior do lúmen

alveolar e não basolateralmente (Stelwagen et al. 1998b), qualquer traço de lactose no sangue sugere o fluxo deste componente do interior da glândula mamária para a corrente sanguínea, justamente em virtude da maior permeabilidade das *tight junctions*. A diminuição nos níveis de lactose no leite pode ser esperada como efeito associado a este fluxo.

Não só os teores de lactose sofrem modificações no leite. Redução nas concentrações de K^+ e elevação de Na^+ e Cl^- (Linzell et al., 1975), assim como alteração na relação Na^+/K^+ são reflexos da quebra da impermeabilidade das TJ (Wilde et al., 1995; Delamaire & Guinard-Flament, 2006). Os níveis destes sais não são os únicos alterados pela maior permeabilidade epitelial; são, sim, muito utilizados na detecção do fenômeno.

2.3.2 Fatores que alteram a permeabilidade das *tight junctions*

2.3.2.1 Frequência de ordenhas

Inúmeros são os estudos, em diferentes espécies, relacionando número de ordenhas diárias (frequência de ordenhas) com a permeabilidade das TJ da glândula mamária.

Castillo et al. (2008), trabalhando com ovelhas das raças Manchega e Lacaune em seis intervalos de ordenhas (4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas), encontraram maior permeabilidade das TJ a partir de 20 horas de acúmulo de leite no úbere; tais resultados estão em consonância com o já descrito por Stelwagen et al. (1994a) em cabras, as quais apresentaram redução da impermeabilidade das TJ a partir de 21 horas de acúmulo de leite, aproximadamente.

Stelwagen et al. (1997), em estudo com bovinos leiteiros, relataram incremento na permeabilidade das TJ em intervalos entre ordenhas superiores a 18 horas. Stelwagen et al. (1994b), Davis et al. (1999), Sorensen et al. (2001) e Delamaire & Guinard-Flament (2006) corroborando tais resultados, observaram aumento da permeabilidade das TJ diretamente proporcional ao intervalo entre ordenhas.

2.3.2.2 Estádio lactacional

A configuração das *tight junctions* das células da glândula mamária varia em relação ao estágio lactacional em que o animal se encontra. Peaker (1977) encontrou resultados sugerindo que durante a gestação as TJ se apresentam permeáveis; a partir do momento em que se inicia a lactogênese, estas estruturas passam a assumir sua impermeabilidade. De fato, Linzell & Peaker (1974) relatam TJ permeáveis no periparto, enquanto outros estudos (Linzell & Peaker, 1973; Neville, 1995) demonstraram modificações na composição láctea em decorrência da passagem do estágio gestacional ao lactacional, atribuindo estes resultados ao fechamento das TJ.

A própria permeabilidade evidenciada no periparto foi observada no final da lactação, durante a involução mamária (Fleet & Peaker, 1978, Capuco & Akers, 1999). Em adição ao afirmado, Shamay et al. (2003), ao promoverem perda da integridade das TJ pela infusão de hidrolizadores de caseína, simularam o processo natural de secagem dos quartos mamários das vacas tratadas.

2.3.2.3 Mastite

Processos inflamatórios na glândula mamária, como a mastite, promovem danos ao tecido epitelial mamário, com conseqüente aumento da permeabilidade tecidual, muito em decorrência da perda das funções das TJ. Estudos de Linzell & Peaker (1972) encontraram mudanças na composição do leite de vacas apresentando casos de mastite; houve aumento nos teores de sódio e cloro e incremento na condutividade, sugerindo maior permeabilidade das *tight junctions* das glândulas mamárias afetadas. Moussaoui et al. (2004), após infecção da glândula mamária com *Escherichia coli*, associaram o aumento da permeabilidade do epitélio mamário com o processo inflamatório induzido. Leitner et al. (2004) sugerem redução da integridade do epitélio mamário em decorrência de processos mastíticos, relatando, também, a possibilidade de o aumento na permeabilidade das TJ ser mais pronunciada em casos de mastite clínica, quando comparados com mastite subclínica.

Mastite induzida por infusão de endotoxinas e exotoxinas no úbere foi acompanhada por um aumento da permeabilidade das TJ, detectado pelo incremento nos níveis de sódio e de proteínas do plasma no leite (Symons & Wright, 1974; Frost et al., 1984). Mungatana et al. (2011), trabalhando com infusão de *Staphylococcus aureus* na glândula mamária de caprinos, encontraram elevações nos níveis de sódio e cloro e redução em lactose e potássio no leite das cabras infectadas, resultados condizentes com um aumento da permeabilidade das TJ destes animais.

O aumento da permeabilidade do epitélio mamário em todos estes casos não pode ser atribuído somente ao estado em que se encontram as TJ.

Outra possibilidade para os eventos decorrentes do processo inflamatório é a morte de células, o que pode formar orifícios no epitélio (Nguyen & Neville, 1998).

2.3.2.4 Estresse

Os efeitos do estresse sobre a permeabilidade das TJ ainda não foram totalmente elucidados. Existe, porém, a tendência de que animais mais estressados apresentem estas estruturas mais permeáveis, permitindo um maior fluxo de componentes entre o leite e o sangue. Stelwagen et al. (2000), trabalhando com os efeitos do estresse por isolamento social sobre a configuração das TJ, encontraram maior permeabilidade das TJ da glândula mamária dos animais sob este estresse psicológico. Aumento nos níveis de cortisol plasmático é evidenciado em animais sob algum tipo de estresse; este incremento foi destacado em experimentos *in vivo* (Stelwagen et al., 1998a) e *in vitro* (Zettl et al. 1992) como causador da redução da permeabilidade do epitélio mamário. Percebe-se, pois, uma dicotomia entre resultados experimentais. A hipótese levantada é a de que os efeitos benéficos do cortisol (redução da permeabilidade das TJ) são sobrepostos por outros fatores, também induzidos pelo estresse (Stelwagen et al., 2000).

Estresse mecânico em decorrência da redução na frequência de ordenhas e acúmulo de leite no úbere pode ativar uma via de sinalização por mecanotransdução, possivelmente afetando a permeabilidade das TJ (Millar et al., 1997).

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

HIPÓTESES

- ◆ A adição de bicarbonato de sódio e citrato de sódio na dieta pode melhorar a estabilidade do leite;

- ◆ Restrição alimentar pode aumentar a permeabilidade das *tight junctions* das células epiteliais da glândula mamária, o que, por sua vez, altera as propriedades físico-químicas do leite e reduz a sua estabilidade.

OBJETIVOS

- ◆ Verificar se a adição dos aditivos bicarbonato de sódio e citrato de sódio possui efeitos positivos no controle da incidência de LINA;

- ◆ Elucidar se a restrição alimentar causa alterações na permeabilidade das *tight junctions* das células epiteliais mamárias, alterando a composição do leite e reduzindo a sua estabilidade.

CAPÍTULO II

**Inclusion of additives in the diet and their effects upon metabolic attributes,
composition and stability of bovine milk¹**

¹ Nota técnica a ser encaminhada para a Revista Brasileira de Zootecnia

Technical Note

Inclusion of additives in the diet and their effects upon metabolic attributes, composition and stability of bovine milk¹

Marcelo Tempel Stumpf², Vivian Fischer³, Giovani Jacob Kolling³, Maira Balbinotti Zanela⁴, Maria Edi Rocha Ribeiro⁴, Alexandre Süsenbach de Abreu³

Abstract

ABSTRACT - Milk that is unsuitable for industrial purposes is a problem frequently faced with empirical products or practices without previous validation. Products containing citrate and/or bicarbonate have been alleged as having the capacity of increasing milk stability to the alcohol test when added to the animals' diet. The aim of the experiment was to evaluate the effects of daily inclusion at the commercialized rates of sodium citrate and sodium bicarbonate in lactating Jersey cows' diet upon aspects of metabolism, milk composition and stability. The study was conducted in Embrapa Clima Temperado (Capão do Leão/RS), using 17 Jersey cows distributed in three treatments (Control: without additives; Citrate: 100g/cow/day; Bicarbonate: 40g/cow/day) and two experimental periods. Average values of attributes related to the cows' metabolism (glucose and urea in blood), milk production and its chemical and physical properties were submitted to analyses of variance considering the effect of diet. The inclusion of sodium citrate and sodium bicarbonate had no influence over cows' metabolic attributes, body weight and condition score, milk production, milk composition and stability to the ethanol test. At the commercialized proposed rates, bicarbonate and sodium citrate are not suitable to increase milk stability.

Key words: alcohol test, bicarbonate, citrate, metabolism, unstable non-acid milk

¹ Experiment supported with CNPq grant.

² UFRGS, Porto Alegre. Corresponding author: marcelostumpf2003@yahoo.com.br

³ UFRGS, Porto Alegre.

⁴ Embrapa Clima Temperado, Capão do Leão.

Introduction

Since the experimental results evidencing occurrence of non-acid milk samples but with positive results in the ethanol test reported on the eighties until now (Yoshida, 1980; Pecorari et al., 1984; Ponce e Hernández, 2001; Marques et al., 2007; Zanela et al., 2009), studies have been developed to elucidate the causes of the reduction of milk stability to the ethanol test. Stress caused by shadow deprivation (Abreu et al., 2011) and severe feeding restriction (Stumpf et al., 2011), as well as ruminal (Ponce & Hernández, 2005) and metabolic acidosis (Marques et al., 2011) decreases milk stability. Other trials revealed the direct proportionality between nutrients/feed supply and milk stability (Zanela et al., 2006a,b; Marques et al., 2010a).

There are other factors, besides the nutritional supply and metabolic or ruminal condition, that seem to influence the stability of milk, such as lactation period, since low stability was verified at early and late lactation (Barros, 1999; Tsioulpas et al., 2007; Marques et al., 2010b); milk protein fraction (Barros et al., 2011); breed (Botaro et al., 2007; Czerniewicz et al., 2006); sanitary quality of milk, although the apparent negative relation between high values of somatic cell count (SCC) and total bacterial count with raw milk stability (Oliveira et al., 2011) is not properly established (Kolling et al., 2011).

This multifactorial feature of low milk stability difficult the elucidation of its causes. This problem is partially ignored by milk producers, most of those with low level of formal education (Brasil, 2006) and restricted access to technique and scientific information. This scenario favors the adoption of products and empiric practices, such as the inclusion in the animals' diet of reduced doses of sodium citrate and sodium

bicarbonate, with alleged effects in improvement of milk stability, but without any theoretical background or experimental validation.

This study was performed in order to evaluate the effects of the inclusion of the commercialized doses of sodium bicarbonate and sodium citrate upon milk stability to the ethanol test and upon animals' metabolism.

