

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

BRUNA SCHMITZ

**CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS DO LEITE BOVINO: EFEITOS DO PERÍODO DE
LACTAÇÃO E DE GRUPOS GENÉTICOS**

Porto Alegre
2023

**CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS DO LEITE BOVINO: EFEITOS DO PERÍODO DE
LACTAÇÃO E DE GRUPOS GENÉTICOS**

BRUNA SCHMITZ

Zootecnista

Universidade Tecnológica Federal Do Paraná

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Zootecnia, na Faculdade de Agronomia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientadora Prof.^a: Vivian Fischer Co-orientador: Prof. Dr. Adriano Henrique do Nascimento Rangel

Área de concentração: Zootecnia

Linha de Pesquisa: Inovação em Sistema de Produção Animal

Porto Alegre

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Schmitz, Bruna
CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS DO LEITE BOVINO: EFEITOS
DO PERÍODO DE LACTAÇÃO E DE GRUPOS GENÉTICOS / Bruna
Schmitz. -- 2023.
94 f.
Orientadora: Vivian Fischer.

Coorientador: Adriano Henrique do Nascimento
Rangel.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Características funcionais. 2. Teste do álcool.
3. Cálcio iônico. 4. Dias em lactação . 5. Grupo
Genético. I. Fischer, Vivian, orient. II. Henrique do
Nascimento Rangel, Adriano, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

BRUNA SCHMITZ
Zootecnista

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para
obtenção do Grau de

MESTRE EM ZOOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

Faculdade de Agronomia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 19.10.2023

Homologado

em:

21/12/2023

Pela Banca Examinadora

Por



Documento assinado digitalmente
VIVIAN FISCHER
Data: 19/10/2023 10:44:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Sergio Luiz Vieira Sergio Luiz Vieira

Assinado de forma digital por



Dados: 2023.12.22 14:27:51 -03'00'

VIVIAN FISCHER
PPG Zootecnia/UFRGS
ORIENTADORA

SERGIO LUIZ VIEIRA
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia



Documento assinado digitalmente
ANDRÉ THALER NETO
Data: 07/11/2023 17:15:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

André Thaler Neto
UDESC



Documento assinado digitalmente
CLARICE GEBARA MURARO SERRATE CORDEIRO
Data: 19/10/2023 10:58:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Clarice Gebara Muraro Serrate Cordeiro
UFG



Documento assinado digitalmente
DAISE WERNCKE
Data: 17/11/2023 17:05:47-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Daise Werncke
UNIBAVE



Documento assinado digitalmente
CARLOS ALBERTO BISSANI
Data: 22/12/2023 17:18:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de Agronomia

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela sabedoria, coragem e por tornar este caminho mais leve;
A minha família, mãe, pai e irmã por ser meu alicerce;
Ao Jailson pelo companheirismo, compreensão, apoio e carinho sempre;
Pelos meus verdadeiros amigos de sempre Ismael França e Mariana Bilck;
Pelas minhas amigas Delane Ribas da Rosa e Cindy Anne Klausberger Ximenes por sempre me ajudar;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Adriano Henrique do Nascimento Rangel, por ser sempre meu ombro amigo, gratidão;

Aos professores e colegas do programa de pós-graduação em Zootecnia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul por todos os ensinamentos;

Aos professores, técnicos de laboratório e colegas do programa de pósgraduação em Zootecnia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná;

Aos professores e amigos Olmar Antônio Denardin Costa e Ana Carolina Fluck pela amizade e ensinamento;

Aos amigos Leonardo Piffer de Borba e Jakciane A. de Miranda Foss que me ajudaram em coletas e análises;

A minha orientadora Prof^a Vivian Fischer, por toda sua paciência, dedicação e ensinamento, por ser essa pessoa tão incrível que faz com que cada encontro tivesse algo para aprender, muito obrigada por sempre estar disposta a me ajudar e também criticar. Com certeza você fez com que este caminho fosse mais proveitoso.

RESUMO

CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS DO LEITE BOVINO: EFEITOS DO PERÍODO DE LACTAÇÃO E DE GRUPOS GENÉTICOS¹

Autor : Bruna Schmitz

Orientador : Prof.^a Dra. Vivian Fischer

Co-orientador: Prof. Dr. Adriano Henrique do Nascimento Rangel

As características funcionais do leite cru como a sua estabilidade térmica, influenciam a adequação do leite cru ao seu beneficiamento industrial. A estabilidade térmica pode ser avaliadas pelo teste do álcool e influenciada por características físicoquímicas como acidez, cálcio iônico e pH, os quais são teste rápidos, de baixo custo e estão relacionadas com a adequação do leite cru ao seu beneficiamento industrial. O objetivo deste estudo foi avaliar a variação das características funcionais do leite cru bovino em relação aos grupos genéticos, estágios lactacionais e proporção de leite com diferentes estabilidades. No primeiro estudo se avaliaram os grupos genéticos e os estágios de lactação. Foram coletadas amostras de leite de vacas individuais (n = 601) entre agosto de 2021 e agosto de 2022, em cinco fazendas no Paraná. As características funcionais do leite cru bovino variaram com o estágio da lactação, e de forma distinta conforme o grupo genético. No segundo estudo, objetivou-se avaliar o efeito da inclusão de 2, 5, 10, 20 e 40% de leite de vacas no início da lactação (menos de 40 dias após o parto) ou acima de 260 dias após o parto sobre as variáveis funcionais do leite de conjunto (tanque resfriador). O leite de conjunto pode ter sua estabilidade afetada na inclusão igual ou acima de 20% de leite de baixa estabilidade. A estabilidade do leite no teste do álcool não apresentou relação clara com as demais variáveis funcionais, variando de forma distinta entre os grupos genéticos durante a lactação. A mistura pelo menos 10% de leite de vacas ao início e ao final pode alterar a estabilidade do leite de conjunto.

Palavras-chave: características funcionais, teste do álcool, cálcio iônico, dias em lactação e raças.

¹ Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, RS, Brasil 77p.), Outubro de 2023.

ABSTRACT FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF BOVINE MILK: EFFECTS OF LACTATION PERIOD AND GENETIC GROUPS¹

Author : Bruna Schmitz

Advisor : Prof.^a Dra. Vivian Fischer

Co-advisor: Prof. Dr. Adriano Henrique do Nascimento Rangel

The functional characteristics of raw milk, such as its thermal stability, influence the suitability of raw milk for industrial processing. Thermal stability can be assessed using the alcohol test and is influenced by physical-chemical characteristics such as acidity, ionic calcium, and pH. These are quick, low-cost tests and are related to the suitability of raw milk for industrial processing. The objective of this study was to evaluate the variation in functional characteristics of milk in relation to genetic groups, lactation stages and proportion of milk with different stabilities. In the first study, genetic groups and lactation stages were evaluated. Milk samples were collected from individual cows (n = 601) between August 2021 and August 2022, on five farms in Paraná. The functional characteristics of raw bovine milk varied with the stage of lactation, and differently depending on the genetic group. In the second study, the objective was to evaluate the effect of including 2, 5, 10, 20 and 40% of milk from individual cows at the beginning of lactation (less than 40 days after birth) or more than 260 days after calving on the functional variables of bulk tank milk. Ethanol stability of bulk tank milk may be affected when more than 10% of low-stability milk is included. Milk stability to the alcohol test did not show a clear relationship with other functional variables, varying differently between genetic groups during lactation. Mixing at least 20% of cow's milk at the beginning and at the end can alter the stability of the overall milk.

Keywords: functional characteristics, alcohol test, ionic calcium, lactation days and breeds.

¹ Master of Science dissertation in Animal Science, Faculdade of Agronomy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (77p.), October 2023.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Constituintes do leite.....	14
2.1.1 Proteína do leite.....	14
2.1.2 Minerais do leite.....	15
2.1.3 Estrutura da caseína.....	15
2.1.4 Estabilidade térmica das micelas de caseína	16
2.2 Teste da estabilidade do leite	17
2.3 Leite Instável não Ácido (LINA).....	18
2.3.1 Composição do leite	19
2.3.2 Nutrição e práticas de alimentação.....	19
2.3.3 Distúrbios metabólicos e digestivos	20
2.3.4 Estágio da Lactação	20
2.3.5 Época do ano.....	21
2.3.6 Mastite	21
2.3.7 Genética.....	21
2.4 Tratamento Térmico.....	21
2.4.1 Ultra High Temperature (UHT).....	22
2.4.2 Sedimentação	22
2.4.3 Gelificação	23
2.1.1 Viscosidade.....	23
3. HIPÓTESES E OBJETIVOS	24
Estudo de caso I: Diferentes misturas de leite de vacas ao início e ao final de lactação com leite de tanque – Mudanças nas características funcionais do leite – nota técnica	48
APÊNDICE II – Normas da revista utilizadas para preparo do capítulo II.....	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Micelas aquecida com complexos de proteína de soro de leite e κ -caseína	17
Figura 2 Representação das micelas de caseína em interação.	18
Figura 3 Esquema da metodologia de inclusão do leite	73
Figura 4 Interação entre estabilidade no teste do álcool e pH, iCa, acidez titulável e Dias em lactação (del) em leite de início de lactação.	74
Figura 5 Interação entre estabilidade no teste do álcool e pH, iCa, acidez titulável e dias em lactação (del) em leite de lactação estendida.	74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Quantidade de mineral presente no leite	16
Table 2 P-values considering the effects of classes of days in milk (DIM_class), breed and their interaction	43
Table 3 Mean and standard error of the mean values for milk ethanol stability (MES), acidity, ionic calcium (iCa), concentration of fat, milk urea nitrogen (MUN) and somatic cells count (SCC) according to interaction between lactation stage (DIM_class) and genetic group.	44
Table 4 Mean and standard error of the mean values for pH and milk concentration of protein, lactose and casein according to classes of days in milk (DIM_class) and genetic group.	45
Supplementary Table 5 Description of farms, animals, feeding and general management	46
Supplementary Table 6 Meteorological conditions	48
Tabela 7 Valores de estabilidade ao teste do álcool, pH, cálcio iônico, acidez em função do percentual de inclusão do leite individual de animal ao início e ao final da lactação	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LINA	Leite Instável Não Ácido
UHT	<i>Ultra High Temperature</i>
ET	Estabilidade térmica CCS
	Contagem de Células Somáticas iCa
	Cálcio iônico
HTST	Equipamento de pasteurização rápida
LTLT	Equipamento de pasteurização lenta β -
Lg	β -lactoglobulinas mmol/g Milimol por grama
MES	Milk ethanol stability
SCC	Somatic cells count
MUN	Milk urea nitrogen
TS	Total solids
BW	Body weight
BCS	Body condition score
NEB	Negative energy balance
THI	Temperature and humidity index
TBC	Total bacterial count °GL
	Graduação alcoólica mg/L
	miligramas por litro DEL Dias em lactação cel/mL Células somáticas por mililitro
	% v/v Por cento, volume/volume

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A estabilidade do leite bovino cru é uma variável importante para definir a adequação do leite para processamento industrial, pois está relacionada com a resistência do leite ao processo térmico. Este teste é realizado em dois momentos, primeiramente ainda na propriedade leiteira e após, na plataforma de recebimento da matéria prima na indústria.

O Leite Instável Não Ácido (LINA) ocorre devido à perda da estabilidade térmica da caseína ao teste do álcool, resultando em precipitação positiva, sem haver acidez elevada acima de 18ºD, e pode afetar a cadeia produtiva com prejuízos econômicos a produtores e às indústrias laticinistas.

No Brasil, a estimativa da estabilidade do leite continua sendo realizada com o teste do álcool ou alizarol. Desde a década de 80, as indústrias laticinistas vêm aumentando gradativamente a concentração do percentual de álcool na solução teste, com intuito de utilizar matéria prima de melhor qualidade, porém, não há comprovação científica para justificar esse procedimento de avaliar a estabilidade de todo leite cru, especialmente aqueles sem destinação específica, ou seja, que nem sempre exigem elevada estabilidade como o UHT (*Ultra High Temperature*).