Material and Methods

The study was conducted from May to June of 2010 at Embrapa Clima Temperado, in Capão do Leão/RS, Brazil and lasted 46 days. Seventeen Jersey cows with 220 ± 32 days in milking, weighing $420 \pm 62,4$ kg and yielding $12 \pm 2,30$ kg/day were confined in a Free-Stall. The experiment comprehended two experimental periods of two weeks [experimental period 1 (E1) and 2 (E2)], each one preceded by periods of adaptation to the diets. During the adaptation period to E1 (experimental day 1 to 10) the animals were fed with basal diet, with not additives (Table 1). Thereafter E1 started (experimental day 11 to 24) with animals randomly distributed into three groups: Control group, with 5 animals and no additive inclusion in the diet; Bicarbonate group, with 6 cows receiving each 40 g of sodium bicarbonate (two doses of 20 g) in the diet per day; Citrate group, also with 6 cows, but receiving each 100 g of sodium citrate (two doses of 50 g) in the diet per day. From experimental day 25 to 31 (adaptation period to E2), basal diet was rearranged for the three groups (Table 1; NRC, 2001) and the inclusion of additives was interrupted. During E2 (experimental day 32 to 46) the additives were included in the same amounts and for the same groups, following the methodology used in E1. Dietary cation-anion difference (DCAD) is presented in Table 2.

Animals were fed twice a day, after morning and evening milking, and the additives were mixed with the concentrate in the moment of feeding procedures. In experimental days 24 and 46 animals were weighted and their body condition score was evaluated in a 1 to 5 scale (Wildman et al., 1982).

Table 1. Amount (kilogram of dry matter) of ingredients supplied in Experimental periods 1 (E1) and 2 (E2) and the diets' composition.

	Diet	
	E1	E2
Ingredients		
Sorghum Silage	8,38	5,74
Alfalfa Hay	1,32	2,99
Soybean (grain)	1,71	0,346
Corn (grain)	0,88	1,40
Wheat	-	2,99
Rice	1,82	-
Composition (g/kg DM)		
Crude Protein	150	140
Total Digestible Nutrients	675	670
Calcium	5,67	9,10
Phosphorus	5,45	4,11

Table 2. Dietary cation-anion difference (DCAD) from diets supplied to Control, Bicarbonate and Citrate groups in Experimental period 1 and 2 and the mean DCAD value between periods.

Periods	DCAD (mEq/100g of DM)		
	Control	Bicarbonate	Citrate
Experimental 1	32,46	35,83	40,81
Experimental 2	26,81	30,36	35,36
Mean	29,63	33,09	38,22

Individual milk production and milk samples were obtained during morning and evening milkings in experimental days 17 and 24 (E1) and 38 and 46 (E2). Samples were extracted from automatic collectors and remained under refrigeration (6 °C) for 12 hours. Thereafter individual sample from morning milking was mixed with the correspondent sample from that evening milking; the result was a composed sample per day of extraction and per cow, which was used for the further analysis.

Milk stability was performed by visualization of the formation of protein clots when 2 mL of milk were mixed with 2 mL of alcoholic solution with 72, 74, 76, 78 or 80° GL in a Petri dish. The results are presented as the lower concentration of ethanol capable of causing the clot formation. Milk acidity was determined by titration with 0.1 N NaOH solution and by potentiometry; density with the use of lactodensimeter corrected for milk temperature of 15 °C. Total solids (TS), fat, lactose and protein content of milk were obtained from milk samples collected in tubes with bronopol, which were sent to Embrapa Clima Temperado's laboratory and analyzed by infrared analyzer (Bentley 2000®, Bentley Instruments, EUA).

Somatic cell count was determined by flow cytometry (Somacount 300®, Bentley Instruments, EUA). Clinical mastitis was monitored at every milking with visual inspection of foremilk strips, subclinical mastitis at every fifteen days with Californian Mastitis Test.

Blood samples were collected on experimental days 11, 24, 32 and 46 via jugular puncture in 10 mL non-heparinized vacutainers. Sampling was performed after the morning milking and before feeding procedures. Samples were cooled on ice and taken to specialized laboratory in order to determine plasma levels of glucose and urea.

Urine samples were obtained by vulvar and perineal massage on experimental days 17, 24, 38 and 46, six hours after the feeding procedures. Urinary pH was measured by potentiometry immediately after sampling.

Given the nutritional similarity between diets supplied on E1 and E2, the results observed in both experimental periods were analyzed together. Animals were allocated in a completely randomized design; data obtained was submitted to analysis of variance, testing the diet effect (n=3). The program used was SAS (2001), procedures means and glm. The level of significance used was 0.05.

Results and Discussion

Inclusion of sodium bicarbonate and sodium citrate in the diet did not alter (P>0.05) body weight, body condition score, milk production and its composition and blood parameters (Table 3).

Table 3. Productivity attributes, milk composition and blood parameters from cows in Control, Bicarbonate and Citrate groups.

	Control	Bicarbonate	Citrate	P=F
Body weight (kg)	406.0	401.25	429.7	0.7212
Body condition score (1-5)	2.50	2.67	2.58	0.1258
Milk Production (L)	9.98	9.61	9.76	0.9792
Fat (g/100g)	5.73	5.57	6.15	0.1852
Protein (g/100g)	3.85	3.69	4.02	0.0590
Lactose (g/100g)	4.16	4.21	4.25	0.6646
Total Solids (g/100g)	15.06	14.73	15.82	0.0512
Density (g/L)	1030.32	1029.82	1029.95	0.7943
Urinary pH	7.93	8.05	8.21	0.3806
Plasma Urea (mg/dL)	35.41	34.25	33.67	0.8370
Plasma Glucose (mg/dL)	59.91	59.75	61.67	0.4896
Milk Stability [¶]	74.40	74.67	74.67	0.9805
Titrateable Acidity (°D)	17.90	17.00	16.16	0.1752
Milk pH	6.74	6.75	6.82	0.2914
Somatic Cell Count (cell/mL)	942,200.0	557,000.0	674,833.3	0.6838

[¶] Concentration of ethanol capable of causing coagulation of milk proteins

Urinary pH is usually basic – 7,4 to 8,4 – (Church, 1977) and serves as an indicator of the basic or acidic load eliminated via urine (Patience, 1991), which may also indicate animal's metabolic status, and monitors the DCAD (Jardon, 1995) and the efficiency of the anionic or cationic offered diet (Del Claro et al., 2005). The inclusion of additives was not sufficient to modify urinary pH and plasma concentrations of urea and glucose, indicating the null effect of 40g-dose sodium bicarbonate and 100g-dose sodium citrate over the metabolic status of the animals.

Productivity gains can be obtained with the manipulation of the net charge of the diet (Block, 1994), being the use of additives an efficient technique for this purpose. Apper-Bossard et al. (2006), working with high or low level of concentrate in the diet and manipulating the DCAD, did not verify alterations in the levels of plasma glucose, but they detected a slight reduction in the level of plasmatic urea when the DCAD was raised from +16.9 to +32.7 mEq/100g of DM (low concentrate) and from +15.6 to +30.6 mEq/100g of DM (high concentrate). Wildman et al. (2007) worked with different levels of protein and DCAD (+15 e +39 mEq/100g of DM) and they observed similar levels of glucose and urea in plasma.

This similarity in cows' metabolism among the three dietary groups explained the absence of alterations in the physical-chemical composition of milk, emphasizing the milk stability to the ethanol test, which was almost identical between groups. The lack of effects of the inclusion of additives might be due to its low dosage with consequent low increment in DCAD. Is important to emphasize that the objective of the present experiment was to test the doses already used by milk producers and alleged by the industry as efficient to improve milk stability, thus, the effects on DCAD were not calculated prior to the study.

Another probable reason for the absence of effect of treatments is the fact that ruminal environment was probably not disturbed, since the animals were fed with a diet with high FDN content (above 45%) and forage with particles size beyond 1 cm. Furthermore, food was supplied in the same quantities for all three groups, not allowing the increasing in voluntary intake due to the additives inclusion. Differences in dry matter intake were observed for cows fed diets with negative or high positive charges (DCAD of +50 mEq/100g of DM) compared with average positively charges diets, DCAD of +25 and +35 mEq/100g of DM (Tucker et al., 1988; Block, 1994; Chan et al., 2005). However, Kennelly et al. (1999), Khorasani & Kennelly (2001) and Doepel & Hayirli (2011) did not observed increased dry matter intake when 1,2 % of sodium bicarbonate was included in the diet of Holstein cows in early and late lactation, respectively.

Conclusion

The inclusion of sodium citrate and sodium bicarbonate in the commercialized doses does not improve milk stability in lactating cows without metabolic disorders.

References

- ABREU, A.S.; FISCHER, V.; KOLLING, G.J. et al. Estresse calórico induzido por privação de acesso à sombra em vacas hol. reduz a prod. leiteira e a estabilidade térmica do leite. In: CONFERENCIA INTERNACIONAL DE LECHE INESTABLE, 2., 2011, Colonia del Sacramento. **Anais...** Colonia del Sacramento, [2011]. (CD-ROM).
- APPER-BOSSARD, E.; PEYRAUD, J.L.; FAVERDIN, P. et al. Changing dietary cation-anion difference for dairy cows fed with two contrasting levels of concentrate in diets. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 2, p.749-760, 2006.
- BARROS, L; DENIS, N; GONZALEZ, A. et al. Prueba del alcohol en leche y relación con calcio iónico. **Revista Prácticas Veterinarias**, Florida, v. 9, p. 315-318, 1999.
- BARROS, L.C. Estabilidad de leche, fracciones proteicas y calcio iónico. In: CONFERENCIA INTERNACIONAL DE LECHE INESTABLE, 2., 2011, Colonia del Sacramento. **Anais...** Colonia del Sacramento, [2011]. (CD-ROM).
- BLOCK, E. 1994. Manipulation of Dietary Cation-Anion Difference on Nutritionally Related Production Diseases, Productivity, and Metabolic Responses of Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 5, p. 1437-1450, 1994.
- BOTARO, B.G.; LIMA, Y.V.R. DE; AQUINO, A.A. et al. Polimorfismo da beta-lactoglobulina não afeta as características físico-químicas e a estabilidade do leite bovino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 5, p. 747-753, 2007a.
- BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Censo Agropecuário 2006. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/brasil_2006/Brasil_censoagro2006.pdf Acesso em: fev. 2012.
- CHAN, P.S.; WEST, J.W.; BERNARD, J.K. et al. Effects of Dietary Cation-Anion Difference on Intake, Milk Yield, and Blood Components of the Early Lactation Cow. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 12, p. 4384-4392, 2005.
- CHURCH. D.C. Bases científicas para la nutrición y alimentación de los animales domésticos. Zaragoza: Editorial Acribia, 1977. 462p.
- CZERNIEWICZ, M., KIELCZEWSKA, K., KRUK, A. Comparison of some physicochemical properties of milk from holstein-friesian and Jersey cows. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, Tuwima, v. 15, n. 56, p. 61-64, 2006.
- DEL CLARO, G.R.; ZANETTI, M.A.; PAIVA, F.A. Influência do balanço cátion-aniónico da dieta no rúmen e no desempenho de ovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 5, p. 644-651, 2005.
- DOEPEL, L.; HAYIRLI, A. Exclusion of dietary sodium bicarbonate from a wheat-based diet: Effects on milk production and ruminal fermentation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, n. 1, p. 370-375, 2011.
- JARDON, P. W. Using urine pH to monitor anionic salt programs. **In the Compendium – Dairy Production Management**, v. 6, p.860-862, 1995.
- KENNELLY J.J.; ROBINSON, B.; KHORASANI, G.R. Influence of Carbohydrate Source and Buffer on Rumen Fermentation Characteristics, Milk Yield, and Milk Composition in Early-Lactation Holstein Cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 11, p. 2486-2496, 1999.
- KHORASANI, G.R.; KENNELLY, J.J. Influence of Carbohydrate Source and Buffer on Rumen Fermentation Characteristics, Milk Yield, and Milk Composition in Late-