Na busca em melhorar a estabilidade do leite, estudando os diferentes fatores que afetam sabe-se atualmente que existem fatores intrínsecos que afetam a estabilidade térmica do leite entre eles são: acidez, sais do leite, cálcio iônico, pH, citratos, fosfatos, proteínas do leite e lactose, enquanto os extrínsecos são: época do ano, fase da lactação, mastite, nutrição, estresse térmico. A fase da lactação influencia a estabilidade, especialmente logo após o parto e ao final da lactação. Logo após o parto, o leite apresenta pH mais baixo, elevada concentração de cálcio iônico e da acidez titulável pela modificação da concentração de proteínas. Ao final da lactação, (coincidente com os estágios mais avançados de gestação), pode haver redução da estabilidade, mas a sua relação com as demais características funcionais não está clara. A maior parte dos estudos se concentrou em animais da raça Holandesa, e faltam evidências sobre a variação das características funcionais em outros grupos genéticos, como animais da raça Jersey e suas cruzas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Constituintes do leite

O Art. 235 Decreto 9013/2017 define o leite como o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, sob condições de higiene e bem estar animal (Brasil, 2017). O objetivo de realizar o processamento térmico do leite é para que um produto perecível possa ser armazenado por um longo período de tempo de até 180 dias, sem refrigeração, sendo seguro para o consumo, sem perdas nas características nutricionais e sensoriais do leite “in natura” (Deeth et al., 2010; Vidal et al., 2018).

O leite é um fluido biológico que varia conforme a espécie, indivíduos, raça, saúde, condição nutricional, estágio de lactação, idade, intervalo entre ordenhas, alimentação e sanidade (GONZÁLEZ, 2001). Os constituintes do leite ocorrem em três fases: coloidal, aquosa e emulsão, sendo na solução aquosa, onde estão dispersas as micelas de caseínas ligadas a alguns minerais como parte do cálcio e fósforo, em emulsão os glóbulos de gordura e em solução, proteínas do soro, lactose, sais orgânicos e inorgânicos e vitaminas hidrossolúveis (FOX et al., 2015).

2.1.1 Proteína do leite

A fração proteica do leite é constituída pelas caseínas ou proteínas insolúveis que representam cerca de 80% do conteúdo total de proteínas do leite, sendo o restante proteínas do soro de leite. As caseínas são estruturas coloidais chamadas de micelas, sendo essa constituinte chave para a produção de derivados como os queijos de massa firme (HOLT, 1992; HORNE, 2003; FOX et al., 2015).

As caseínas, fosfocaseinatos de cálcio, são muito estáveis ao calor, quando aquecidas em pH natural do leite, enquanto as proteínas do soro são pouco estáveis ao calor, sendo completamente desnaturadas por aquecimento a 90°C por 10 min (FOX et al., 2015). As proteínas solúveis encontradas no soro do leite são divididas em albuminas, globulinas e enzimas. As proteínas solúveis coagulam com o calor, enquanto as insolúveis coagulam por ação da renina ou outras enzimas coagulantes e acidificação do leite em pH menores que 4,6 (Vidal et al., 2018).

As soro proteínas, na ausência das caseínas, em temperaturas maiores que 72°C sofrem desnaturação, levando à coagulação, insolubilização e precipitação. E em condições de baixa força iônica e pH 6,5-7,0, ocorre a sedimentação (FOX, 1991).

2.1.2 Minerais do leite

A quantidade de mineral do leite é constante, com valores entre 0,7 e 0,8%, porém ocorre variação na concentração dos íons, como no início da lactação (colostro), final da lactação e em leite de animais com mastite (FOX *et al.*, 2015). A quantidade de mineral está dividida na fração no soro do leite e na micela de caseína representada na (TABELA 2).

Os sais minerais no leite cru, leite processado e derivados lácteos desempenham um papel importante na estabilidade das proteínas. Um exemplo é o cálcio, pois o teor de minerais e a sua forma (ionizável, ligada ou solúvel), afeta a suscetibilidade à coagulação, incrustação, deposição nos equipamentos industriais (quando processado termicamente em altas temperaturas), gelificação e sedimentação (na embalagem durante o período de armazenamento) (TSIOULPAS *et al.*, 2007; LEWIS *et al.*, 2011).

TABELA 1 - Quantidade de mineral presente no leite

Mineral	mg/100g	Fração soro do leite	Micela de caseína (mmol/g)
Cátions			
Na	48	0.95	0.04
K	143	0.94	0.08
Ca	117	0.32	0.77
Mg	11	0.66	0.6
Ânions			
Cl	110	1	
CO ₃	10		
SO ₄	10	1	
PO ₄	203	0.53	0.39
Citrato	175	0.92	0.03

Fonte: WALSTRA, *et al.* (1999)

2.1.3 Estrutura da caseína

As micelas são constituídas por submicelas contendo β -caseínas, κ -caseínas e α -caseínas, ligadas por pontes de fosfato de cálcio. A extremidade das κ -caseínas forma uma camada “peluda” que mantém a repulsão eletrostática e impede a agregação adicional de submicelas (WALSTRA, 1999). As caseínas são descritas como proteínas reomórficas, com conformações externas abertas e flexíveis (HOLT *et al.*, 1993). Algumas condições alteram sua estrutura (FIGURA 1) como o aquecimento, congelamento, redução da atividade de água, adsorção em uma superfície, forças de filtração, adição de etanol ou outro solvente pobre e adição de polifenóis (HOLT, 2016).

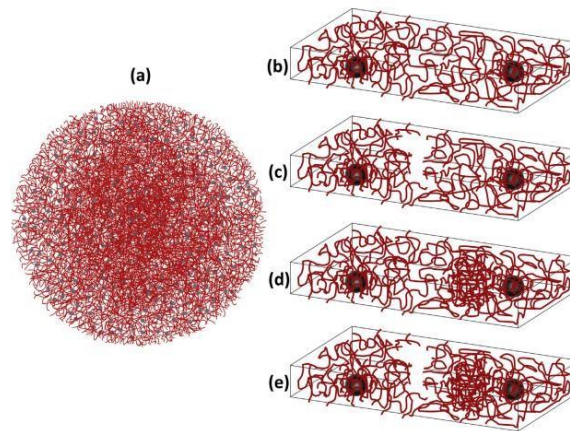


Figura 1 Micelas aquecida com complexos de proteína de soro de leite e κ -caseína

Representação em conjunto de uma micela de caseína bovina, figura (1a) representação da micela de caseína como uma esfera de raio 100 nm. Figura (1b) representando uma matriz aproximadamente homogênea (1b), uma matriz com espaços vazios (1c), uma matriz com regiões de proteína condensada (1d) e uma matriz com espaços vazios e regiões de proteína condensada (1e). Fonte: Holt (2016)

2.1.4 Estabilidade térmica das micelas de caseína

A estabilidade térmica do leite em um primeiro momento foi descrita como a temperatura necessária para o leite em pH ajustado, coagular em até dois minutos (Miller; Sommer, 1940). Posteriormente foi classificado como o tempo necessário para a coagulação do leite a 140°C (HORNE et al., 1990). A estabilidade do leite é afetada pelo pH, porém baixa estabilidade ao calor é causada pela interação entre desnaturação das proteínas do soro com as micelas de caseínas (FIGURA 2), alterando o equilíbrio do cálcio (DALGLEISH et al., 2012; FOX et al., 2015).

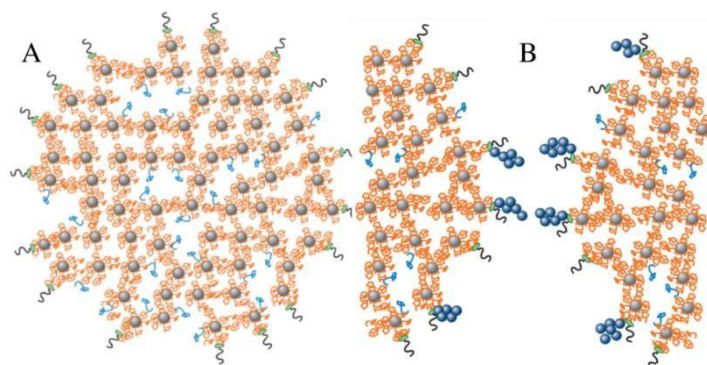


Figura 2 Representação das micelas de caseína em interação.

A - Corte esquemático de uma micela, mostrando as regiões de água dentro da estrutura. B - Representação da micela da caseína quando aquecida com κ -caseína representada em verde, α e β caseínas em cor laranja, cadeias caseino macropeptídicas em preto e fosfato de cálcio está

representado por esferas cinza e β -caseínas se ligam hidrofobicamente a outras caseínas e podem ser removidas por resfriamento azul.

Fonte: DALGLEISH e CORREDIG (2012).

A estabilidade do leite é influenciada pela quantidade de iCa (Davies; White, 1958). No leite bovino, o cálcio iônico se apresenta em três formas: solúvel, iônica e coloidal. Do total, 70% encontram-se na fase coloidal, ligado à micela de caseína na forma de fosfato de cálcio e os demais 30%, na forma de íons livres e solúveis, principalmente associados a citratos e fosfatos (LEWIS, 2011). Com o aumento do pH do leite, e da concentração de iCa , diminui a estabilidade térmica do leite (HORNE et al., 1990).

A estabilidade do leite está negativamente relacionada à acidez titulável, pois a redução do pH reduz também o fosfato e aumenta a concentração de cálcio iônico, que diminui as forças de repulsão entre as caseínas, favorecendo a coagulação (HORNE, 2016).

2.2 Teste da estabilidade do leite

A estabilidade do leite pode ser avaliada por diferentes maneiras: teste da fervura, do álcool e da estabilidade térmica (CHAVEZ et al., 2004; MACHADO et al., 2017). No teste do álcool, ao avaliar o leite na menor concentração em que ocorre a coagulação é o quanto ele é estável ao tratamento térmico (CHAVEZ et al., 2004).

O teste de álcool para avaliar a estabilidade do leite é indicado para ser utilizado na recepção de indústrias de laticínios, e a concentração exigida varia entre os países. Pode ser, por exemplo, de 68%, como no caso da África (RATHNAYAKE et al., 2016) e de 70%, na Argentina (CHAVEZ et al., 2004).

No Brasil, a estabilidade do leite é avaliada pelo teste do álcool ou alizarol, realizado em dois momentos até a recepção do leite bovino cru na indústria. Primeiramente, ainda na propriedade, o teste é realizado pelo transportador, e após, já na plataforma de recebimento, o produto é testado antes de entrar na linha industrial. Pela legislação vigente o leite que precipitar durante o teste álcool ou alizarol com no mínimo 72% de etanol não deve ser transportado até a indústria ou aceito na plataforma de recepção (Brasil, 2017)

O teste do alizarol é colorimétrico e desta forma, o resultado deve ser expresso como tal. A precipitação da amostra indica que o leite é instável naquela graduação alcoólica utilizada no teste. Se não houver precipitação o leite é estável. As diferentes

cores no teste são pelo indicador de pH alizarina (1,2 dihidroxiantraquinona) onde a coloração vermelho-tijolo sem presença de coagulação caracteriza o leite normal. Leite com pH mais baixo apresentam coloração amarela. Leites de coloração lilás a violeta apresentam pH alcalino (BRASIL, 2018). O resultado positivo desse teste (coagulação) tem sido muitas vezes equivocadamente interpretado como resultante da acidez excessiva (MARQUES et al., 2007; ZANELA et al., 2009; FISCHER et al., 2012; MACHADO et al., 2017;).

A estabilidade térmica é mensurada pelo tempo de coagulação, sendo o tempo transcorrido desde que se coloca a amostra de leite dentro do banho de glicerina ou óleo até os primeiros sinais de coagulação na temperatura de 140°C (NEGRI et al., 2002). Molina et al., (2001) relacionou os resultados obtidos com o teste do álcool e o tempo de coagulação, verificou que a concentração de 75% (v/v) era suficiente para processar o leite a 135°C durante 60 a 70 segundos, e considerou que não existe correlação linear entre graduação alcoólica e tempo de coagulação, questionando a necessidade da indústria em aumentar a graduação alcóolica. Machado et al., (2017) não encontrou correlação linear significativa entre os testes de estabilidade (teste da fervura, estabilidade no teste do álcool e tempo de coagulação).

Atualmente não existe um teste simples de estabilidade que possa ser feito para determinar se uma amostra de leite será estável ao processamento UHT. Mas o teste do álcool é um dos melhores indicadores de estabilidade, rápido e útil em que o leite não deve coagular quando misturado com um volume igual de álcool 74% para ser estável ao processamento UHT (DEETH et al., 2016; DEETH et al., 2017).

2.3 Leite Instável não Ácido (LINA)

Leite instável não ácido (LINA) caracteriza-se pelo leite que perde a estabilidade da caseína, resultando em sua precipitação na prova do álcool, sem, haver acidez titulável elevada (acima de 18°D) (Zanela et al., 2009).