- Lactation Holstein Cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 7, p. 1707-1716, 2001.
- KOLLING, G.J.; ZANELA, M.B.; STUMPF, M.T et al. instabilidade do leite de quartos mamários de vacas com mastite – resultados preliminares. In: CONFERENCIA INTERNACIONAL DE LECHE INESTABLE, 2., 2011, Colonia del Sacramento. **Anais...** Colonia del Sacramento, [2011]. (CD-ROM).
- MARQUES, L.T.; ZANELA, M.B.; RIBEIRO, M.E.R. et al. Ocorrência do leite instável ao álcool 76% e não ácido (lina) e efeito sobre os aspectos físico-químicos do leite. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 13, n. 1, p. 91-97, 2007.
- MARQUES, L.T.; FISCHER, V.; ZANELA, M.B. et al. Fornecimento de suplementos com diferentes níveis de energia e proteína para vacas Jersey e seus efeitos sobre a instabilidade do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 12, p. 2724-2730, 2010a.
- MARQUES, L.T. ; FISCHER, V.; ZANELA, M.B. et al. Suplementação de vacas holandesa em estádio avançado de lactação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 6, p.1392-1398, 2010b.
- MARQUES, L.T., FISCHER, V., ZANELA, M.B. et al. Produção leiteira, composição do leite e perfil bioquímico sanguíneo de vacas lactantes sob suplementação com sal aniônico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 40, n. 5, p. 1088-1094, 2011.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). Nutrient requirements of dairy cattle. 7. ed. National Academy Press, Washington, D.C., 2001. 381 p.
- 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.
- PATIENCE, J.F. Acid-base balance in animal nutrition. In: CONTINUING EDUCATION CONFERENCE, 1991, Coalinga, CA. **Anais...** Coalinga, 1991.
- PECORARI, M.; FOSSA, E.; AVANZINI, G. et al. Milk with abnormal coagulation: Acidity, chemical composition and observation on the metabolic profile of the cow. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia**, Parma, v. 35, n. 4, p. 263-278, 1984.
- PONCE P.C; 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. UFRGS, 2001. p.61-72.
- PONCE, P.C.; HERNÁNDEZ, R. Efecto de tres tipos de dieta sobre la aparición de transtornos metabólicos y su relación con alteraciones en la composición de la leche en vacas Holstein Friesian. **Zootecnia Tropical**, Maracay, v.23, n.3, p.295-310, 2005.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS - SAS. User's guide. Version 6.11 ed. Cary: SAS Institute, 2001. (CD-ROM).
- STUMPF, M.T.; FISCHER, V.; KOLLING, G.J. et al. Restrição alimentar e estabilidade do leite. In: CONFERENCIA INTERNACIONAL DE LECHE INESTABLE, 2., 2011, Colonia del Sacramento. **Anais...** Colonia del Sacramento, [2011]. (CD-ROM).
- TSIOULPAS, A.; GRANDISON, A.S.; LEWIS, M.J. Changes in physical properties of bovine milk from the colostrum period to early lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 11, p. 5012-5017, 2007.

- TUCKER, W.B.; HARRISON, G.A.; HEMKEN, R.W. Influence of dietary cation-anion balance on milk, blood, urine and rumen fluid in lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.346-354, 1988.
- WILDMAN, O.E.E.; JONES, G.M.; WAGNER, P.E. et al. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 65, n. 3, p. 495-501, 1982.
- WILDMAN, C.D.; WEST, J.W.; BERNARD, J.K. Effect of Dietary Cation-Anion Difference and Dietary Crude Protein on Milk Yield, Acid-Base Chemistry, and Rumen Fermentation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 10, p. 4693-4700, 2007.
- YOSHIDA, S. Studies in the Utrecht abnormality of milke in the Miyuki Dairy Farm. **Journal of the Faculty of Japanese Applied Biology Science Hiroshima University**, Hiroshima, v. 19, n. 1, p. 39- 54, 1980.
- ZANELA, M. B.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M.E.R. et al. Leite Instável Não Ácido e composição do leite de vacas Jersey sob restrição alimentar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 5, p. 835-840, 2006a.
- ZANELA, M. B.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M.E.R. et al. Indução e reversão do Leite Instável Não Ácido (LINA). In: CONGRESSO PAN-AMERICANO DE LEITE, 9., 2006, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: FEPALE, 2006b.
- ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R.; FISCHER, V. et al. Ocorrência do leite in: 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 III

**Severe feed restriction increases permeability of mammary gland cells
tight junctions and reduces ethanol stability of milk¹**

¹ Artigo enviado para o Journal of Dairy Research

Severe feed restriction increases permeability of mammary gland cell tight junctions and reduces ethanol stability of milk

Marcelo T Stumpf*: Doctorate student of the Post Graduation Program of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

Vivian Fischer: PhD Professor of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

Concepta M M Pimentel: PhD Professor of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

Giovani J Kolling: Doctorate student of the Post Graduation Program of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

Maira B Zanela: PhD Researcher of the Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

Carolina S dos Santos: Graduation student of Federal University of Pelotas (UFPel), Pelotas, Brazil

Alexandre S de Abreu: Doctorate student of the Post Graduation Program of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

Underfeeding, tight junctions and ethanol stability of milk

*for correspondence; e-mail: marcelostumpf2003@yahoo.com.br. Country: Brazil;

State: Rio Grande do Sul; City: Pelotas; Address: Avenida Dom Joaquim, 78.

Summary

Twelve lactating Jersey cows were used in a five week experiment to determine the effects of severe feed restriction on the permeability of mammary gland cell tight junctions (TJ) and its effects on milk stability to the alcohol test. During the first two weeks, cows were managed and fed together and received the same diet according to their nutritional requirements (full diet: 15 kg of sugar cane silage; 5.8 kg of alfalfa hay; 0.16 kg of mineral salt and 6.2 kg of concentrate). In the third week, animals were distributed into two groups of six cows each. One group received the full diet and the other a restricted diet (50% of the full diet). In the fourth and fifth weeks, all animals received the full diet. Milk composition and other attributes, such as titratable acidity, ethanol stability, pH, density and somatic cell count were evaluated. Cortisol levels indicated the stress condition of the cows. Plasma lactose and milk sodium were measured to assess mammary TJ leakiness. Principal factor analysis (PFA) showed that the first two principal factors (PF) contributed with 44.47% and 20.57% of the total variance in the experiment and, as feeding levels increased, milk stability to the ethanol test became higher and plasma lactose levels decreased, which indicates lower permeability of the mammary gland cell TJs. Correspondence analyses were consistent with PFA and also showed lower feeding levels were related to reduced milk stability, high plasma lactose, high sodium in milk, low milk lactose (another parameter used to assess TJ permeability) and higher cortisol levels, indicating the stress to which animals were submitted. All observations were grouped in three clusters, with the same above-mentioned patterns. Feeding restriction was associated with higher permeability of TJs, decreasing milk stability to the ethanol test.

The alcohol test may be used as a reliable indicator of raw milk stability for UHT and milk powder processing (Boumpa *et al.* 2008; Omoarukhe *et al.* 2010). Usually excessive acidity was considered the main factor leading to reduced stability, but since 40-50% of milk samples presenting acidity within acceptable values (pH: 6.6 to 6.8 or titratable acidity: 14 to 18°D) still precipitated to the alcohol test, other issues may be acting on stability (Oliveira *et al.* 2007; Marques *et al.* 2007; Zanela *et al.* 2009; Oliveira *et al.* 2011; Marx *et al.* 2011).

Ethanol stability is related to physical-chemical properties, such as pH, saline balance and divalent cation content (White & Davies, 1958; Horne & Parker, 1981*a, b*; Chavez *et al.* 2004). It has been reported that some factors decrease milk stability such as sudden changes in animals' diet, diets with high calcium content or containing mineral imbalances (Barros *et al.* 2001), underfeeding (Zanela *et al.* 2006; Marques *et al.* 2010), metabolic and ruminal acidosis (Hernández & Ponce, 2005; Marques *et al.* 2011). In underdeveloped countries, underfeeding is quite prevalent due to low resource input in animal production systems, with variable but often little use of irrigation, food conservation (silage or hay), soil correction and fertilization; and this might be a relevant cause of milk instability. However, trials performed to assess the relation between underfeeding and milk stability have not evaluated how this relation occurs.

In most of these countries, milk suitability for industrial processing is still performed with an alcohol test at farm and dairy industry platform level. Milk that precipitates in this test should not be transported to the industry (Brasil, 2002; 2011), impairing dairy competitiveness and sustainability.

Based on studies that evaluate the relation between stress and mammary gland physiology and histology, we hypothesize that severe feed restriction is a stressful factor that increases the permeability of the mammary tight junctions and decreases ethanol stability. Tight junctions (TJ) are structures located in the cell's apical domain, surrounding both endothelial and epithelial cells (Stelwagen *et al.* 1998a), with the so-called *fence* and *barrier* functions. They play an important role in maintaining cell-cell contact (Pitelka, 1978, cited by Zettl *et al.* 1992), separating its basolateral (interstitial fluid) and apical (alveolar lumen) sides (Schneeberger & Lynch, 1992) and controlling the paracellular movement of ions and small molecules between two fluid compartments (Stelwagen *et al.* 1998a). Tight junctions are impermeable when in perfect condition, not allowing the influx of components from blood into milk, and vice-versa (Stelwagen *et al.* 1998a). In spite of this, several factors, such as stress (Stelwagen *et al.* 2000), mammary involution at the end of lactation (Fleet & Peaker, 1978), longer milking intervals (Stelwagen *et al.* 1994; Castillo *et al.* 2008) and mastitis (Linzell & Peaker, 1972; Symons & Wright, 1974) can alter TJ impermeability. By changing this impermeability, the TJ's main characteristics are lost, altering milk basic composition, especially saline balance, which can eventually lead to modifications in milk stability.