Sistemas de produção com maior grau de uso de tecnologia e maior produção mensal apresentam menor ocorrência de LINA (GABBI et al., 2013a). Leite com níveis de cálcio iônico mais elevados, acima de 2 mM, apresentaram instabilidade ao teste de álcool na concentração de 75% (v/v). Essa concentração implica em consequências negativas durante a fase de processamento de leite tipo UHT, aumentando a

possibilidade de incrustação dos equipamentos na planta de beneficiamento (HORNE et al., 1981; DONNELLY et al., 1986; HORNE et al., 1990; LIN et al., 2006).

2.3.1 Composição do leite

Ainda não está totalmente esclarecida a relação entre a composição do leite e estabilidade ao teste do álcool, porém o aumento do sódio e cloretos e a diminuição do teor de lactose no leite, estão relacionados com menor estabilidade (CHAVEZ et al., 2004; TSILOULPAS et al., 2007). Quando comparada a composição de leite frente ao teste de álcool, os leite instáveis apresentaram valores menores de α -Lactalbumina que é uma subunidade da enzima lactose-sintase, sendo importante para o equilíbrio osmótico do leite e que promove a síntese de lactose no aparelho de Golgi, podendo levar a elucidar sobre a estabilidade do etanol do leite (FAGNANI et al., 2014) Outros estudos corroboram com os resultados previamente citados como menor concentração de sólidos desengordurados e lactose no leite com baixa estabilidade em comparação ao leite normal (ZANELA, et al., 2014), menor concentração de proteína e caseína no leite instável em relação ao leite normal (MARQUES et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011), mas maior concentração de gordura (NEGRI et al., 2001; ZANELA et al., 2006) e de Cl, Na e K (CHAVEZ et al., 2004).

2.3.2 Nutrição e práticas de alimentação

O aporte de alimentos, elevando o suprimento de nutrientes, aumenta a estabilidade do leite (ABREU et al., 2008; GABBI et al., 2018; SCHMIDT et al., 2014). O uso da suplementação por volumoso ou concentrado, assim como o aumento de energia na dieta pelo fornecimento de dietas com baixa quantidade de fibra e com alta digestibilidade aumentam a estabilidade do leite (VOGES et al., 2018; GABBI et al., 2018; MARQUES et al., 2010).

Por outro lado, a restrição nutricional e o desequilíbrio nutricional (ZANELA et al., 2006; FRUSCALSO et al., 2013; STUMPF et al., 2013; GABBI et al., 2013; WERNCKE, 2017), assim como o excesso de fibra na dieta reduzem a estabilidade do leite (BARCHIESI, et al. 2007). O excesso de proteína (MARQUES, 2010; SCHMIDT, 2014) ou proteína degradável no leite (MARTINS et al., 2015) foram fatores que reduziram a estabilidade do leite. Um dos mecanismos que podem explicar a relação entre restrição alimentar e redução da estabilidade é o aumento do estresse, com elevação do nível de cortisol sanguíneo causando mudanças na permeabilidade das junções firmes das células epiteliais mamárias, aumentando o teor de mineral no leite (STUMPF et al., 2013).

2.3.3 Distúrbios metabólicos e digestivos

Animais que apresentam distúrbios metabólicos com algum tipo de desequilíbrio ácido-base produziram leite com menor estabilidade (FAGNANI et al., 2014; MARQUES et al., 2011). Distúrbios digestivos como a acidose ruminal decrescem a estabilidade do leite (WERNECK, 2017). A elevação da concentração de cálcio iônico pode explicar esse fenômeno. MARQUES *et al.*, (2011) ao induzir a acidose metabólica em vacas em lactação fornecendo na dieta sais aniônicos, verificou a redução da estabilidade à prova do álcool, também encontrou valores menores de densidade, lactose, proteína bruta, extrato seco total e desengordurado e maiores teores de cálcio iônico. Entretanto, o fornecimento de aditivos alimentares como bicarbonato de sódio e citrato não levaram a melhorias na estabilidade do leite (STUMPF et al., 2013).

Vacas submetidas à privação de sombra durante a estação quente produziram leite com menor estabilidade que aquelas com livre acesso à sombra, tanto em condições de estresse térmico grave (ABREU et al., 2020) quanto em condições mais moderadas (FISCHER, et al., 2012). A diminuição do consumo de animais em estresse térmico, pode ser um dos motivos que leva à diminuição da estabilidade do leite (STUMPF, 2013; ZANELA et al., 2006). Porém, Abreu *et al.*, (2020) verificaram que vacas submetidas ao estresse térmico grave e sem acesso à sombra ficaram mais ofegantes e produziram leite com maior acidez titulável, podendo dessa forma, ter elevado a concentração de cálcio iônico no leite, o que reduz a estabilidade (ABREU *et al.*, 2020).

2.3.4 Estágio da Lactação

O estágio de lactação somado à condição nutricional do animal pode afetar a estabilidade, devido à influência da acidez titulável pela modificação da concentração de proteínas (fase inicial), de cátions divalentes e proporção com ânions e equilíbrio salino, especialmente ao final da lactação, quando a permeabilidade das junções firmes decresce novamente (FISCHER et al., 2011). O colostro apresenta valores mais elevados de cálcio iônico e baixo pH, aumentando assim a ocorrência de leite instável ao teste de álcool no início da lactação (TSIOULPAS et al., corroborado por Heisler *et al.*, (2017).

Ocorre uma menor estabilidade do leite no primeiro terço (< 100 dias) e terceira parte (> 200 dias) da lactação, com maior ocorrência registrada em rebanhos compostos por mais de 40% dos animais nas fases mencionadas (CHAVES et al., 2001).

2.3.5 Época do ano

O efeito das estações do ano parece depender da disponibilidade dos alimentos em quantidade e qualidade, afetando o aporte nutricional e provocando muitas vezes a troca brusca de dietas, além de eventuais efeitos do estresse térmico, mencionado no item anterior. Vários autores relatam a menor estabilidade durante a estação de seca como, por exemplo, Oliveira *et al.*, (2011) na região de São Paulo. Outros, no entanto, verificaram a maior ocorrência de LINA em períodos de transição entre pastagens, durante o outono, onde está no fim do ciclo das pastagens de verão e as de inverno ainda não estão prontas para o pastejo (MARQUES *et al.*, 2007; ZANELA *et al.*, 2009; BAIRROS *et al.*, 2011; MACHADO *et al.*, 2017).

Vários autores (TSIOULPAS *et al.*, 2007; STUMPF *et al.*, 2013; HORNE, 2016) relatam que essa mudança na estabilidade do leite durante o ano se deve à variação na quantidade e qualidade do alimento fornecido e atrelado à alteração na composição mineral das dietas.

2.3.6 Mastite

A mastite ainda é uma área que requer mais estudos sobre a influência na estabilidade do leite, porém animais que apresentaram valores elevados de contagem de células somáticas (CCS) apresentaram instabilidade ao teste de álcool (DE OLIVEIRA *et al.*, 2013), o que está em contradição com estudos que compararam a estabilidade do leite entre quartos saudáveis e de vacas com mastite do mesmo animal, sem efeito desta doença sobre a estabilidade do leite (KOLLING, 2012; MARTINS *et al.*, 2018).

2.3.7 Genética

Estudos mostram que o polimorfismo genético de κ -caseína, em animais que expressam o alelo B apresentam maior estabilidade ao teste de álcool (ROBITAILLE; *et al.*, 2001). Diferentemente dos resultados encontrados por Botaro *et al.*, (2009), em que não houve diferença nos resultados, pelas variantes genéticas da κ -caseína. Barbosa *et al.*, (2012) verificaram que amostras de leite com menor estabilidade apresentavam maior concentração de beta-caseína, mas menor concentração de kappa-caseína.

Bem como Botaro *et al.*, (2007) encontrou que o polimorfismo genético da β lactoglobulina, não influencia na estabilidade do leite.

2.4 Tratamento Térmico

O tratamento térmico do leite é importante para inativar microrganismos patogênicos e deteriorantes, minimizando reações químicas e físicas durante o

armazenamento. Os tratamentos podem ser a pasteurização ou a esterilização, garantindo assim a segurança no consumo (DEETH et al. 2017).

A pasteurização pode ser classificada em lenta (LTLT) ou rápida (HTST). Na pasteurização LTLT, a temperatura é de 63°C por 30 minutos, processo que leva à inativação da fosfatase alcalina (WALSTRA et al., 1984; BRASIL, 2006). Destrói todos os microrganismos com potencial patogênico e a maioria das formas vegetativas. Já na HTST a temperatura empregada é de 72-75°C por 15-20s, (SILVA, 2003). Durante esse processo ocorre a inativação da fosfatase alcalina, mas, não a lactoperoxidase. Sem apresentar microrganismos capazes de proliferar na temperatura de 35-37°C durante 7 dias (BRASIL, 2018).

2.4.1 Ultra High Temperature (UHT)

Caracteriza-se por leite UHT o leite homogeneizado que foi submetido, a uma temperatura 130°C a 150°C, por 2 a 4 segundos, mediante um processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32° C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e fechadas hermeticamente e que pode ser armazenado em temperatura ambiente por vários meses (ANEMA et al., 2017; BRASIL, 1997). A tecnologia do leite UHT já é consolidada, mas conforme a região do mundo é mais aceita. Em países como França, Portugal e Espanha, este leite representa cerca de 80% do mercado consumidor. Por outro lado, em países como Estados Unidos, Reino Unido, Nova Zelândia e Austrália esse valor é menor que 10% do mercado, por razões de preço, cultura e história, e grande parte do consumidor relata um sabor adocicado do UHT, preferindo o sabor do pasteurizado (PERKINS et al., 2001).

Alterações indesejáveis podem ocorrer ainda dentro do período de validade do UHT (120-180 dias), após o processamento, ocorrendo a formação de gel ou sedimentos no fundo da embalagem.

A sedimentação durante o armazenamento em caixa UHT, quando ocorre é uma camada compacta no fundo da embalagem, enquanto a gelificação é um material volumoso, que pode se desprender durante o derramamento do leite (ANEMA, , 2017).

2.4.2 Sedimentação

Existem alguns problemas que podem ocorrer durante o tratamento térmico do leite. Um deles é a incrustação ou sedimentação que ocorre durante o processamento térmico que acarreta redução no coeficiente geral de transferência de calor, aumento na

queda de pressão sobre a seção onde ocorreu a incrustação. Quando em excesso, a incrustação levará a regimes de limpeza mais longos e geralmente desperdiçará mais energia e detergentes para a limpeza (LEWIS, 2018).

Sedimentação é um desses problemas que acontece a partir da ação das enzimas proteolíticas e lipolíticas de origem microbiana, que em grande parte são termoestáveis, permanecendo ativas mesmo após a esterilização (VIDAL, 2005).

2.4.3 Gelificação

Outro problema é a gelificação que é causada por bactérias psicrófilas que têm a capacidade de multiplicação em temperaturas baixas (<7°C), e apresentam a característica de produção de enzimas que são resistentes a tratamentos térmicos. O tratamento térmico elimina as bactérias, mas não elimina as enzimas que degradam a proteína e gordura do leite, reduzindo a vida de prateleira do leite UHT (Vidal; Saran Netto, 2018).

A gelificação é formada pela interação entre proteínas do soro de leite, especialmente a β -Lg (β -lactoglobulinas), com a k-caseína da micela de caseína que é degradada pelas proteases (DATTA et al., 2001).

Ao investigar o efeito da contagem de células somáticas e o período da lactação, Auld et al., (1996), observaram que o leite de início da lactação gelificou antes que o de final da lactação. No final da lactação o mecanismo da plasmina é diferente do mecanismo da mastite, onde apresenta grande aumento do plasminogênio ativado com estreita associação com neutrófilos (ALESSIO, 2013)

2.1.1 Viscosidade

A viscosidade do leite é caracterizada como resistência em fluir, ela sofre influência da temperatura, gordura, homogeneização, fermentação, tempo até o processamento e altas temperaturas seguidas de resfriamento, aumentando a mesma (BRITO, , 1998).

Ainda não tem indicadores físicos que revelem que o leite irá gelificar prematuramente, mas se observa que ocorre um aumento da viscosidade antes da gelificação (ANEMA, , 2017).

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

As hipóteses deste estudo são:

1. Animais no início da lactação e no final da lactação apresentam leite com menor estabilidade, independentemente do grupo genético
2. A mistura de volumes expressivos de leite de vacas no início da lactação (menos de 40 dias após o parto) ou acima de 260 dias após o parto pode reduzir a estabilidade do leite do leite de conjunto.

Os objetivos deste estudo foram:

Objetivo geral:

Avaliar as características funcionais do leite: teste do álcool, acidez titulável, cálcio iônico e a sua composição química de vacas em diferentes estágios da lactação, com ênfase nos períodos inicial e final da lactação.