Lacy-Hulbert *et al.* (1999) did not find increased TJ permeability after 50% feed restriction, but these authors used cows in an advanced milking stage (over 210 days in milking) and measured the effects over 25 days after the beginning of the restriction.

The present study was conducted in order to establish the relationships between severe feed restriction, TJ permeability and milk stability to the alcohol test with cows in the middle of the lactation.

Materials and Methods

Local description

The experiment was conducted at Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brazil, on 2011. Average daily temperature and relative humidity ranged from 19.8°C to 29.8°C and from 58.2% to 91.54%, respectively.

Animals and management

Twelve Jersey cows were housed during the five weeks of experiment. They received diets that met their nutritional demands (full diet, according to NRC, 2001) on weeks 1, 2, 4 and 5. During the third week they were allocated into two groups of six cows each: 1) full diet; 2) restricted diet: (experimental days 15 to 21) cows were fed 50% of previous feed levels. At the beginning of the third week, before feed restriction, cows in the full diet group showed 372.33 ± 33.47 kg body weight; 2.67 ± 0.13 body condition score (BCS); milk stability at alcohol 77 ± 4.85 % v/v; 145.2 ± 44.28 days in milking, 12.32 ± 2.50 l/day milk production and 3.2 ± 1.72 lactation periods. Cows in the restricted feed group showed an average body weight of 372.16 ± 39.13 kg; 2.71 ± 0.10 of BCS; milk stability at alcohol 75.2 ± 4.56 % v/v; 145.7 ± 39.22 days in milking; 12.08 ± 2.44 l/day milk production and 3.3 ± 1.50 lactation periods.

Full diet was composed of (per animal and per day) 15 kg sugar cane silage; 5.8 kg alfalfa hay; 0.16 kg mineral salt and 6.2 kg concentrate (3.3 kg soybean; 2.6 kg

corn; 240 g bicalcic phosphate and 14 g CaCO₃). Cows were fed twice a day, after the morning and evening milkings, and had free access to fresh water.

Body Weight and Body Condition Score

Body condition score was attributed on a 1-5 scale (Wildman *et al.* 1982), and cows were weighed on experimental days 1, 14, 21 and 35, immediately after morning milking but before being fed.

Milk collection and analysis

Cows were milked twice daily (at 07:00 and 16:30 h) in a 2 x 8 herring-bone milking parlour equipped with Westfalia milking units. Daily milk yield was recorded electronically. Milk was collected on days 14, 15, 17, 18, 21, 28 and 35 after the beginning of the experiment. A mixture of milk from morning and evening milkings from each cow composed the individual samples. Acidity was determined by titration with 0.1 N NaOH solution and by potentiometry; density was measured with the use of lactodensimeter corrected for milk temperature of 15 °C; ethanol stability checked by mixing 2 ml of milk and 2 ml of alcoholic solutions with ethanol concentration varying from 68% to 84% v/v in a Petri dish; results were expressed as the minimal ethanol concentration in the alcoholic solution that induced milk coagulation. To determine the permeability of mammary gland cell tight junctions, sodium in milk was measured by atomic absorption spectrophotometry from milk collected in 45ml Falcon tubes. Concentrations of fat, protein and lactose in milk were determined by an infrared analyzer (Bentley 2000® equipment) (Fonseca & Santos, 2000). Somatic cell count (SCC) was determined by flow cytometry with Somacount 300®.

Blood collection and plasma analysis

Blood samples were collected on days 14, 15, 17, 18, 21, 28 and 35 after the beginning of the trial via jugular puncture in 10 ml heparinized and non heparinized vacutainers. Sampling was performed after the morning milking and before feeding procedures. Blood samples were cooled on wet ice and centrifuged (Fanem, model 204NR) at 2,000 x g for 15 minutes. Plasma was aliquoted into 2.0 ml Eppendorf tubes and stored at -20°C until analysis.

The permeability of the TJ was determined using plasma from heparinized vacutainers to determine lactose using enzymatic assay (Lactose Assay Kit - BioVision Research Products, Mountain-CA) in a microplate reader (Bio-Tek Instruments, model EL808 Microplate Reader). To assess the stress level of the animals, plasma from non-heparinized vacutainers was analyzed for cortisol levels by chemiluminescence.

Statistical analysis

Individual cows were considered the experimental units and were allocated to one of two treatments (full amount of food or 50% restriction) in a completely randomized design. Data (84 observations for milk productions and composition, 48 observations for blood composition, body weight and body condition score) was analyzed with multivariate analyses using the statistic program SAS v. 9.2 (Cary, Indiana) including principal factor and cluster analysis, canonical discriminant analysis of clusters and multiple correspondence analysis. In this last analysis, the threshold values used to categorize each animal into the 'high or low' categories were: 0.52 µg/dl for cortisol; 150 for days in milking; 10 l per day for milk production; 4 g/100g, 3.46

g/100g, 4.4 g/100g and 493 ppm for milk fat, protein, lactose and sodium, respectively; 100.000 cell/ml for SCC; 230 μ M for plasma lactose; 72% ethanol for milk stability.

Results

Seven principal factors (PF) were identified and the first two explained 44.47 and 20.57%, respectively, of the total variance observed in the experiment. Considerations can be made through the analysis of the angle between vectors in the PF figure (Figure 1). Angles of 0° and 180° mean the correlations between variables are high, positive in the first case and negative in the second; 90° between variable vectors represents low or null correlations (Smith *et al.* 2002).

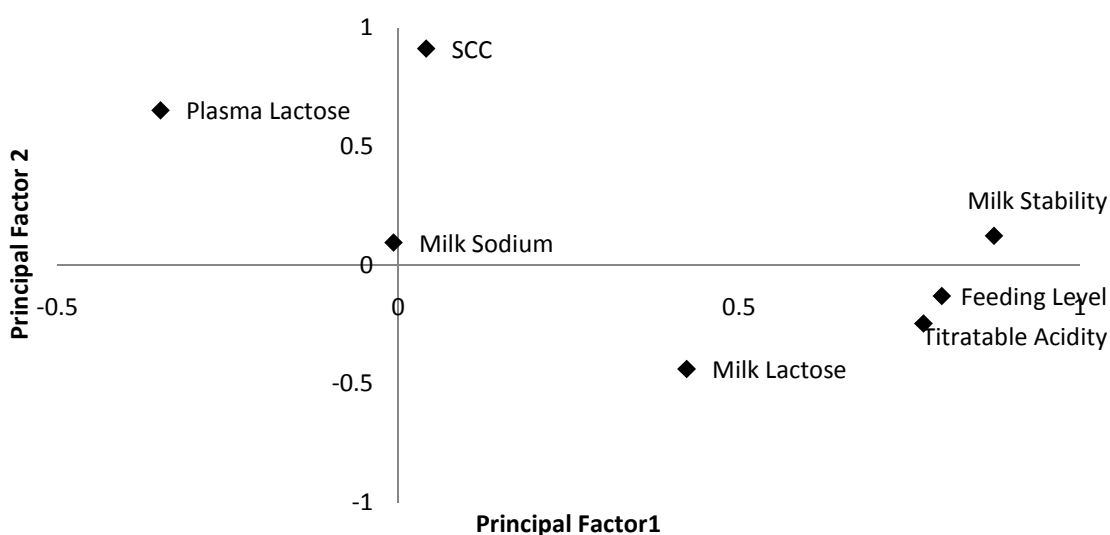


Figure 1. Variables projected in Principal Factors 1 and 2.

Feeding level presented highly positive correlation with milk stability and titratable acidity. Plasma lactose, on the other hand, showed negative correlation with feeding level, but positive with milk sodium. Milk lactose presented some positive correlation with feeding level and milk stability, as the angle between them is approximately 45° ; the angle of approximately 180° between milk lactose and plasma

lactose indicates their high negative correlation. Somatic cell count presented very low correlation with level of feeding and milk stability, high correlation with milk sodium and moderate correlation with plasma lactose.

Accordingly, in the multiple correspondence analyses, feeding restriction (G50) was associated with low ethanol stability (L_MS), milk lactose content below 4.4g/100g (L_ML), plasma lactose concentration above 230 μ M (H_PL), milk sodium higher than 493 ppm (H_MNa), SCC higher than 100,000 cell/ml (H_SCC) and cortisol levels beyond 0.52 μ g/dl (H_CO) (Figure 2, quadrants 1 and 2). A full diet (G100) was associated with high ethanol stability (H_MS), milk lactose content higher than 4.4g/100g (H_ML), milk sodium below 493 ppm (L_MNa) and plasma lactose concentration lower than 230 μ M (L_PL) (quadrants 3 and 4). Although less important, different correspondences can be made when analyzing quadrants 1 and 4; 2 and 3 together. Feeding level influenced a smaller number of animals in a distinctive way: feeding restriction (quadrants 1 and 4) was associated, besides high cortisol levels and low ethanol stability, with some cows presenting SCC below 100,000 cell/ml (L_SCC), low content of milk sodium and plasma lactose. Cows producing milk with high ethanol stability presented cortisol levels lower than 0.52 μ g/dl (L_CO), high plasma lactose, milk sodium and SCC (quadrants 2 and 3).

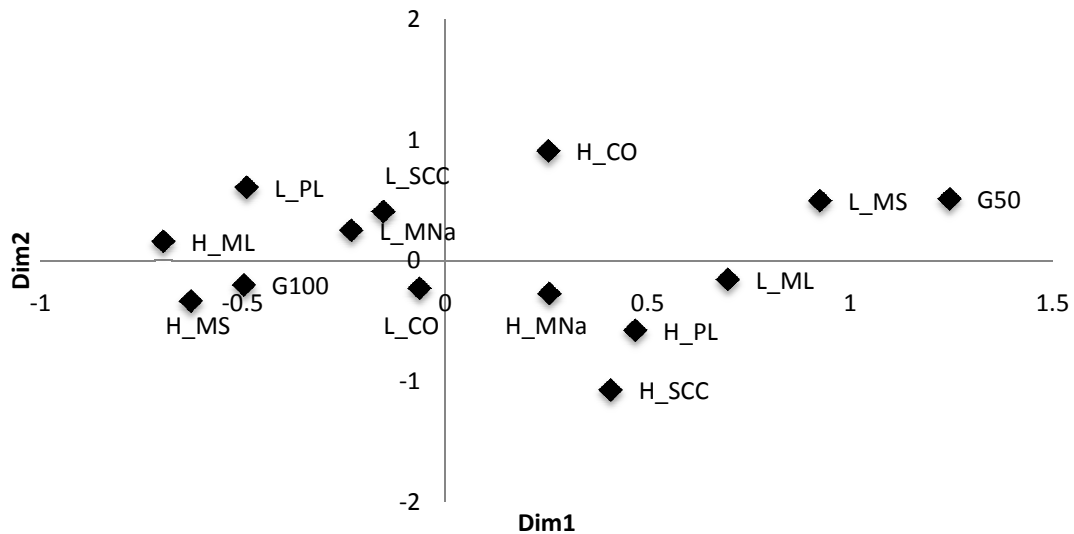


Figure 2. Correspondence graphic relating high (G100) or low feeding levels (G50) with high (H_MS) or low milk stability to the ethanol test (L_MS), high (H_SCC) or low somatic cell count (L_SCC), high (H_ML) or low lactose in milk (L_ML), high (H_MNa) or low sodium concentration (L_MNa), high (H_PL) or low plasma lactose (L_PL) and high (H_CO) or low cortisol levels (L_CO).

In Figure 3, there is an association between feed restriction G50, low milk lactose, milk protein above 3.46g/100g (H_MPr), milk fat content higher than 4g/100g (H_MF), daily milk production below 10 l (L_MP) and animals beyond 150 days in milking (H_DM) when analyzing quadrants 1 and 2. In quadrants 3 and 4 cows with less than 150 days in milking (L_DM), producing more than 10 l of milk per day (H_MP) were associated with high milk lactose, fat concentrations below 4g/100g (L_MF) and protein lower than 3.46g/100g (L_MPr). In quadrants 1 and 4 some cows submitted to the feeding restriction showed low concentrations of milk protein and lower number of days in milking and in quadrants 2 and 3 some cows receiving the full diet produced more than 10 l, presented higher values for milk protein and number of days in milking.

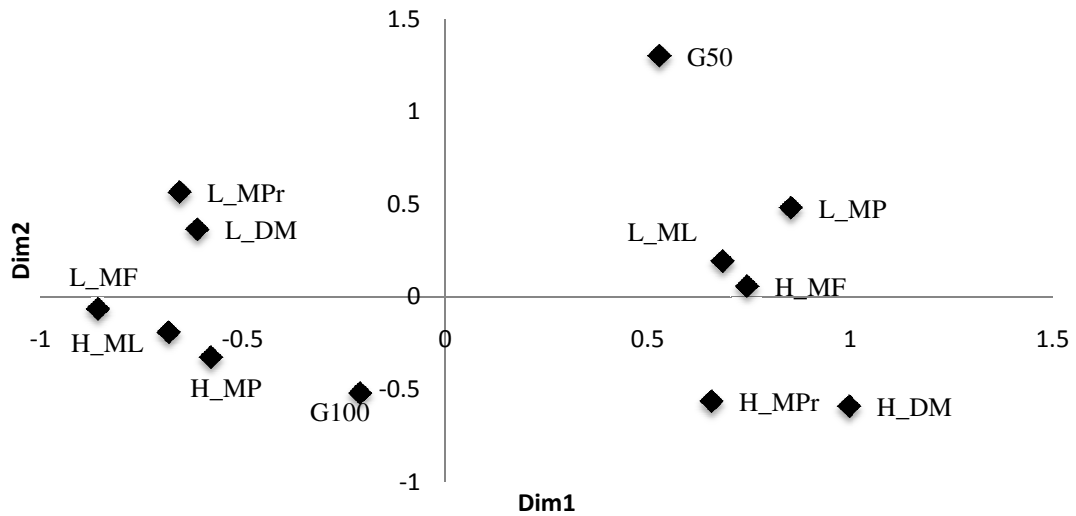


Figure 3. Correspondence graphic relating high (G100) or low feeding levels (G50) with high (H_MP) or low milk production (L_MP), high (H_ML) or low lactose in milk (L_ML), high (H_MF) or low milk fat (L_MF), high (H_MPr) or low milk protein (L_MPr) and high (H_DM) or low days in milking (L_DM).

Observations were grouped into three clusters with 17, 64 and 3 observations, respectively (Figure 4). All 84 observations were grouped with 100% accuracy. Attributes used for cluster discrimination were plasma lactose, stability to the alcohol test and milk pH.

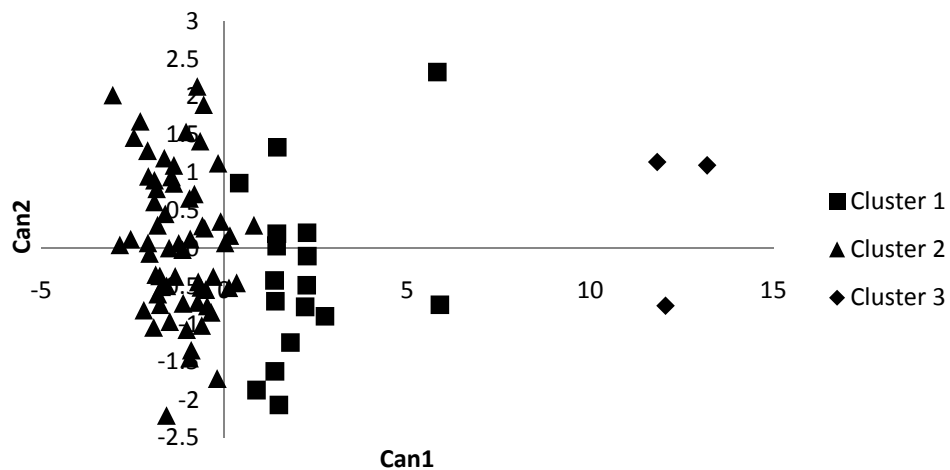


Figure 4. Plot of canonical variables identified by cluster.

Cluster 2 groups the results from animals fed the higher level of feeding, producing 11.53 l of milk per day, above what was produced by animals in Clusters 1 and 3 (Table 1). Mean values for milk stability to the ethanol test was 74.22 % v/v, also being the best results of all three clusters. Higher levels of milk lactose content were accompanied by the lower concentration in plasmatic lactose. Sodium in milk was the lowest between clusters. SCC stayed below what was observed in Cluster 1 and 3. Values for titratable acidity, even being the highest, were inside the normal range.

Table 1. Mean value for all variables in Clusters 1, 2 and 3 and significance levels.

Variable	Means			P=F
	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	
Feeding Level	79,41ab	89,06a	50,00b	0,0052
Days in Milking	163,82ab	146,04b	207,67a	0,0091
Milk Production (l)	10,09a	11,53a	6,03b	0,0013
Milk pH	6,70b	6,70b	6,82a	0,0006
Density (g/l)	1030,05	1030,39	1029,17	0,0514
Milk Fat (g/100g)	4,18	4,06	5,17	0,1072
Milk Protein (g/100g)	3,52	3,47	3,82	0,1268
Milk Lactose (g/100g)	4,27b	4,41a	3,73c	<0,0001
SCC† (cell/ml)	5,03a	4,57b	5,36a	<0,0001
Milk Sodium (ppm)	540,06b	516,14b	854,67a	0,0005
Milk Stability‡	71,76ab	74,22a	68,67b	0,0282
Titratable acidity (°D)	15,88	16,20	13,33	<0,0001
Plasma Lactose (µM)	328,23b	226,91c	639,63a	<0,0001
Cortisol (µg/dl)	0,65	0,58	0,32	0,5157

†SCC = somatic cell count; values in log₁₀ transformation

‡Concentration of ethanol capable of causing coagulation of milk proteins

Cluster 3, with only 3 observations, all from the same animal, was characterized by feed restriction. Mean milk production was the lowest, as were the values for milk stability to the ethanol test and cortisol. Concentration of fat and sodium in milk were the highest when comparing the three clusters, the same result being attributed to plasmatic lactose, which was followed by the lowest concentration in milk lactose in this group of animals. Titratable acidity was below the expected standards.

Cluster 1 can be considered as intermediary, as the majority of its values

were between those in Clusters 2 and 3.

Discussion

Multiple correspondence analysis relating feeding level to milk composition and volume (Figure 3) shows that underfeeding reduces milk production, which was followed by an increase in fat concentration. This might be due to a lower reduction rate in milk fat synthesis than that in milk production. However, reduction of body condition score from 2.7 to 2.5 following the 1-week feed restriction period (results not presented) might have also contributed to those higher values, as fat mobilized from adipose tissue could enter into the mammary gland, increasing its concentration in milk, as it was also noted by Marques *et al.* (2010). Cows submitted to a 50% restriction of dry matter intake showed increased milk fat content, due to a concentrating effect caused by lower milk volume (Lacy-Hulbert *et al.* 1999). On the other hand, Guinard-Flament *et al.* (2007) reported a trend for decrease in fat concentration in the milk from cows fed 30% restricted diets. In the present study, the concentration effect evidenced for milk fat occurred for protein content, as lower milk production was correlated with higher protein levels. On the contrary, Guinard-Flament *et al.* (2007) observed a decrease in total protein and casein in the milk of restricted-fed cows. According to those authors feed restriction may influence milk components as it lowers blood flow and mammary gland uptake of nutrients.

Principal factor analysis (Figure 1) and multiple correspondence analysis (Figure 2) consistently showed lower feeding levels associated with reduced milk stability, increased plasma lactose and milk sodium contents. The association between feed restriction and milk stability has already been reported by Sobhani *et al.* (1998), Okada *et al.* (2001), Zanela *et al.* (2006) and Marques *et al.* (2010). On the other

hand, reduced stability is reversed by further increase in food supply (Zanela *et al.* 2006). It is worth pointing out that cows showed differences in lag time to decrease milk stability as feeding restriction advanced; the same observation can be made for time needed to stability recovery after resumption of the diet (results not presented).

The elevation of plasma lactose is a reliable indicator of the increased permeability of mammary gland cell TJs according to Stelwagen *et al.* (1997, 2000). Since lactose is produced essentially in the mammary gland (Kuhn & Linzell, 1970) and is not secreted basolaterally (Stelwagen *et al.* 1998b), any trace of this carbohydrate in the blood suggests its outflow from milk into the blood stream, due increased TJ permeability.

Another parameter used to assess the permeability of mammary gland cell tight junctions is the elevation in the concentration of milk sodium. Castillo *et al.* (2008) reported a positive relationship between long periods of accumulation of milk in the udder and increased TJ permeability, established, among other factors, by elevated milk Na⁺ concentrations. Linzell & Peaker (1974) encountered a reduction in sodium levels in milk accompanying physiological changes from late pregnancy (leaky TJ) to lactation in goats (tight TJ). Working with cows from days one to 90 after calving, Tsioulpas *et al.* (2007) registered a gradual decrease in sodium concentration of milk, with high levels on day one (leaky TJ), decreasing thereafter (TJ closure).

Therefore, our results supported the hypothesis that feed restriction transiently increases the permeability of the epithelial mammary gland cell tight junctions, with a consequent reduction in the stability of milk. Although plasma lactose baseline levels were restored rapidly, milk stability and yield were sustained depressed,

paralleling the results reported by Stelwagen *et al.* (1994) for plasma lactose and milk yield.