Objetivos específicos:

1. Avaliar as características funcionais do leite e composição em animais dos grupos genéticos: Holandesa, Jersey e cruzadas Jersolando.
2. Avaliar se o estágio da lactação influencia nas características funcionais e composição do leite.
3. Analisar se inclusões de diferentes quantidades de leite de início e lactação estendida em leite de tanque causam mudanças nas características funcionais do leite.

CAPÍTULO II

Variation in bovine milk stability according to lactation stage and genetic group

Elaborado conforme as normas de publicação do Journal of Dairy Research Fator de impacto: 2.1

Web site: <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-dairy-research>

Variation in bovine milk stability according to lactation stage and genetic group

Bruna Schmitz¹, Olmar Antônio Denardin Costa², Ana Carolina Fluck³, Leonardo Piffer de Borba², Adriano Henrique do Nascimento Rangel⁴ and Vivian Fischer^{1*}

¹Post graduate program in animal science, Federal University of Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Post graduate program in animal science, Federal University of Technology of Paraná, Dois Vizinhos, PR, Brazil.

³Federal Institute of Education, Science and Technology of Farroupilha (IFFar), Santo Ângelo, RS, Brazil

⁴Postgraduate program in animal science, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil.

Short title: **Bovine milk stability according to lactation stage and genetic group**

*Correspondence: Vivian Fischer *E-mail: vivian.fischer@ufrgs.br*

Address: Agronomy Faculty Animal Science Department Federal University of Rio Grande do Sul. Bento Gonçalves av., 7712. Porto Alegre – RS – 91540000 – Brazil. Phone +5551999835081

Abstract

This Research Paper addresses the hypothesis that cows at early and late lactation show low milk ethanol stability (MES) due to high acidity and ionic calcium values irrespective of genetic group. Our aim was to evaluate the functional traits of milk such as stability, acidity, ionic calcium according to lactation stage in different genetic groups. Raw milk samples (n = 601) were collected monthly from August 2021 to August 2022, from 290 Jersey, Holstein and Jersey x Holstein crossbred cows, raised on five commercial farms located at the state of Paraná, Brazil. Individual milk samples were collected monthly, sent to the laboratory for determination of milk composition, somatic cells count (SCC), MES, pH acidity and ionic calcium (iCa). Days in milk (DIM) were categorized into four DIM_classes: 1:1-60, 2:61-150, 3:151-305 and 4: over 305 days in milk.

Thus, a completely randomized design was adopted. Data were submitted to analysis of variance. Fixed effects and random effects were incorporated into the model, in a repeated measures in time arrangement using the mixed models methodology. Significant ($P < 0.05$) interactions between DIM_class and genetic groups were detected for MES, acidity, ionic calcium, fat, milk urea nitrogen (MUN) and total solids (TS). The comparison between each combination of genetic group and DIM_class showed that at beginning of lactation (DIM_class 1), Holstein produced milk with higher stability than Jersey and crossbreds. Also, at DIM_class 3 Holstein's milk presented higher MES than Jersey, while at DIM_class 4 Holstein's milk showed higher MES than crossbred cows. At the beginning of lactation acidity was higher in Holstein's milk and crossbreds compared with Jersey, while acidity was lower in Holstein's milk compared with Jersey and crossbreds in the other lactation stages. Ionic calcium was highest after lactation peak (DIM_class 2) for Holstein, but did not vary between lactation stages for Jersey and crossbreds. Functional characteristics of bovine raw milk such as ethanol stability, ionic calcium and acidity varied between lactation stages in a distinct manner according to genetic groups. Moreover, early and end lactation stages are challenging in terms of low stability, especially for Jersey and crossbreds.

Keywords: Crossbreds, Functional traits of milk, Ionic calcium, Milk ethanol stability, Titratable acidity

Introduction

Ethanol milk stability (**MES**) is a functional characteristic of milk still measured in several countries such as Brazil, Uruguay, and Argentina to indicate the adequacy of raw milk to thermal processing (Fischer *et al.*, 2012). The ethanol test is the first test carried out at the farm, taken milk sample from the bulk tank before loading for transportation. Visual detection of clots indicates low stability and provokes milk (Barros 2001; Machado *et al.*, 2017; Brasil, 2018). Previously, the main reason associated with low MES was the high acquired acidity, but more recently low stability in milk showing acidity within the normal range values are more prevalent (Zanela *et al.*, 2015; Machado *et al.*, 2017).

Low milk stability is associated with changes in the concentrations of mineral salts (Tsioulpas *et al.*, 2007b; Horne, 2016), arising from physiological and metabolic conditions (Marques *et al.*, 2010a, 2011; Martins *et al.*, 2015a; Werncke *et al.*, 2016), heat stress (Abreu *et al.*, 2020), feed restriction (Fruscalso *et al.*, 2013; Stumpf *et al.*, 2013; Gabbi *et al.*, 2016) and nutritional imbalances (Marques *et al.*, 2010b; Martins *et al.*, 2015b; Gabbi *et al.*, 2016).

There are few reports about evolution of milk stability during lactation, and mostly were performed with Holstein cows. Milk stability is low at the beginning of lactation, especially during the first 10 days after calving, increasing progressively afterwards (Tsioulpas; Grandison; Lewis, 2007; Vizzotto *et al.*, 2021) and also at the end of lactation, especially in extended lactation (Suplementação de vacas holandesas em estágio avançado de lactação Marques *et al.*, 2010). Dairy cows are frequently challenged by negative energy balance (**NEB**) in early lactation because the nutrient demand for milk synthesis is not fulfilled by diet intake. Excessive NEB can lead to metabolic disturbances and consequently decrease the MES of milk (Marques *et al.*, 2011). Moreover, negative relations between MES and ionic calcium have been reported (Barros L; Denis N; Gonzalez A, 1999; Chavez *et al.*, 2004; Lewis, 2011). Relations between milk acidity and MES are scarcely reported, but usually they are negatively associated, especially when linked to high bacteria count (**TBC**) (Chavez *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2017). However, natural milk acidity is associated with concentrations of natural milk components such as phosphates, citrates, caseins and albumin that may be influenced by factors such as: breed, lactation time, period of the year, nutrition and animal feeding (González, 2001; Fox *et al.*, 2015).

The main difficulty to compare milk stability between genetic groups is to keep the animals under the same conditions of management, environment, and nutrition, otherwise it generates a large variability of covariates that may affect the results. In addition, most studies have evaluated milk stability in Holstein cows. We acknowledge that there some studies evaluating other genetic groups besides Holstein, e.g., Jersey cows (Heisler *et al.*, 2017; Vizzotto *et al.*, 2021a), Holstein and Holstein x Gyr crossbreds (Botaro *et al.*, 2007; Vizzotto *et al.*, 2021).

The Holstein-Friesian breed has been extensively used due to high yield potential and it is prevalent in many European countries as well in USA. There are some concerns about its reduced efficiency under low-input management that is common in many developing and underdeveloped countries. Jersey breed is suitable to cross with purebred Holstein-Friesian cows, because of improved milk qualities, such as higher protein and fat content, as well their overall adaptation to grazing systems if managed appropriately. Ormston *et al.* (2022) reported that Holstein x Jersey crossbred cows produced milk with more fat (+ 3.2 g/kg milk), protein (+ 2.9 g/kg milk) and casein (+2.7 g/kg milk); and showed higher feed, fat, and protein efficiency (expressed as milk, fat, and protein outputs per kg DMI) than Holstein cows.

Our hypotheses are that 1) cows at early and late lactation show low MES due to high acidity and ionic calcium values, and 2) these variations occur irrespective of genetic group. Thus, our aim was to evaluate the functional traits of milk such as stability, acidity, ionic calcium according to lactation stage in different breeds.

Material & Methods

The experimental procedures were approved by the Research Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul (n° 41594).

Animals and general management

Raw milk samples (n = 601) were collected monthly from August 2021 to August 2022, at the morning milking from 290 Jersey, Holstein and Jersey x Holstein crossbred cows, raised on five commercial farms located at the state of Paraná, Brazil. Description of farms, herd composition and animals traits as well monthly meteorological conditions are shown in the Supplementary material (*Supplementary Tables S1 and S2*).

The following information about the animals were recorded: genetic group, body weight (BW), body condition score (BCS), days in milk (DIM), parity, nutritional management, sanitary management, milking management, thermal comfort and temperature and humidity indexes. The temperature and humidity data were registered during the whole experimental period. The temperature and humidity index (THI) was calculated using the equation of (Dikmen; Hansen, 2009): $THI = (1.8 \times T + 32) - [(0.55 - 0.0055 \times RH) \times (1.8 \times T - 26.8)]$.

Milk characteristics

Individual milk samples were collected monthly, at the morning milking and sent to the laboratory for milk composition and somatic cells count (SCC) determination. The concentrations of fat, protein, casein, lactose, defatted dry extract and urea in milk were determined by Fourier-Transform infrared spectrophotometry (Bentley FTS, Bentley Instruments, Chaska, MN). SCC was determined by flow cytometry using Somacount 300 equipment (Bentley Instruments, Chaska, Minnesota, USA), following recommendations of the International Dairy Federation (2000).

The milk samples were cooled at 4°C for 12 hours and subsequently analyzed for pH and ethanol stability (MES). The pH was determined by potentiometry and MES was determined by mixing 2mL of milk and 2mL of alcoholic solutions with ethanol concentration of 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84 and 86% v/v in a Petri dish (Tronco et al., 2003). The results were expressed as the minimum concentration of ethanol in the alcoholic solution that induced milk coagulation visually detected.

The pH and acidity determination were performed by potentiometry and titration, respectively (Vidal; Saran Netto, 2018). Ionic calcium (iCa) was determined by ion-selective potentiometry (Thermo Scientific Orion® potentiometer, Dual Star model) according to the

methodology described by Ribeiro *et al.*, (2010). The potentiometer had a combined reference electrode and a selective electrode for calcium ions. The iCa concentration values were expressed in mg/L.

Statistical analysis

The data were submitted to analysis of variance. Based on DIM, all observations were classified into four lactation stage classes (DIM_class): 1:1-60, 2:61-150, 3:151-305 and 4: over 305 days in milk. Fixed effects and random effects were incorporated into the model, under the mixed models methodology. Thus, a completely randomized design was adopted, in a repeated measures scheme. The variables genetic group (n = 3: Holstein, Jersey and their crossbreds) and DIM_class (n = 4) were included as fixed effects. Farm (n = 5) and season of the year (n = 4) were included as random effects and the day of evaluation, in each farm, was allocated as repeated measures in time, according to the model:

$$Y_{ijkl} = \mu + GG_i + DC_j + (GG*DC)_{ij} + F_k + S_l + (F*D)_{jm} + \epsilon_{ijklm}$$

Where: Y_{ijk} is the observation related to the i -th genetic group effect (GG_i), in the j -th DIM_class (DC_j) and their interaction. Farm (f_k) and season (S_l) were considered as random effects, and $(F*D)$ as the day of evaluation on each farm was considered as repeated in time.

The adjustment of the random effects and the choice of the mathematical model were made by the corrected Akaike information criterion (AICc). For this purpose, the Glimmix procedure (SAS, 2013) was used, choosing the best distribution and model fit, based on the AICc. Other random effects were tested, and their inclusion or exclusion from the model was based on the best fit, based on the criteria mentioned above. SAS OnDemand was used for statistical analysis.

Results

The overall average (\pm SD) of number of days in milk per lactation stage class were 28 ± 1.82 , 104 ± 2.87 , 234 ± 3.60 and 428 ± 1170 for classes 1, 2, 3 and 4, respectively. Significant ($P < 0.05$) interactions between DIM_class and genetic groups were detected for MES, acidity, ionic calcium, fat, milk urea nitrogen (MUN) and total solids (TS) (Tables 1 and 2).

MES did not vary between DIM classes in Holstein. In Jersey, the lowest and highest MES values were detected at the beginning of lactation (DIM_class 1) and after lactation peak (DIM_class 2), respectively; while in the crossbreds, MES was lowest at the beginning and end of lactation (DIM_class 1 and 4), and highest after lactation peak (DIM_class 2). The comparison between each combination of genetic group and DIM_class showed that at beginning of lactation

(DIM_class 1), Holstein presented higher stability than Jersey and crossbreds. Also, at DIM_class 3 Holstein presented higher MES than Jersey, while at DIM_class 4 Holstein showed higher MES than crossbred cows.