The present experimental results are apparently not in agreement with those presented by Lacy-Hulbert *et al.* (1999), who did not find differences in TJ permeability (evaluated with plasmatic lactose) when feeding restriction was imposed to cows in an advanced milking stage (over 210 days in milking). These authors measured plasma lactose and other attributes only at the end of the trial, 25 days after the beginning of the restriction, so the dynamic and transient response of TJs (Stelwagen *et al.* 1994) might be responsible for the absence of difference in TJs permeability in that experiment.

The tight junction's change to a leaky state might be linked initially to a stress condition (underfeeding), as attested by the existence of some correspondence between G50 and higher plasmatic cortisol levels, which tend to be elevated in stressed animals (Verkerk *et al.* 1998). Stelwagen *et al.* (2000) found pronounced TJ leakiness in cows after provoking social isolation stress, and high stress-responsive cows tended to present higher plasma lactose and cortisol levels.

Although in the present study most of the animals presented low values for SCC (85% of milk samples stayed below 200.000 cell/ml) it is worth noticing that cows under feed restriction presented an increase in SCC from baseline 70,000 to 208,500 cell/ml at the end of restriction period, lowering down to 120,000 cell/ml two weeks later, while animals full fed maintained SCC around 70,0000 cell/ml. Lacy-Hulbert *et al.* (1999) also reported increased SCC values after feed restriction. Therefore, other mechanisms besides enhanced TJ permeability are probably related to decreased milk stability.

Relations between milk stability to the ethanol test and milk composition are hard to confirm, but the reduction of lactose in samples presenting lower stability to the test is frequently reported (Barros, 2001; Chavez *et al.* 2004; Oliveira & Timm, 2006; Tsioulpas *et al.* 2007; Roma Jr., 2008). In contradiction, Barchiesi-Ferrari *et al.* (2007) reported similar concentrations of lactose in milk when comparing different percentages of milk instability (ethanol at 76% v/v). Since the reduction in the levels of lactose in milk – due its outflow from milk to blood – can be, together with plasma lactose, used to establish the higher permeability state of TJ, and Figure 2 showed correspondence between low milk stability and reduced milk lactose levels, TJ opening might be one of the explanations for the reduction in milk lactose content in cows producing milk with reduced ethanol stability.

Hence, since feeding restriction was associated with lower milk stability to the ethanol test, higher sodium in milk, plasma lactose levels and lower milk lactose content, a relation between higher TJ permeability and lower milk stability to the ethanol test, which is the main proposition of this experiment, could be sustained.

Other experimental evidence shows similarities between periods of high TJ permeability and periods of increased milk instability. Negri (2002) and Chavez *et al.* (2004) found increased concentration of sodium in unstable milk samples. Linzell & Peaker (1971), working with goats, experimentally proved that pregnant animals present permeable TJ. This is the period (last 10 or 7 days of pregnancy) when colostrum is produced, which presents low stability to the ethanol test (White & Davies, 1958). In early lactation cows, when milk stability is low (Mitamura, 1937; Tsioulpas *et al.* 2007), TJs are still 'leaky' (Linzell & Peaker, 1974). As lactation progresses, the TJs

become more impermeable (Nguyen *et al.* 2001) and milk starts to show higher stability (White & Davies, 1958, Tsioulpas *et al.* 2007).

The animal responsible for the three observations in Cluster 3 responded to the feeding restriction as expected: feeding restriction caused increased permeability of tight junctions – elevated plasma lactose and sodium in milk - with consequent reduction in the stability of milk. Nevertheless, the values found in this cluster will not be used in this discussion, which is based in comparing clusters 1 and 2.

Analyzing these clusters, the lower feeding level was followed by decreased milk stability and increased tight junctions' permeability - plasma lactose levels and sodium in milk were higher in Cluster 1. Milk lactose concentration, on the other hand, presented the opposite pattern, increasing together with stability. Elevated somatic cell count and mastitis may increase TJ permeability (Leitner *et al.* 2004; Moussaoui *et al.* 2004), but this did not seem to be the case in Cluster 1, since the mean value of SCC was low (approximately 100.000 cell/ml), indicating that feeding level was probably the main factor responsible for the findings.

Conclusions

Feed restriction stresses cows and increases mammary gland cell tight junction permeability, leading to the reduction in the stability of milk to the ethanol test.

The study was approved by ethical committee of the Federal University of Rio Grande do Sul, supported with CNPq grant and it was performed with the collaboration of Embrapa Clima Temperado and its employees.

References

- Barchiesi-Ferrari CG, Williams-Salinas PA & Salvo-Garrido SI** 2007 [Milk instability associated with milk composition and seasonal lactation in grazing dairy cows]. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **42** 1785-1791
- Barros L** 2001 Transtornos metabólicos que afetam a qualidade do leite In *Uso do Leite Para Monitorar a Nutrição e Metabolismo de Vacas Leiteiras*, pp.44-57 (Ed. FDH González, JW Dürr, RS Fontanelli). UFRGS : Brazil
- Boumpa T, Tsioulpas A, Grandison AS & Lewis MJ** 2008 Effects of phosphates and citrates on sediment formation in UHT goats' milk. *Journal of Dairy Research* **75** 160-166
- Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento** 2002 Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite (Instrução Normativa nº 51). Brasília
- Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento** 2011 Alteração do caput da Instrução Normativa MAPA n. 51, de 18 de setembro de 2002 (Instrução Normativa nº62). Brasília
- Castillo V, Such X, Caja G, Casals R, Albanell E & Salama AA** 2008 Effect of milking interval on milk secretion and mammary tight junction permeability in dairy ewes. *Journal of Dairy Science* **91** 2610-2619
- Chavez MS, Negri LM & Cuatrín A** 2004 Bovine milk composition parameters affecting the ethanol stability. *Journal of Dairy Research* **71** 2001-2006
- Fleet IR & Peaker M** 1978 Mammary function and its control at the cessation of lactation in the goat. *Journal of Physiology* **279** 491-507
- Fonseca LFLda, Santos MVdos** 2000 Qualidade do leite e controle da mastite, 175p

(Lemos Editorial), São Paulo, Brazil

- Guinard-Flament J, Delamaire E, Lambertson P & Peyraud JL** 2007 Adaptations of Mammary Uptake and Nutrient Use to Once-Daily Milking and Feed Restriction in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* **90** 5062-5072
- Hernández R & Ponce PC** 2005 [Effect of three diet types on the appearance of metabolic dysfunctions and their relationship with alterations in milk composition of Holstein Friesian cows]. *Zootecnia Tropical* **23** 295-310
- Horne DS & Parker TG** 1981a Factors affecting the ethanol stability of bovine milk: Effect of serum phase components. *Journal of Dairy Research* **48** 273-284
- Horne DS & Parker TG** 1981b Factors Affecting the Ethanol Stability of Bovine Milk: The origin of the pH transition. *Journal of Dairy Research* **48** 285-291
- 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 of Dairy Research* **37** 203-208
- 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
- Leitner G, Chaffer M, Shamay A, Shapiro F, Merin U, Ezra E, Saran A, Silanikove N** 2004 Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in sheep. *Journal of Dairy Science* **87** 46-52
- Linzell JL & Peaker M** 1971 The permeability of mammary ducts. *Journal of Physiology* **216** 701-716

- Linzell JL & Peaker M** 1972 Day-to-day variations in milk composition in the goat and cow as a guide to the detection of subclinical mastitis. *British Veterinary Journal* **128** 284-295
- Linzell JL & Peaker M** 1974 Changes in colostrum composition and in the permeability of the mammary epithelium at about the time of parturition in the goat. *Journal of Physiology* **243** 129-151
- Marques LT, Zanela MB, Ribeiro MER, Stumpf Jr W & Fischer V** 2007 [Occurrence of unstable to alcohol 76% and non-acid milk (lina) and influence on physical-chemical aspects of milk]. *Revista Brasileira de Agrociência*. **13** 91-97
- Marques LT, Fischer V, Zanela MB, Ribeiro MER, Stumpf Jr W & Manzke N** 2010 [Supply of supplements with different levels of energy and protein to Jersey cows and their effects on milk instability]. *Brazilian Journal of Animal Science* **39** 2724-2730
- Marques LT, Fischer V, Zanela MB, Ribeiro MER, Stumpf Jr W & Rodrigues, C.M** 2011 [Milk yield, milk composition and biochemical blood profile of lactating cows supplemented with anionic salt]. *Brazilian Journal of Animal Science* **40** 1088-1094
- Marx IG, Lazzaroto TC, Drunkler DA, Colla E** 2011 [Occurrence of Non-acid Unstable Milk in west region of Parana] *Revista Ciências Exatas e Naturais* **13** 1-10
- Mitamura K** 1937 Studies on the alcohol coagulation of fresh cow milk. *Journal of the Faculty of Agriculture Hokkaido University* **41** 97-362

- Moussaoui F, Vangroenweghe F, Haddadi K, Le Roux Y, Laurent F, Duchateau L, Burvenich C** 2004 Proteolysis in milk during experimental *Escherichia coli* mastitis. *Journal of Dairy Science* **87** 2923-2931
- National Research Council** 2001 Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition. Nutrient requirements of dairy cattle. 381p, Washington, DC : National Academy Press
- Negri LM** 2002 Estudio de los factores físico químicos de La leche cruda que inciden sobre la estabilidad térmica. Master thesis, Litoral National University, Santa Fe, Argentina
- Nguyen D-A, Parlow AF & Neville MC** 2001 Hormonal regulation of tight junction closure in the mouse mammary epithelium during the transition from pregnancy to lactation. *Journal of Endocrinology* **170** 347-356
- Okada K, Shiga A, Fukaya A, Sagawa K, Nakamoto T, Togawa A, Furukawa T, Hirata T, Shiroto A & Naito Y** 2001 Changes in quantity, components and properties of postpartum milk in Japanese black cows. *Journal of Japanese Veterinary Association* **54** 185-190
- Oliveira DS & Timm CD** 2006 [Composition of milk with casein instability]. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **26** 259-263
- Oliveira DS, Moraes CM, Roos TB, Bermudes RF, Timm CD** 2007 [Occurrence of milk with casein instability in Santa Vitória do Palmar, RS] *Revista Brasileira Ciências Veterinárias* **14** 101-104
- Oliveira CAF, Lopes LC, Franco RC, Corassin CH** 2011 [Composition and physical-chemical characteristics of unstable non-acid milk received in a dairy plant of the State of São Paulo, Brazil] *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* **12** 508-515

- Omoarukhe ED, On-Nom N, Grandison AS & Lewis MJ** 2010 Effects of different calcium salts on properties of milk related to heat stability. *International Journal of Dairy Technology* **63** 504-511
- Roma JR LC** 2008 Características quantitativas e qualitativas da proteína do leite produzido na região Sudeste. PhD thesis, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brazil
- SAS Institute Inc., SAS® 9.22008** *Qualification Tools User's Guide*, Cary, NC: SAS Institute Inc
- Schneeberger EE& Lynch RD** 1992 Structure, function and regulations of cellular tight junctions. *American Journal of Physiology* **262** 647-661
- Smith RR, Moreira LVH & Latrille LL** 2002 [Characterization of dairy productive systems in the Tenth Region of Chile using multivariate analysis]. *Agricultura Técnica* **62** 35-395
- Sobhani S, Valizadeh R & Naserian A** 1998 Alcohol stability of milk and its relation to milk and blood composition in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* **85** 58
- Stelwagen K, Davis SR, Farr VC & Eichler SJ** 1994. Effect of once daily milking and concurrent somatotropin on mammary tight junction permeability and yield of cows. *Journal of Dairy Science* **77** 2994-3001
- Stelwagen K, Farr VC, McFadden HA, Prosser CG & Davis SR** 1997 Time course of milk accumulation-induced opening of mammary tight junctions and blood clearance of milk components. *American Journal of Physiology* **273** 379-386

- Stelwagen K, Van Espen DC, Verkerk GA, McFadden HA & Farr VC 1998a**
Elevated plasma cortisol reduces permeability of mammary tight junctions in the lactating bovine mammary epithelium. *Journal of Endocrinology* **159** 173-178
- Stelwagen K, McLaren RD, Turner SA, McFadden HA & Prosser CG 1998b** No evidence for basolateral milk protein secretion in the lactating goat mammary gland. *Journal of Dairy Science* **80** 434-437
- Stelwagen K, Hopstert H, Van Der Werf JTN & Blokhuis HJ 2000** Short communication: effects of isolation stress on mammary tight junctions in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* **83** 48-51
- Symons DB & Wright LJ 1974** Changes in bovine mammary gland permeability after intramammary exotoxin infusion. *Journal of Comparative Pathology* **84** 9-17
- Tsioulpas A, Grandison AS & Lewis MJ 2007** Changes in physical properties of bovine milk from the colostrum period to early lactation. *Journal of Dairy Science* **90**, 5012-5017
- Verkerk GA, Phipps AM, Carragher JF, Matthews LR & Stelwagen, K 1998** Characterization of milk cortisol concentrations as a measure of short-term stress responses in lactating dairy cows. *Journal of Animal Welfare* **7** 77-86
- White JCD & Davies DT 1958** The relation between the chemical composition of milk and the stability of the caseinate complex: II. Coagulation by ethanol. *Journal of Dairy Research* **25** 255-266
- Wildman EE, Jones GM, Wagner PE, Boman RL, Troutt Jr. HF & Lesch T N 1982** A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *Journal of Dairy Science* **65** 495-501

- Zanela MB, Fischer V & Ribeiro MER** 2006 [Unstable nonacid milk and milk composition of Jersey cows on feed restriction]. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **41** 835-840
- Zanela MB, Ribeiro MER & Fischer V** 2009 [Occurrence of unstable non-acid milk in the Northwest of Rio Grande do Sul]. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* **61** 1009-1013
- Zettl KS, Sjaastad MD, Riskin PM, Parry G, Machen TE & Firestone, GL** 1992 Glucocorticoid-induced formation of tight junctions in mouse mammary epithelial cell *in vitro*. *Proceedings National Academy of Sciences of the United States of America* **88** 9069-9073

CAPÍTULO IV

4.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização da parte prática dos trabalhos experimentais é essencial para que se obtenha uma nova compreensão sobre o fenômeno LINA. A partir da convivência com os animais se percebe a grande quantidade de fatores que podem influenciar a estabilidade do leite ao teste do álcool e a facilidade com a qual o leite, uma vez com alta estabilidade, pode passar a apresentar baixa estabilidade.

Chamou a atenção um caso em particular, em que foi perceptível redução brusca na estabilidade do leite, de 78% de etanol necessário para promover coagulação da amostra para 68% v/v, em questão de um dia. Percebeu-se, posteriormente, a presença de míiase neste animal, o qual demonstrava visível desconforto. A observação de casos semelhantes a esse pode servir como mostra de que o monitoramento constante da estabilidade do leite pode vir a servir como uma ferramenta para o acompanhamento da condição dos animais no rebanho. Reduções repentinas na estabilidade do leite podem alertar o produtor de que algum tipo de mal pode estar acometendo o animal.

Foram observados casos, em ambos os experimentos, em que a estabilidade láctea se manteve praticamente constante e em níveis muito baixos, independente do aporte de alimentos ao animal e do manejo realizado. Esta constatação demonstra a possível influência de fatores genéticos sobre esse parâmetro e a incapacidade do produtor em mudar essa característica do leite nesses casos. Estes exemplos de instabilidade do leite em animais bem

alimentados e manejados apenas reforçam a ideia de que o descarte do produto em decorrência da positividade no teste aplicado na propriedade pode ser muito injusto com o produtor, principalmente se o leite produzido provém de uma ordenha com qualidade sanitária adequada e com um correto acondicionamento da matéria prima.

Novos experimentos estudando a estabilidade do leite de progênes de vacas com constante baixa estabilidade podem trazer à tona novas ideias sobre a possibilidade de caracteres genéticos realmente influenciarem a ocorrência de LINA e ser essa característica transferível às novas gerações.

Com o estabelecimento da relação entre estresse induzido por restrição alimentar e aumento da permeabilidade das junções firmes e da incidência de LINA, abrem-se portas para a realização de novos projetos envolvendo esse parâmetro e outros tipos de indutores de estresse, como manejo aversivo, restrição ao acesso à água, estresse por frio, privação a sombra. Este último indutor já sendo estudado em experimento atestando a influência do estresse calórico sobre o aumento do número de casos de LINA, porém, sem que tenha sido mensurada a permeabilidade das TJ.

4.2. CONCLUSÕES GERAIS

◆ A adição de bicarbonato de sódio e citrato de sódio nos níveis estudados não reduz a incidência de casos de LINA;

◆ Restrição alimentar severa aumenta a permeabilidade das *tight junctions* das células epiteliais da glândula mamária, o que, por sua vez, altera as propriedades físico-químicas do leite e reduz a sua estabilidade.

4.3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A.S. **Leite instável não ácido e propriedades físico-químicas do leite de vacas Jersey**. 2008. 97f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

BARROS, L. et al. Ionized calcium related to alcohol test in milk. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PRODUCTION DISEASES IN FARM ANIMALS, 10., 1998, Utrecht. **Anais...Utrecht**, 1998.

BARROS, L. et al. Prueba del alcohol en leche y relación con calcio iónico. **Revista Prácticas Veterinarias**, Florida, v. 9, p. 315-318, 1999.

BARROS, L. et al. Variaciones de la leche y prueba del alcohol. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 21., 2000, Punta del Este. **Anais...Punta del Este**, 2000. p. 577.

BARROS, L. Transtornos metabólicos que afetam a qualidade do leite. In: 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. da UFRGS, 2001. p. 46-60.

CASTILLO, V. et al. Effect of milking interval on milk secretion and mammary tight junction permeability in dairy ewes. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.91, n.7, p. 2610-2619, 2008.

CAPUCO, A. V.; AKERS, R. M. Mammary involution in dairy animals. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, New York, v.4, n.2, p.137-144, 1999.

CHAVEZ, M. S. et al. Bovine milks composition parameters affecting the ethanol stability. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 71, p. 201-206, 2004.

DAVIS, S.R.; FARR, V.C.; STELWAGEN, K. Regulation of yield loss and milk composition during once-daily milking: A review. **Livestock Production Science**, Philadelphia, v. 59, n.1, p. 77-94, 1999.

DELAMAIRE, E.; GUINARD-FLAMENT, J. Longer milking intervals alter mammary epithelial permeability and the udder's ability to extract nutrients. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.89, n.6, p. 2007-2016, 2006.

DEMAN, J.M.; BATRA, S.C. Effect of certain salts on the stability of skim milk as determined by rennet coagulation time and alcohol test. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 47, n. 9, p. 954-957, 1964.

DONATELE, D. M. et al. Estudo da relação da prova do álcool 72% (v/v) com pH, grau Dornic e contagem de células somáticas do leite de vacas do município de Campos do Goytacazes, RJ. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA – CONBRAVET, 28., 2001, Brasília, **Anais**...Brasília, 2001.

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. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 110, p. 95-100, 2003.

FLEET, I.R.; PEAKER, M. Mammary function and its control at the cessation of lactation in the goat. **Journal of Physiology**, London, v. 279, p. 491-507, 1978.

FROS, A. et al. Evaluación de la termoestabilidad de leche caprina mediante prueba de alcohol en un rebaño de la raza saanen, ubicado en un establecimiento en la zona rural de Montevideo. In: CONFERENCIA INTERNACIONAL DE LECHE INESTABLE, 2., 2011, Colonia del Sacramento. **Anais**...Colonia del Sacramento, 2011.

FROST, A.J.; BROOKER, B.E.; HILL, A.W. The effect of *Escherichia coli* endotoxin and culture filtrate on the lactating bovine mammary gland. **Australian Veterinary Journal**, Victoria, v. 61, n. 3, p. 77-82, 1984.

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**, Champaign, v. 89, n. 5, p.1604-1612, 2006.

HOLT, C. Structure and stability of bovine casein micelles. **Advances in Protein Chemistry**, New York, v. 43, p. 63–151, 1992.

HORNE, D.S.; MUIR, D.D. Alcohol and heat stability of milk protein. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, n. 12, p. 3613-3626, 1990.

HORNE, D.S.; PARKER, T.G. Factors affecting the ethanol stability of bovine milkIV. Effect of fore warming. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 48, n. 3, p.405-415, 1981a.

HORNE, D.S.; PARKER, T.G. Factors affecting the ethanol stability of bovine milk. II The origin of the pH transition. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.48, n. 2, p. 285-291, 1981b.

KAUZMANN, W. Some factors in the interpretation of protein denaturation. **Advances in Protein Chemistry**, New York, v. 14, p. 1–63, 1959.

KOLLING, G.J. et al. Instabilidade do leite de quartos mamários de vacas com mastite – resultados preliminares. In: CONFERENCIA INTERNACIONAL DE LECHE INESTABLE, 2., 2011, Colonia del Sacramento. **Anais...** Colonia del Sacramento, 2011.

KUHN, N.; LINZELL, J.L. Measurement of the quantity of lactose passing into the mammary venous plasma and lymph in goats and in a cow. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 37, n. 2, p. 203-208, 1970.

LEITNER, G. et al. Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in sheep. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 1, p. 46-52, 2004.

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

LINZELL, J. L.; PEAKER, M. Day-to-day variations in milk composition in the goat and cow as a guide to the detection of subclinical mastitis. **British Veterinary Journal**, London, v. 128, n. 6, p. 284-295, 1972.