At the beginning of lactation (DIM_class 1), acidity was highest in Holstein, not varying afterwards. Conversely, in Jersey, acidity was lowest at the beginning of lactation (DIM_class 1) and highest at the DIM_class 3 and 4. On the contrary, acidity did not significantly vary between lactation stages for crossbreds. Comparing genetic groups within lactation stage, at the beginning of lactation (DIM_class 1) acidity was higher in Holstein and crossbreds than in Jersey, while acidity was lower in Holstein compared with Jersey and crossbreds in the other lactation stages.

Ionic calcium was highest after lactation peak (DIM_class 2) for Holstein, but did not vary between lactation stages for Jersey and crossbreds.

Fat content did not vary between lactation stages in Holstein, while in Jersey cows, the lowest and highest values for fat were observed at the beginning of lactation (DIM_class 1) and end of lactation (DIM_class 3 and 4), respectively. On the other hand, in crossbreds, fat's lowest and highest values were observed at the extended lactation (DIM_class 4) and end of lactation (DIM_class 3), respectively. At the first half of lactation, there were no differences between genetic groups. In the second half of lactation, Holstein presented lower values than Jersey and crossbreds.

Milk urea nitrogen (MUN) values in Holstein were lowest and highest at extended lactation (class DIM = 4) and first half of lactation (DIM_Class 1 and 2), while MUN did not vary between lactation stages in Jersey and crossbreds.

Total solids (TS) did not vary between lactation stages in Holstein. In Jersey, TS presented lowest values at the first half of lactation (DIM_class 1 and 2), while highest values at the second half of lactation. Similarly, crossbreds presented lowest and highest TS values at DIM_class 2 and 3, respectively.

Somatic cells presented lowest and highest values in DIM_class 3 and 4, respectively in Holstein, while in Jersey SCC lowest and highest values were observed in DIM_class 2 and 4, respectively. Crossbred presented lowest and highest values in DIM_class 4 and 1, respectively.

There were significant ($P<0.05$) differences for protein and casein concentrations between genetic groups, while lactose, pH and SCC did not differ between genetic groups (Tables 1 and 3). Jersey and crossbreds showed higher overall milk protein and casein concentrations than Holstein.

There were significant ($P<0.05$) differences for protein, casein, lactose and SCC between lactation stages, while pH did not vary (Tables 1 and 3). At the first half of lactation (DIM_class 1 and 2) protein and casein presented lower values than in the second half (DIM_class 3 and 4).

Lactose presented the lowest and highest values at the end of lactation (DIM_class 3) and at the beginning of lactation (DIM_class 1), respectively.

Discussion

It is acknowledged that concentration of milk components such as protein, casein, fat vary along lactation and between genetic groups (Dairy chemistry and biochemistry, second eFox *et al.*, 2015). It is far less evident how other characteristics such as milk stability, acidity, pH and ionic calcium named functional variables vary as lactation progresses and between genetic groups. The above mentioned variables influence the functionality of milk and dairy products, as they affect their thermal processing, for example, increasing the presence of sediments and gels in the products during and after the application of heat in the UHT processes and drying of the milk for the elaboration of milk in powder, and may affect the yield and sensory characteristics of dairy product as cheeses and yogurts (Deeth, 2016; Deeth; Lewis, 2017). MES is considered a good estimator of the thermal stability of milk, including for the UHT process (Chen; Grandison; Lewis, 2012), showing sensitivity but no specificity (Deeth; Lewis, 2017).

The main contribution of the present study is to evidence that functional characteristics of bovine raw milk such as MES, acidity, pH and ionic calcium vary with lactation stage, but distinctly according to the genetic group.

In our study, the low values of MES at the beginning of lactation were coincident with numerical (albeit not significant) higher values for ionic calcium for Jersey and crossbreds, and higher numeric values of acidity only for crossbreds. Previous studies showed that MES is lower in the first 10-15 days after calving in Holstein cows (Tsioulpas; Grandison; Lewis, 2007) and Jersey cows (Heisler *et al.*, 2017). Besides, MES was negatively correlated with the concentrations of protein as well with ionic calcium and calcium to inorganic phosphorus ratio (Li; Ye; Singh, 2019).

Moreover, the low values of MES at the end of lactation were coincident with high acidity values in the milk of Jersey cows but not in crossbreds. On the other hand, low MES was coincident with numerical high ionic calcium in crossbreds. Previously, as lactation progresses MES was reduced, but in a highly variable way (Barros L; Denis N; Gonzalez A, 1999; Suplementação de vacas holandesas em estágio avançado de lactação Marques *et al.*, 2010), and the cut point is still not reported not the possible mechanisms.

The low values for MES at the beginning (Heisler *et al.*, 2017; Tsioulpas; Grandison; Lewis, 2007) and end of lactation (Suplementação de vacas holandesas em estágio avançado de lactação Marques *et al.*, 2010) have been related to changes in the concentrations of mineral salts

(Horne, 2016; Tsioulpas; Lewis; Grandison, 2007), in turn resulting from differences in genetics (Botaro *et al.*, 2009; Fagnani; de Araújo; Botaro, 2018), casein composition (Barbosa *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2018).

Besides the variations in MES between genetic groups at the different lactation stages, the association between MES and other functional characteristics also varied. For instance, the comparisons between genetic groups at each lactation stage evidenced the highest MES in Holstein compared with Jersey and crossbred cows at the beginning of lactation. Against our expectation, at DIM_class 1 (1-60 d), there were no differences in acidity and ionic calcium between genetic groups to explain the distinct values of MES. We acknowledge that it would be important to have determined the concentration of other minerals, e.g., phosphates and citrates as well of caseins, but we do not have these data, and it is one limitation of our study.

At the second lactation stage (DIM_class = 2, 61 - 150 d), the higher MES observed in crossbreds compared with Jersey was coincident with higher acidity, and the higher values of MES at the third lactation stage (DIM_class 3, 151-305 d) in Holstein compared with Jersey and crossbreds were also coincident with higher values of acidity. Martins (2022) also observed a weak positive correlation between MES and acidity, and attributes to the high concentrations of protein and phosphates (although they were not determined), since the bacterial count was low (81.7% of the samples presented TBC values lower than 100,000 CFU).

Finally, at extended lactation stages, higher values of MES in Holstein were coincident with high ionic calcium concentration compared with crossbreds. Previously, low MES was attributed to the high concentration of ionic calcium and acidity in Holstein cows (Barros L; Denis N; Gonzalez A, 1999; Chavez *et al.*, 2004; Tsioulpas; Grandison; Lewis, 2007) .

The higher values of fat, protein and casein concentrations in the second half of lactation (class DIM 3 e 4) are probably related to the reduction in milk yield after lactation peak, concentrating the milk components (Kappes *et al.*, 2020; Palmquist; Jenkins, 2017). The inverse pattern shown by lactose concentration is partially related to its role as the main osmoregulator and thus, presents positive correlation with milk yield (Dairy chemistry and biochemistry, second eFox *et al.*, 2015). Moreover, Alessio *et al.* (2016) reported that lactose content is influenced by SCC and parity, with seasonal variation, but it is not related to breed, milk production, milk fat and protein content. Recently, Alessio *et al.* (2021) reported that variation in lactose concentration was not related to variations in protein and fat contents, but it was negatively related with SCC and total bacterial counts (TBC).

It is well acknowledged that Jersey cows produce milk with higher concentration of fat and protein than Holstein cows (Manuelian *et al.*, 2018; Sanjayaranj *et al.*, 2022). The relationship

between milk composition and MES is not yet fully understood, but increased sodium and chloride and decreased lactose content in milk are related to lower stability (Chavez *et al.*, 2004; Fagnani; de Araújo; Botaro, 2018; Tsioulpas; Grandison; Lewis, 2007).

The reduction in MUN during the second half of lactation in Holstein might be related to the low protein concentration in TMR usually fed to cows at the end of lactation (NRC, 2001). The lower MUN values observed for Holstein compared with Jersey and crossbreds at DIM-class 2 to 4 might be related to diet formulation by farms. Farms in the present study had mixed herd breeds, and in 4 out of 5 Holstein was the dominant genetic group. Thus, we hypothesize that the diets in these herds were formulated according to the milk yield and composition of the Holstein. Consequently, Holsteins would have a greater nitrogen utilization efficiency, which could lead to lower MUN concentrations. Moreover, Doska *et al.* (2012) performed a survey in 96 herds at Paraná State (south region of Brazil) and reported that Holstein cows showed lower MUN adjusted means than crossbred and Jersey cows: 14.18 vs. 15.49, 16.12mg/dL, respectively. Also, these authors verified that MUN concentrations peaked between 151 and 180 days in milk (16.35 mg/dL), attributing to the higher consumption of dry matter and consequently of crude protein during this stage of lactation.

The highest acidity in milk observed at early lactation (DIM_class = 1), decreasing afterwards in Holstein cows is probably related to the transition milk, in agreement with the results reported by (Tsioulpas; Grandison; Lewis, 2007). Natural milk acidity is related to phosphates, citrates, caseins, albumin and carbon dioxide (Veloso, 1998; Fox *et al.*, 2015), contributing with 0.14 to 0.18 g of lactic acid/100 ml of milk. However, casein variation does not explain acidity values, as they drop during DIM_class 2 and were similar between DIM_classes 1, 3 and 4. Therefore we might speculate that other components such as albumins, phosphates and citrates might have affected milk acidity. The reason why acidity increased as lactation progressed in Jersey cows are not easily explained.

The higher acidity values observed in Jersey cows (except at DIM_class1) and crossbreds compared with Holstein is attributed to higher crude protein and casein concentrations (Neves, 2021; Ormston *et al.*, 2022).

Therefore, we accepted the hypotheses that cows at early and late lactation show low MES due to high acidity ionic calcium values for Jersey, while we could not evidence a clear relation between MES and acidity and ionic calcium for Holstein and crossbreds.

Conclusion

Functional characteristics of bovine raw milk such as ethanol stability, ionic calcium and acidity varied between lactation stages in a distinct manner according to genetic groups. Early and end lactation stages are challenging in terms of low stability, especially for Jersey and crossbreds.

Early and end lactation stages are challenging in terms of high acidity, although there is not consistency between genetic groups nor relation with bacterial count.

Ionic calcium varied between lactation stages only for Holstein, not showing a clear pattern and consistency with ethanol stability and acidity.

References

- Abreu AS, Fischer V, Stumpf MT, McManus CM, González FHD, Da Silva JBS and Heisler G** (2020) Natural tree shade increases milk stability of lactating dairy cows during the summer in the subtropics. *Journal of Dairy Research* **87**, 444–447.
- Alessio DRM, Neto AT, Velho JP, Pereira IB, Miquelluti DJ, Knob DA and Da Silva CG** (2016) Multivariate analysis of lactose content in milk of Holstein and Jersey cows¹. *Semina: Ciências Agrárias* **37**, 2641–2652.
- Alessio DRM, Velho JP, McManus CM, Knob DA, Vancin FR, Antunes GV, Busanello M, De Carli F and Neto AT** (2021) Lactose and its relationship with other milk constituents, somatic cell count, and total bacterial count. *Livestock Science* **252**.
- Barbosa RS, Fischer V, Ribeiro MER, Zanela MB, Stumpf MT, Kolling GJ, Júnior JS, Barros LE and do Egito EAS** (2012) Caracterização eletroforética de proteínas e estabilidade do leite em vacas submetidas à restrição alimentar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **47**, 621–628.
- Barros, L** (2001) Metabolic disorders that affect milk quality. Use of milk to monitor nutrition and metabolism of dairy cows. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* **44**:46–60.
- Barros L; Denis N; Gonzalez A** (1999) Prueba del alcohol em leche y relación con calcio iónico. *Veterinary Practice* **9**, 315.
- Botaro BG, Lima YVR de, Aquino AA, Fernandes RHR, Garcia JF and Santos MV dos** (2007) Polimorfismo da beta-lactoglobulina não afeta as características físico-químicas e a estabilidade do leite bovino. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **42**, 747–753.
- Botaro BG, de Lima YVR, Cortinhas CS, Prada e Silva LF, Rennó FP and dos Santos MV** (2009) Efeito do polimorfismo do gene da kappa-caseína, da raça e da sazonalidade sobre as características físico-químicas, de composição e de estabilidade do leite bovino. *Revista Brasileira de Zootecnia* **38**, 2447–2454.
- Brasil** (2018) INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 76, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2018. **14**, 9–13.
- Chavez MS, Negri LM, Taverna MA and Cuatrín A** (2004) Bovine milk composition parameters affecting the ethanol stability. *Journal of Dairy Research* **71**, 201–206.
- Chen BY, Grandison AS and Lewis MJ** (2012) Comparison of heat stability of goat milk subjected to ultra-high temperature and in-container sterilization. *Journal of Dairy Science* **95**, 1057–1063.
- Deeth HC and Lewis MJ** (2017) *High Temperature Processing of Milk and Milk Products*.

- Dikmen S and Hansen PJ** (2009) Is the temperature-humidity index the best indicator of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment? *Journal of Dairy Science* **92**, 109–116.
- Doska MC, Silva DFF, Horst JA, Valloto AA, Rossi P and de Almeida R** (2012) Sources of variation in milk urea nitrogen in Paraná dairy cows. *Revista Brasileira de Zootecnia* **41**, 692–697.
- Fagnani R, de Araújo JPA and Botaro BG** (2018) Field findings about milk ethanol stability: a first report of interrelationship between α -lactalbumin and lactose. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **98**, 2787–2792.
- Fischer V, Zanela MB, Ribeiro MER, Marques LT, Abreu AS, Machado SC, Fruscalso V, Barbosa RS, Stumpf MT, Kolling GJ et al.** (2011) Leite instável não ácido (LINA): prevenção na propriedade leiteira e impactos nos laticínios. *III Simpósio Nacional de Bovinocultura Leiteira e I Simpósio Internacional de Bovinocultura Leiteira - SIMLEITE 1*, 45–66.
- Fischer V, Ribeiro MER, Zanela MB, Marques LT, Abreu AS de, Machado SC, Fruscalso V, Barbosa RS and Stumpf MT** (2012) Leite instável não ácido: um problema solucionável? *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* **13**, 838–849.
- Fox PF, Uniacke-Lowe T, McSweeney PLH and O’Mahony JA** (2015) Dairy chemistry and biochemistry, second e. *Dairy Chemistry and Biochemistry, Second Edition*. pp 1–584.
- Fruscalso V, Stumpf MT, McManus CM and Fischer V** (2013) Feeding restriction impairs milk yield and physicochemical properties rendering it less suitable for sale. *Scientia Agricola* **70**, 237–241.
- Gabbi AM, McManus CM, Zanela MB, Stumpf MT, Barbosa RS, Fruscalso V, Thaler Neto A, Schmidt FA and Fischer V** (2016) Milk traits of lactating cows submitted to feed restriction. *Tropical Animal Health and Production* **48**, 37–43.
- González FHD** (2001) Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. *Biblioteca Setorial Da Faculdade de Medicina Veterinária Da UFRGS* **44**, 72.
- Heisler G, Cocco R, Vizzotto EF, Paris M De, Stivanin SCB, Werncke D, Angelo IDV and Fischer V** (2017) Avaliação das características físico químicas do leite nos primeiros 21 dias de lactação. *Anais Do VII Congresso Brasileiro de Qualidade Do Leite*. Curitiba, pp 221–222.
- Horne DS** (2016) Advanced dairy chemistry volume 1B: Proteins: Applied aspects: Ethanol Stability and Milk Composition. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1B: Proteins: Applied Aspects: Fourth Edition* 1–498.

- Kappes R, Knob DA, Neto AT, Alessio DRM, Rodrigues WB, Scholz AM and Bonotto R** (2020) Cow's functional traits and physiological status and their relation with milk yield and milk quality in a compost bedded pack barn system. *Revista Brasileira de Zootecnia* **49**.
- Lewis MJ** (2011) The measurement and significance of ionic calcium in milk - A review. *International Journal of Dairy Technology* **64**, 1–13.
- Li S, Ye A and Singh H** (2019) Seasonal variations in composition, properties, and heat-induced changes in bovine milk in a seasonal calving system. *Journal of Dairy Science* **102**, 7747–7759.
- Machado SC, Fischer V, Stumpf MT and Stivanin SCB** (2017) Seasonal variation, method of determination of bovine milk stability, and its relation with physical, chemical, and sanitary characteristics of raw milk. *Revista Brasileira de Zootecnia* **46**, 340–347.
- Manuelian CL, Penasa M, Visentin G, Zidi A, Cassandro M and De Marchi M** (2018) Mineral composition of cow milk from multibreed herds. *Animal Science Journal* **89**, 1622–1627.
- Marques LT, Fischer V, Zanela MB, Stumpf Júnior W, Ribeiro MER, Vidal LEB, Rodrigues CM and Peters MD** (2010) Suplementação de vacas holandesas em estágio avançado de lactação. *Ciência Rural* **40**, 1392–1398.
- Marques LT, Fischer V, Zanela MB, Ribeiro MER, Junior WS and Rodrigues CM** (2011) Produção leiteira, composição do leite e perfil bioquímico sanguíneo de vacas lactantes sob suplementação com sal aniônico. *Revista Brasileira de Zootecnia* **40**, 1088–1094.
- Martins CMMR, Arcari MA, Welter KC, Netto AS, Oliveira CAF and Santos M V.** (2015a) Effect of dietary cation-anion difference on performance of lactating dairy cows and stability of milk proteins. *Journal of Dairy Science* **98**, 2650–2661.
- Martins CMMR, Arcari MA, Welter KC, Netto AS, Oliveira CAF and Santos M V.** (2015b) Effect of dietary cation-anion difference on performance of lactating dairy cows and stability of milk proteins. *Journal of Dairy Science* **98**, 2650–2661.
- Martins CM de MR, Gonçalves JL, Alves BG, Arcari MA and Dos Santos MV** (2018) Subclinical intramammary infection does not affect bovine milk ethanol stability. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* **55**, 1–9.
- Martins CMMR, Fonseca DCM, Alves BG, Arcari MA, Ferreira GC, Welter KC, Oliveira CAF, Rennó FP, Santos MV** (2019) Effect of dietary crude protein degradability and corn processing on lactation performance and milk protein composition and stability. *Journal of Dairy Science* **102**(5), 4165–4178.
- Martins FA** (2022) Characterization of variables related to bovine milk stability. (Caracterização de variáveis relacionadas com a estabilidade do leite bovino). Dissertation - Post graduate Program in Animal Science - Federal University of Ponta Grossa. 65 p.

- Neves TFF** (2021) Milk stability: physico-chemical characteristics and performance of specialized Holstein and Jersey herds. (Estabilidade do leite: características físico-químicas e parâmetros de desempenho de rebanhos especializados das raças holandesa e jersey). Dissertation - Post graduate Program in Animal Science - Federal University of Ponta Grossa. 63 p.
- NRC** (2001) *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*.
- Ormston S, Davis H, Butler G, Chatzidimitriou E, Gordon AW, Theodoridou K, Huws S, Yan T, Leifert C and Stergiadis S** (2022) Performance and milk quality parameters of Jersey crossbreds in low-input dairy systems. *Scientific Reports* **12**, 1–17.
- Palmquist DL and Jenkins TC** (2017) A 100-Year Review: Fat feeding of dairy cows. *Journal of Dairy Science* **100**, 10061–10077.
- Ribeiro MER, Barbosa RS, Fischer V, Junior Stumpf W and Barros L** (2010) Método de Determinação de Cálcio Iônico no Leite Bovino. *Issn 1516-28840* 18p.
- Sanjayanj I, Lopez-Villalobos N, Blair HT, Janssen PWM, Holroyd SE and MacGibbon AKH** (2022) Effect of Breed on the Fatty Acid Composition of Milk from Dairy Cows Milked Once and Twice a Day in Different Stages of Lactation. *Dairy* **3**, 608–621.
- Tsioulpas A, Grandison AS and Lewis MJ** (2007a) Changes in physical properties of bovine milk from the colostrum period to early lactation. *Journal of Dairy Science* **90**, 5012–5017.
- Tsioulpas A, Lewis MJ and Grandison AS** (2007b) Effect of minerals on casein micelle stability of cows' milk. *Journal of Dairy Research* **74**, 167–173.
- Veloso, C.R.V** (1998) Noções básicas da acidez. In: BRITO, J. R. F.; DIAS, J. C. (Ed.). A qualidade do leite. Juiz de Fora: Embrapa-CNPGL; São Paulo: Tortuga,. p. 37-45.
- Vidal AMC and Saran Netto A** (2018) *Obtenção e Processamento Do Leite e Derivados*. Pirassununga.
- Vizzotto EF, Stivanin SCB, de Paris M, Passos LT, Werncke D, Klein CP, Stone V, Matté C, Zanela MB and Fischer V** (2021) Supplementation with green tea and oregano extracts on productive characteristics, blood metabolites, and antioxidant status of Jersey cows during the transition period. *Animal* **15**.
- Werncke D, Gabbi AM, Abreu AS, Felipus NC, Machado NL, Cardoso LL, Schmid FA, Alessio DRM, Fischer V and Thaler Neto A** (2016) Qualidade do leite e perfil das propriedades leiteiras no sul de Santa Catarina: Abordagem multivariada. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* **68**, 506–516.

Zanela MB, Ribeiro MER and Fischer V (2015) Leite instável não ácido (LINA) do campo a indústria. *VI Congresso Brasileiro de Qualidade Do Leite. Minicurso- Universidade Federal Do Paraná (UFPR)* 1–16.

Table 2 P-values considering the effects of classes of days in milk (DIM_class), breed and their interaction

Characteristics	N°	P-values		
		DIM_class	Genetic group	Interaction DIM x genetic group
Body weight (kg)	252	0.2832	0.0001	0.3656
<i>Functional characteristics</i>				
Ethanol stability (°GL)	427	0.0033	0.0080	0.0195
Acidity (g lactic acid/100mL)	454	0.7220	0.0250	0.0282
pH	459	0.6415	0.3089	0.0593
Ionic calcium (mg/L)	285	0.5327	0.7577	0.0437
<i>Milk components</i>				
Fat (g/100g)	489	0.0155	0.0034	0.0421
Protein (g/100g)	489	0.0001	0.0001	0.3538
Lactose (g/100g)	489	0.0002	0.5708	0.3551
Total solids (g/100g)	489	0.0122	0.0030	0.0285
Casein (g/100g)	241	0.0035	0.0276	0.1906
<u>MUN (mg/dL)</u>	<u>377</u>	<u>0.7066</u>	<u>0.0325</u>	<u>0.0292</u>

Table 3 Mean and standard error of the mean values for milk ethanol stability (MES), acidity, ionic calcium (iCa), concentration of fat, milk urea nitrogen (MUN) and somatic cells count (SCC) according to interaction between lactation stage (DIM_class) and genetic group.

	DIM	MES (°GL)	Acidity (°D)	Ca _i (mg/L)	Fat (g/100g)	MUN (mg/dL)	Total solids (g/100g)	SCC (x 1000) cells/ml
Holstein	1(0-60d)	79.69±1.96 aA	20.29±1.50 aA	151.81±51.62 abA	3.87±0.21 a A	16.88±1.91 aA	12.66±0.24 a	211±32 c
	2 (61-150d)	78.95±1.98 aAB	18.46±1.36 bB	180.16±61.68 aA	4.02±0.21 aA	15.85±1.91 aAB	12.58±0.23 a	417±64 b
	3 (151-305d)	79.97±1.82 aA	18.96±1.36 bB	140.47±47.54 bA	3.93±0.18 aB	14.07±1.83 abB	12.56±0.20 a	453±70 a
	4 (>305d)	79.12±1.95 aA	18.70±1.37 bB	134.61±45.60 bB	3.73±0.19 aB	13.64±1.87 bB	12.56±0.23 a	109±17 d
Jersey	1(0-60d)	73.73±2.22 bB	18.10±1.45 bB	155.47±54.01 aA	3.93±0.27 bA	16.57±22.19 aA	12.53±0.32 b	416±64 c
	2 (61-150d)	78.64±1.87 aB	19.60±1.42 bAB	137.13±46.86 aB	4.18±0.20 abA	17.20±1.94 aA	13.04±0.23 b	689±106 a
	3 (151-305d)	76.84±1.72 abB	20.12±1.43 aA	146.10±49.52 aA	4.51±0.19 aA	17.70±1.84 aA	13.49±0.21 a	572±88 b
	4 (>305d)	77.18±1.80 abAB	20.03±1.44 aA	144.92±49.13 aB	4.56±0.21 aA	16.34±1.86 aA	13.58±0.24 a	356±55 d
Jersey x Holstein crossbreds	1(0-60d)	74.11±2.81 bB	21.88±1.89 aA	158.80±58.64 aA	3.73±0.32 abA	15.50±2.52 aA	12.50±0.39 ab	1335±209 a
	2 (61-150d)	82.75±2.47 aA	20.50±1.62 aA	142.43±50.42 aB	3.70±0.25 abA	13.26±2.18 aB	12.47±0.31 b	957±148 b
	3 (151-305d)	77.34±1.99 bAB	20.29±1.52 aA	141.21±48.58 aA	4.40±0.25 aA	16.04±1.97 aA	13.29±0.28 a	269±42 c
	4 (>305d)	73.13±2.65 bB	19.58±1.77 aB	173.33±61.80 aA	3.56±0.33 bB	16.40±2.26 aAB	12.56±0.43 ab	50±8 d
P-value		0.0195	0.0282	0.0437	0.0421	0.0292	0.0285	0.0001

a,b, c means in the same column followed by the different letters within genetic group are distinct (P<0.05) A, B, C in the same column followed by the different letters within the same DIM_class are distinct (P<0.05)

Table 4 Mean and standard error of the mean values for pH and milk concentration of protein, lactose and casein according to classes of days in milk (DIM_class) and genetic group.