LINZELL, J.L.; PEAKER, M. Changes in mammary gland permeability at the onset of lactation in the goat: An effect on tight junctions? **Journal of Physiology**, London, v. 230, p. 13-14, 1973.

LINZELL, J.L.; PEAKER, M. Changes in colostrum composition and in the permeability of the mammary epithelium at about the time of parturition in the goat. **Journal of Physiology**, London, v. 243, p. 129-151, 1974.

LINZELL, J. L.; PEAKER, M.; TAYLOR, J. C. The effects of prolactin and oxytocin on milk secretion and on the permeability of the mammary epithelium in the rabbit. **Journal of Physiology**, London, v. 253, p. 547-563, 1975.

MACHADO, S.C. **Fatores que afetam a estabilidade do leite bovino**. 2010. 191f. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

MARQUES, L.T. **Ocorrência do leite instável não ácido (LINA) e seu efeito sobre a composição química e aspectos físicos**. 2004. 68f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.

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

MARQUES, L.T. **Alteração da instabilidade do leite bovino pelo fornecimento de diferentes dietas**. 2008. 91f. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.

MIKHEEVA, L. M. et al. Thermodynamics of micellization of bovine β -casein studied by high-sensitivity differential scanning calorimetry. **Langmuir**, Washington, v. 19, n. 7, p. 2913-2921, 2003.

MILLAR, I. D. et al. Mammary protein synthesis is acutely regulated by the cellular hydration state. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 230, n. 2, p. 351-355, 1997.

MITAMURA, K. Studies on the alcohol coagulation of fresh cow milk. **Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University**, Sapporo, v. 41, p. 104-362, 1937.

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

MORRISEY, P.A. The heat stability of milk as affected by variation in pH and milk salts. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 36, n. 3, p. 343-351, 1969.

MOUSSAOUI, F. et al. Proteolysis in milk during experimental *Escherichia coli* mastitis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 9, p. 2923-2931, 2004.

MUNGATANA, N. K. et al. Effect of experimental *Staphylococcus aureus* mastitis on compositional quality of goat milk. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 64, n. 3, p. 360-364, 2011.

NEGRI, L. et al. **Factores que afectan la estabilidad térmica y la prueba de alcohol en leche cruda de calidad higiénica adecuada**. Rafaela: INTA EEA, INTI CITIL, 2001. Informe técnico final del proyecto.

NEGRI, L. et al. Aptitud de la prueba del alcohol para predecir la estabilidad térmica de la leche cruda, In: CONGRESO ARGENTINO DE PRODUCCIÓN ANIMAL, 25., 2002, Buenos Aires. **Anais...** Buenos Aires: INTA, 2002. p. 13.

NEVILLE, M. C. Determinants of milk volume and composition. A. Lactogenesis in women: a cascade of events revealed by milk composition. In: JENSEN, R.G. **Handbook of milk composition**. San Diego: Academic Press, 1995. p. 87-98.

NGUYEN, D.D.; NEVILLE, M.C. Tight Junction regulation in the mammary gland. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, Nova Iorque, v. 3, n. 3, p. 233-246, 1998.

OLIVEIRA, D. S.; TIMM, C. D. Composição do leite com instabilidade da caseína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 259-263, 2006.

OLIVEIRA, D. S. et al. Ocorrência de leite com instabilidade da caseína em Santa Vitória do Palmar, RS. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, Niterói, v. 14, n. 2, p. 101-104, 2007.

OLIVEIRA, J. S. **Composição Química, Propriedades Físico-química e qualidades microbiológicas do leite de búfalas criadas na região sudoeste da Bahia**. 2009. 61f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2009.

PEAKER, M. Mechanism of milk secretion: milk composition in relation to potential difference across the mammary epithelium. **Journal of Physiology**, v. 270, p. 489-505, 1977.

PECORARI, M. et al. Milk with abnormal coagulation: Acidity, chemical composition and observation on the metabolic profile of the cow. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia**, Parma, v. 35, n. 4, p. 263-278, 1984.

PONCE, P. C.; 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, 2001. p.61-72.

RIEGEL, R.E. **Bioquímica**. 3. ed. São Leopoldo: Universidade do Vale do Rio dos Sinos, 2001. 547p.

ROSE, D. Relation between micellar and serum casein in bovine milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 51, n. 12, p. 1897-1923, 1968.

ROZKOV, A. **Control of proteolysis of recombinant proteins in *Escherichia coli***. 2001. 54f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Department of Biotechnology, Royal Institute of Technology, Universidade de Estocolmo, Estocolmo, 2001.

SCHNEEBERGER, E.E.; LYNCH, R.D. Structure, function and regulations of cellular tight junctions. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 262, n.6, p. 647-661, 1992.

SGARBIERI, V.C. Revisão: propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 8, n. 1, p. 43-56, 2005.

SHAMAY, A. et al. Infusions of Casein Hydrolyzates into the Mammary Gland Disrupt Tight Junction Integrity and Induce Involution in Cows. **Journal of Dairy Science, Champaign**, v. 86, n. 4, p. 1250-1258, 2003.

SILVA, S. P. et al. Acidez titulável e teste do álcool no leite caprino em função do tempo de armazenamento no tanque de refrigeração. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 18., 2008, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa, 2008.

SILVA, S.P.; SANTOS, M.E.R. Testes de qualidade no leite caprino em função do tempo de armazenamento no tanque de refrigeração. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 6, n. 10, p. 1-7, 2010.

SMIDDY, M. A. et al. Stability of casein micelles cross-linked by transglutaminase. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 6, p. 1906-1914, 2006.

SOBHANI, S; VALIZADEH, R.; NASERIAN, A. Alcohol stability of milk and its relation to milk and blood composition in Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, supl. 1, p. 59, 2002, **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, supl. 1, p. 59, 2002. Resumo apresentado ao Joint Meeting Abstracts, 2002, Québec City, Canada.

SOMMER, H.H.; BINNEY, T.H. A study of the factors that influence the coagulation of milk in the alcohol test. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 6, n. 3, p. 176-197, 1923.

SORENSEN, B.A.; MUIR, D.D.; KNIGHT, C.H. Thrice-daily milking throughout lactation maintains epithelial integrity and thereby improves milk protein quality. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 68, n. 1, p. 15-25, 2001.

STELWAGEN, K. et al. Mammary epithelial cell tight junction integrity and mammary blood flow during an extended milking interval in goats. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 2, p. 426-432, 1994a.

STELWAGEN, K. et al. Effect of once daily milking and concurrent somatotropin on mammary tight junction permeability and yield of cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 10, p. 2994-3001, 1994b.

STELWAGEN, K. et al. Time course of milk accumulation-induced opening of mammary tight junctions and blood clearance of milk components. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v. 273, n. 1, p. 379-386, 1997.

STELWAGEN, K. et al. Elevated plasma cortisol reduces permeability of mammary tight junctions in the lactating bovine mammary epithelium. **Journal of Endocrinology**, London, v. 159, p. 173-178, 1998a.

STELWAGEN, K. et al. No evidence for basolateral milk protein secretion in the lactating goat mammary gland. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, n. 2, p. 434-437, 1998b.

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

SYMONS, D. B.; WRIGHT, L. J. Changes in bovine mammary gland permeability after intramammary exotoxin infusion. **Journal of Comparative Physiology**, Berlin, v. 84, n. 1, p. 9-17, 1974.

TSIOULPAS, A.; LEWIS, M. J.; GRANDISON, A. S. Effect of minerals on casein micelle stability of cows' milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 74, n. 2, p. 167-173, 2007a.

TSIOULPAS, A.; GRANDISON, A.S.; LEWIS, M.J. Changes in physical properties of bovine milk from the colostrum period to early lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 11, p. 5012-5017, 2007b.

TSIOULPAS, A. et al. Effects of stabilizer addition and in-container sterilization on selected properties of milk related to casein micelle stability. **Food Chemistry**, Barking, v. 122, n. 4, p. 1027-1034, 2010.

VAN VLIET, T. et al. Rheological properties of casein gels. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 56, n. 3, p. 529-534, 1989.

WALSTRA, P. On the stability of casein micelles. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, n. 8, p. 1965-1979, 1990.

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

WHITE, J.C.D.; DAVIES, D.T. The relation between the chemical composition of milk and the stability of the caseinate complex. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 25, n.2, p.236-255, 1958a.

WHITE, J.C.D.; DAVIES, D.T. The relation between the chemical composition of milk and the stability of the caseinate complex: II. Coagulation by ethanol. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 25, n.2, p.255-266, 1958b.

WHITE, J.C.D.; DAVIES, D.T. The relation between the chemical composition of milk and the stability of the caseinate complex, III coagulation by rennet. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 25, n.2, p.267-280, 1958c.

WHITE, J.C.D.; DAVIES, D.T. The relation between the chemical composition of milk and the stability of the caseinate complex, IV coagulation by heat. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 25, n.2, p.281-296, 1958d.

WILDE, C. J. et al. Autocrine regulation of milk secretion by a protein in milk. **Biochemical Journal**, London, v. 305, pt.1, p. 51-58, 1995.

YOSHIDA,S. Studies in the utretch abnormality of milke in the miyuki dairy farm. **Journal of the Faculty of Japanese Applied Biology Science Hiroshima University**, Hiroshima, v. 19, n. 1, p. 39- 54,1980.

ZADOW, J. Alcohol-mediated temperature induced reversible dissociated of the casein micelle in milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, North Melbourne, v. 48,n. 2, p. 78-81, 1993.

ZANELA, M.B. **Caracterização do leite produzido no Rio Grande do sul, ocorrência e indução experimental do Leite Instável Não Ácido (LINA)**. 2004. 2004. 143f. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Pelotas, Pelotas, 2004.

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

ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R.; FISCHER, V. Ocorrência do leite instável não ácido no noroeste do Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 4, p. 1009-1013, 2009.

ZANELA, M. B. et al. Características físicas e instabilidade ao álcool do leite de búfala. In: CONFERENCIA INTERNACIONAL DE LECHE INESTABLE, 2., 2011, Colonia del Sacramento. **Anais...** Colonia del Sacramento, 2011.

ZETTL, K. S. et al. Glucocorticoid-induced formation of tight junctions in mouse mammary epithelial cell *in vitro*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 88, p. 9069-9073, 1992.

4.4. VITA

Nome: Marcelo Tempel Stumpf.

Filiação: Waldyr Stumpf Junior e Elisabeth Regina Tempel Stumpf.

Data de nascimento: 16/01/1986.

Local de nascimento: Porto Alegre/RS, Brasil.

Formado na escola Mário Quintana, em Pelotas, tanto no primeiro como no segundo grau. Engenheiro agrônomo formado pela Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) no ano de 2009. Ingressante no Programa de Pós Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) no ano de 2010, sob orientação da Professora Doutora Vivian Fischer na área de nutrição e alimentação de ruminantes.