<i>DIM_class</i>	1 (0-60d)	2 (61-150d)	3 (151-305d)	4 (>305d)	<i>Pvalue</i>
<i>Variables</i>					
pH	6.79±0.06 a	6.80±0.05 a	6.79±0.05 a	6.81±0.06 a	0.6415
Protein (g/100g)	3.27±0.08 b	3.33±0.07 b	3.53±0.06 a	3.59±0.07 a	0.0001
Lactose (g/100g)	4.53±0.08 a	4.42±0.07 ab	4.31±0.07 c	4.35±0.07 b	0.0002
Casein (g/100g)	2.66±0.10 a	2.69±0.07 a	2.89±0.06 b	2.85±0.07 b	0.0035
<i>Genetic group</i>	Holstein	Jersey	Jersey x Holstein	-	<i>Pvalue</i>
pH	6.78±0.06 a	6.81±0.05a	6.80±0.06a	-	0.3089
Protein (g/100g)	3.30±0.06 b	3.51±0.07 a	3.48±0.077 a	-	0.0001
Lactose (g/100g)	4.43±0.07 a	4.38±0.07 a	4.40±0.08 a	-	0.5708
Casein (g/100g)	2.66±0.06 b	2.80±0.06 a	2.84±0.09 a	-	0.0276

a, b, c means in the same row followed by the different letter within genetic group are distinct ($P < 0.05$).

Supplementary Table 5 Description of farms, animals, feeding and general management

Variable	Farms				
	A	B	C	D	E
<i>Farm description</i>					
Area (ha)	8.16	16.00		164.00	22.15
Location	Southwest	Southwest	Southwest	Center-South	Southwest
Production system	grazing	grazing	grazing	Confinement	grazing
<i>Feeding practices</i>					
TMR	0	0	0	1	1
Pasture+suppl	1	1	1	0	1
Nutritional adequacy	Insufficient	Sufficient	Sufficient	Sufficient	Sufficient
<i>Milking practices</i>					
Parlor	Herring bone	Herring bone	Herring bone	Herring bone	Herring bone
First strips milk	0	1	1	1	0

CMT	0				0			1			1		1
Pre-dipping	1				1			1			1		1
Pos-dipping	1				1			1			1		1
Adequate equipment cleaning	0				1			1			1		1
Cooling tank	1				1			1			1		1
<i>Sanitary management</i>													
vermifugation	0	0	1	1	1	Vaccines	0	0	1	1	1		
Heat stress mitigation	0				1			1			1		1
<i>Herd characteristics</i>													
N° Jersey cows	16				14			25			0		9
N° Holstein cows	19				18			0			76		20
N° crossbred cows	9				4			0			0		6

Overall parity

Jersey	4.27±0.302	1.47±0.13	2.83±0.16	-	1.86±0.46
Holstein	2.54±0.214	2.27±0.18	-	2.97±0.17	2.94±0.26
H x J cows	3.26±0.41	2.24±0.24	-	-	1.8±0.37

Body weight

Jersey	391.13±97.11	387.80±4.41	408.91±38.50	-	479.83±56.03
Holstein	547.11±81.0	523.63±26.52	-	-	598.8±68.27
H x J cows	465.34±82.35	530.00±0.0	-	-	496.00±70.45

BCS

Jersey	2.5	3.25	2.5	-	3.25
Holstein	2.5	3.00	-	-	3.5
H x J cows	3	3.25	-	-	3.38

Nutritional adequacy = adequate farms were considered to be those with specialized technical assistance, balanced diets, e.g. TMR, stocked feed, no feed deficit. Nutritional inadequacy = farms without balanced diets, without specialized technical assistance, semi-confinement diets without adequate pasture management, with a shortage of pasture in times of scarcity. 0 = no; 1 = yes

Supplementary Table 6 Meteorological conditions

Variable s	Season							
	winter		spring		summer		autumn	
	Regio	Regio	Regio	Regio	Regio	Regio	Regio	Regio
	n 1	n 2	n 1	n 2	n 1	n 2	n 1	n 2
Mean Temperature (°C)	20.08	16.2	28.93	19.72	25.49	20.48	19.55	15.37
Humidity (%)	69.57	77.59	58.29	76.44	79.92	78.28	74.95	77.67
Mean Precipitation (mm)	0.253	0.14	0.39	0.15	0.22	0.11	0.22	0.13
THI	66.54	62.00	77.50	66.20	75.65	67.44	61.78	60.44

CAPÍTULO III

Estudo de caso I: Diferentes misturas de leite de vacas ao início e ao final de lactação com leite de tanque – Mudanças nas características funcionais do leite – nota técnica

RESUMO

A estabilidade térmica é um fenômeno multifatorial, influenciada por acidez, composição da micela da caseína, iCa, alimentação, genética, estresse térmico, época do ano e período da lactação. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da inclusão de 2, 5, 10, 20 e 40% de leite de vacas no início da lactação (menos de 40 dias após o parto) ou em lactação tardia, acima de 260 dias após o parto sobre as variáveis funcionais do leite de conjunto (tanque resfriador). O estudo foi realizado de junho de 2021 a dezembro de 2021, em fazendas comerciais leiteiras na cidade de Dois Vizinhos, PR. Foram coletadas amostras de leite de vacas individuais e de conjunto e encaminhadas para posteriores análises de pH, teste do álcool, acidez titulável, iCa e composição. Tanto ao início como ao final da lactação, a inclusão de leite com baixa estabilidade a partir de 20% ao leite de conjunto, com estabilidade mais elevada, reduz a estabilidade do leite de mistura, com diminuição de pH e aumento de iCa. A inclusão de 20 ou mais % de leite individual com maior estabilidade, melhorou a estabilidade do leite de tanque, alterando positivamente iCa e pH. De forma esperada, quando o leite adicionado apresentou estabilidade semelhante ao leite de tanque, os valores de estabilidade, iCa, pH não foram modificados. Análises de regressão mostraram que a estabilidade no teste do álcool foi reduzida pelo incremento de iCa e incrementada pelo aumento de pH, mas acidez titulável e DEL não influenciaram os valores de estabilidade. O estudo confirma o efeito de misturas de 20% ou mais de leite individual sobre o leite de tanque, e deveria ser levado em consideração na decisão do aproveitamento de leite de vacas individuais.

Palavras chaves: Misturas, estabilidade térmica, acidez titulável, teste do álcool.

ABSTRACT

Thermal stability is a multifactorial phenomenon, influenced by acidity, composition of the casein micelle, iCa, diet, genetics, thermal stress, time of year and lactation period. This study aimed to evaluate the effect of including 2, 5, 10, 20 and 40% of milk from cows at the beginning of lactation (less than 40 days after birth) or in late lactation, more than 260 days after birth. on the functional variables of the whole milk (cooling tank). The study was carried out from June 2021 to December 2021, on commercial dairy farms in the city of Dois Vizinhos, PR. Milk samples were collected from individual and group cows and sent for subsequent pH analysis, alcohol test, titratable acidity, iCa and composition. Both at the beginning and end of lactation, the inclusion of milk with low stability from 20% to the whole milk, with higher stability, reduces the stability of the milk mixture, with a decrease in pH and an increase in iCa. The inclusion of 20 or more % of individual milk with greater stability improved the stability of tank milk, positively altering iCa and pH. As expected, when the added milk presented stability similar to tank milk, the stability, iCa and pH values were not modified. Regression analyzes showed that stability in the alcohol test was reduced by increasing iCa and increased by increasing pH, but titratable acidity and DEL did not influence stability values. The study confirms the effect of mixtures of 20% or more of individual milk on tank milk, and should be taken into consideration when deciding whether to use milk from individual cows.

Keywords: Mixtures, thermal stability, titratable acidity, alcohol test.

Introdução

O colostro e leite de transição apresentam valores baixos de pH e cálcio iônico mais elevados, fazendo com que o início da lactação seja um período de maior atenção pelos produtores e indústria (TSIOULPAS et al., 2007). Desta maneira somente após 15 dias de lactação, o leite pode ser processado para UHT (TSIOULPAS et al., 2007). Segundo Shew *et al.*, (1981), o leite de vaca deve ser estável a 74% no teste de álcool para estar nas condições de suportar ao tratamento UHT. O valor mínimo da estabilidade no teste do álcool exigido pela legislação e/ou indústrias varia entre países e estabelecimentos. Por outro lado, existem algumas evidências que o leite de vacas ao final da lactação também seja menos estável, mas não estão definidos as suas causas e o momento de sua ocorrência.

No Brasil, segundo a Instrução Normativa nº 76, a graduação alcoólica mínima exigida é 72% v/v (Brasil, 2018), mas sabe-se que as indústrias exigem dos produtores valores que oscilam entre 76 e 82 °GL. Vários países usam o teste do álcool na plataformas da indústria para aceitar a matéria prima, porém com diferentes graduações alcoólicas, o valor de 68% é aceito em países da África (KASSA et al.,; RATHNAYAKE et al., 2016), Países como Chile, Uruguai e Argentina o valor de 70% é aceito (CHAVEZ et al., 2004) .

Entre as variáveis que normalmente mais afetam a estabilidade térmica estão as concentrações de cálcio iônico e acidez ou pH (CHAVEZ et al., 2004; HORNE, 2016). Os valores de cálcio iônico são mais elevados em leite de início de lactação, final da lactação e de vacas com mastite (BARROS, 1999). Em estudos realizados (HORNE et al., 1981), ao adicionar cálcio no leite, não houve alteração na curva sigmoide do pH, porém o pH tende a aumentar para manter o mesmo nível de estabilidade, sendo assim o aumento de cálcio em um determinado pH, diminui a estabilidade térmica do leite. HORNE & PARKER (1981) reportaram que a mistura de amostras de leite com perfis distintos (curva de estabilidade ao etanol em função do pH) irá resultar em um perfil mais semelhante ao da amostra com maior valor de leite. Esse estudo foi feito em laboratório, evidenciando que os fatores que afetam a estabilidade estão principalmente na fração aquosa do leite. Todavia, ao nosso conhecimento, isso não foi testado em condições práticas, misturando leite de transição ou de lactação tardia com o leite de tanque, o que efetivamente ocorre nas fazendas leiteiras.

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da inclusão de 2, 5, 10, 20 e 40% de leite de vacas no início da lactação (menos de 40 dias após o parto) ou acima de 260 dias após o parto sobre as variáveis funcionais do leite de conjunto (tanque resfriador).

Metodologia

O estudo foi realizado de junho de 2021 a dezembro de 2021. em fazendas comerciais leiteiras na cidade de Dois Vizinhos, PR. Foram coletadas amostras de leite de vacas individuais e de conjunto durante a ordenha da manhã, as quais foram mantidas em refrigeração de até 4°C e encaminhadas para o laboratório de Bromatologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Foram analisadas 378 amostras de leite, individuais (19), tanque (54) e misturas (305). para determinação da estabilidade no teste do álcool, pH, acidez titulável e concentração de iCa.

Foram registrados os dados individuais dos animais como: dias em lactação, paridade e raça.

Na realização do “teste do álcool” foram transferidos 2 mL de leite e 2 mL de solução etanólica com concentrações crescentes de etanol desde 74 até 80% (v/v), e foi observada a ocorrência ou não de coagulação ou até no máximo 80% de etanol em placa de Petri (WHITE et al., 1958). O valor registrado foi a menor concentração do etanol que induziu a coagulação da amostra.

A determinação de pH foi realizada conforme Vidal; Saran Netto, (2018). A determinação da acidez do leite foi realizada por titulação com solução de Dornic (VIDAL et al., 2018).

A determinação de iCa foi por potenciometria com eletrodos ion-seletivo, conforme metodologia descrita por Barros, (1999), utilizando um potenciômetro digital da marca Orion®, com eletrodo combinado de referência e seletivo para íons cálcio.

Após foi realizada a mistura de diferentes percentuais de leite de vacas (FIGURA 3) do início e final de lactação com leite de tanque, e foram adicionados os seguintes volumes de leite:

Tratamento 1: inclusão de 2% - 0,8 mL de leite individual e 39,2 mL de leite de tanque;

Tratamento 2: inclusão de 5% - 2 mL de leite e 38 mL de leite de tanque;

Tratamento 3: inclusão de 10% - 4 mL de leite e 36 mL de leite de tanque.

Tratamento 4: inclusão de 20% - 8 mL de leite e 32 mL de leite de tanque;

Tratamento 5: inclusão de 40% - 16 mL de leite e 24 mL de leite de tanque.

Todas as determinações (estabilidade no teste do álcool, acidez, pH e iCa) foram realizadas nas amostras de leite de início e final de lactação, do leite de conjunto e das misturas.

Preliminarmente, foi realizada análise descritiva dos resultados. Os dados de leite de conjunto e das vacas individuais foi classificado conforme o DEL e foi realizada análise de regressão linear simples entre as variáveis funcionais, usando os dados da composição de leite de animais individuais (não misturados).

Resultados

No início da lactação, a inclusão de 20 e 40% leite com estabilidade menor (68%) que o leite de tanque (84%) reduziu estabilidade (76%), juntamente com o pH e acidez. Quando a diferença entre a estabilidade foi menor entre as amostras de leite testadas, onde o teste tinha 68% e tanque com 70%, a inclusão de 10% reduziu a estabilidade (68%), também alterou pH e inclusões de 20% e 40% diminuiu pH e aumentou iCa. De forma semelhante, a inclusão de 20% ou mais de leite com estabilidade maior (74%) que o leite de tanque (68%) aumentou a estabilidade, juntamente com o pH e acidez. Por outro lado, a inclusão de leite testado (68%) com estabilidade similar com o leite de tanque (68%), não modificou as variáveis estudadas.

Considerando vacas em lactação estendida, a inclusão de 20 e 40% de leite testado com estabilidade menor (68%) que o leite de tanque (76%), diminuiu a estabilidade do tanque, havendo aumento na acidez, diminuição de pH sem alterar iCa. Quando o leite testado tem estabilidade maior que o leite de tanque, a adição de 20% ou mais de leite teste aumentou a estabilidade, pH e reduziu iCa, não alterando a acidez. Por outro lado, quando o leite testado tem estabilidade similar com o leite de tanque, não ocorreu modificação das variáveis estudadas.

A análise de regressão (amostras de leite de animais, sem mistura com leite de tanque) evidenciou que em leite de vacas ao início da lactação, o cálcio iônico foi a única variável que explicou de forma expressiva a estabilidade do leite ao teste do álcool, diminuindo a mesma. A estabilidade no teste do álcool aumentou com o incremento do valor de pH, mas se reduziu com o aumento do valor de iCa (Figuras 4, 5). Essa relação varia conforme o estágio de lactação, e se destaca o efeito negativo do iCa sobre a estabilidade. À medida que aumenta o pH (Figura 4 e 5) a estabilidade do leite no teste do álcool também aumenta. Em nossos resultados, leite do início de lactação tiveram 83,33% entre pH 6,4 e 6,8, enquanto leite de lactação estendida esse valor foi de 50,68%.

O pH com valor mais baixo é natural do leite no início da lactação (COSTA et al., 2014). Estudo realizado anteriormente (DONATELE et al., 2003) mostra que 89,55% das amostras positivas no teste do álcool tiveram pH entre 6,4 e 6,8, outras 10,45% o pH foi maior que 6,8. Nenhuma das amostras apresentou pH menor que 6,4. Leite de maior estabilidade apresentam pH próximo a 6,7, pois ocorre agregação de proteínas do soro (albumina e globulina), enquanto em pH acima de 6,9 ocorre a dissociação de soro proteínas e k- caseína (O'CONNELL et al., 2000).

O teor de iCa elevado como em leite de início (Figura 4) e final de lactação (Figura 5) explica os baixos valores da estabilidade, apresentando os maiores coeficientes de determinação. Os valores de iCa e pH são inversamente proporcionais (BARROS, 2002.; BARBOSA et al., 2006b).

A mistura de duas amostras de leite com perfis diferentes resulta em um perfil na curva de estabilidade ao etanol de acordo com a amostra com maior volume. A posição de estabilidade ao longo do eixo de pH é determinada pelos fatores da fase de soro (HORNE et al., 1981).

Podemos concluir que a inclusão de leite de estabilidade menor que leite de tanque em percentuais iguais ou acima de 20% merecem atenção, pois promovem a redução da estabilidade, alterando o pH e cálcio iônico do tanque.

A estabilidade no teste do álcool aumentou com o incremento do valor de pH, mas se reduziu com o valor de iCa (Figuras 4, 5). Essa relação varia conforme o estágio de lactação, e se destaca o efeito negativo do iCa sobre a estabilidade, apresentando R^2 de 0,40. À medida que aumenta o pH (FIGURA 4 e 5) a estabilidade do leite no teste do álcool também aumenta. Em nossos resultados leite do início de lactação tiveram 83,33% entre pH 6,4 e 6,8, enquanto leite de lactação estendida esse valor foi de 50,68%. O pH com valores mais baixos é natural do leite no início da lactação (Costa *et al.*, 2014).

Em mistura de leite com estabilidades similares entre indivíduo e conjunto, ocorreu o aumento de pH e cálcio, diminuindo a acidez sem modificar a estabilidade da mistura.

Quando o leite individual apresenta estabilidade maior comparado ao leite de conjunto, a adição de 10, 20 e 40% melhora os valores de estabilidade no leite de conjunto.

Tabela 7 Valores de estabilidade ao teste do álcool, pH, cálcio iônico, acidez em função do percentual de inclusão do leite individual de animal ao início e ao final da lactação

Amostras	ID vacas	Coleta	RACA	DEL	Trat	inclusão	Álcool	pH	Ca2+	Acidez	fatores
T	20	1	TANQUE	TANQUE	3	0	84	6,74	100	22,00	tanque mais estável. Diferenças numéricas com o leite teste: cai, pH, acidez. DEL = 19
5	5	1	HO	19	1	100	68	6,69	266	25,00	
5A	5	1	HO	19	1	2	84	6,73	95,8	25,00	
5B	5	1	HO	19	1	5	84	6,74	95,8	28,00	
5C	5	1	HO	19	1	10	84	6,71	95,8	20,00	
5D	5	1	HO	19	1	20	76	6,69	89,4	23,00	adição de 20% de leite teste reduziu estabilidade: pH x acidez
5E	5	1	HO	19	1	40	76	6,64	131,4	25,00	adição de 40% de leite teste reduziu estabilidade: pH, cai x acidez
T	20	1	TANQUE	TANQUE	3	0	76	6,76	121	20,00	tanque mais estável. Diferenças numéricas com o leite testado: cai, pH, acidez. DEL = 6
6	11	1	HO	6	2	100	68	6,56	151	30,00	
6A	11	1	HO	6	2	2	76	6,77	124	21,00	a adição de leite teste não reduziu estabilidade
6B	11	1	HO	6	2	5	76	6,75	124	22,00	
6B	11	1	HO	6	2	10	76	6,76	123	22,00	
6B	11	1	HO	6	2	20	76	6,73	127	23,00	
6E	11	1	HO	6	2	40	76	6,66	120	25,00	
T	20	2	TANQUE	TANQUE	3	0	70	6,62	101	34,00	tanque mais estável. Diferenças numéricas com o leite teste: cai, acidez. DEL =29
21	5	2	HO	29	1	100	68	6,63	221	21,00	
21A	5	2	HO	29	1	2	70	6,6	89,7	26,00	

21B	5	2	HO	29	1	5	70	6,5	124	26,00	
21C	5	2	HO	29	1	10	68	6,56	104	28,00	adição de 10% de leite teste reduziu estabilidade: pH
21D	5	2	HO	29	1	20	68	6,56	111	25,00	adição de 20% de leite teste reduziu estabilidade: pH x cai
21E	5	2	HO	29	1	40	68	6,54	116	24,00	adição de 40% de leite teste reduziu estabilidade: pH, cai
T	20	2	TANQUE	TANQUE	3	0	70	6,82	126	24,00	tanque MENOS estável. Diferenças numericas de pH, e acidez. DEL = 11.
27	11	2	HO	11	1	100	74	6,73	124	21,00	

27A	11	2	HO	11	1	2	70	6,81	120	20,00	
27B	11	2	HO	11	1	5	70	6,81	98,4	21,00	
27C	11	2	HO	11	1	10	70	6,81	112	16,00	
27D	11	2	HO	11	1	20	68	6,8	99,2	22,00	adição de 20% reduziu estabilidade. Sem identificação causa redução estabilidade
27E	11	2	HO	11	1	40	68	6,76	98,5	27,00	adição de 40% reduziu estabilidade. Maior acidez
T	20	3	TANQUE	TANQUE	3	0	76	6,71	98,3	22,00	tanque mais estável. Del = 34. diferenças de pH e cai
36	5	3	HO	34	1	100	68	6,49	149	22,00	
36A	5	3	HO	34	1	2	74	6,57	67,4	27,00	
36B	5	3	HO	34	1	5	74	6,73	71,2	26,00	
36C	5	3	HO	34	1	10	74	6,63	68,7	22,00	
36D	5	3	HO	34	1	20	74	6,57	93,8	18,00	
36E	5	3	HO	34	1	40	68	6,52	87,1	21,00	adição de 40% reduziu estabilidade. Menor pH e cai

T	20	3	TANQUE	TANQUE	3	0	68	6,72	102	21,00	tanque MENOS estável. Pequenas diferenças numéricas de pH, e acidez. DEL = 16.
43	11	3	HO	16	1	100	74	6,63	79,9	22,00	
43A	11	3	HO	16	1	2	68	6,76	79,9	17,00	
43B	11	3	HO	16	1	5	68	6,74	79,9	17,00	
43C	11	3	HO	16	1	10	68	6,74	85,6	15,00	
43D	11	3	HO	16	1	20	68	6,73	106	18,00	
43E	11	3	HO	16	1	40	68	6,75	100	18,00	a adição de até 40% leite teste não aumentou a estabilidade
T	20	3	TANQUE	TANQUE	3	0	68	6,46	77,3	20,00	tanque MENOS estável. Menores valores de pH, cai e maior acidez. DEL = 16
49	18	1	HO	16	1	100	70	6,53	91	17,00	
49A	18	1	HO	16	1	2	68	6,73	75,3	15,00	
49B	18	1	HO	16	1	5	68	6,72	74	18,00	
49C	18	1	HO	16	1	10	68	6,7	72,1	20,00	
49D	18	1	HO	16	1	20	68	6,69	73,4	19,00	
49E	18	1	HO	16	1	40	68	6,63	69,2	24,00	adição de até 40% de leite mais estável não modificou a estabilidade do tanque

T	20	3	TANQUE	TANQUE	3	0	70	6,55	103	20,00	tanque MENOS estável. Menores valores de cai. DEL = 23
51	18	2	HO	23	1	100	72	6,48	73,7	23,00	
51A	18	2	HO	23	1	2	70	6,74	61,6	20,00	
51B	18	2	HO	23	1	5	70	6,73	71,8	18,00	

51C	18	2	HO	23	1	10	70	6,72	65,6	19,00	
51D	18	2	HO	23	1	20	70	6,71	66,2	22,00	
51E	18	2	HO	23	1	40	72	6,67	62,8	20,00	adição de 40% de leite teste aumentou a estabilidade. Menor valor de cai
T	20	3	TANQUE	TANQUE	3	0	68	6,54	120	19,00	tanque MENOS estável. Menor valor de acidez. DEL = 30
53	18	3	HO	30	1	100	74	6,53	116	23,00	
53A	18	3	HO	30	1	2	68	6,84	91,3	20,00	
53B	18	3	HO	30	1	5	68	6,84	92,1	21,00	
53C	18	3	HO	30	1	10	74	6,85	89,1	21,00	adição de 10% ou mais de leite teste aumentou a estabilidade. Maior pH, menor cai,
53D	18	3	HO	30	1	20	74	6,85	87,6	21,00	
53E	18	3	HO	30	1	40	74	6,83	78,7	20,00	
T	20	3	TANQUE	TANQUE	3	0	68	6,46	77,3	20,00	sem diferença de estabilidade do tanque e leite teste, mas menor valor de cai. DEL = 19
50	19	1	JH	12	1	100	68	6,52	102,2	19,00	
50A	19	1	JH	12	1	2	68	6,68	65,1	15,00	
50B	19	1	JH	12	1	5	68	6,72	64,5	17,00	
50C	19	1	JH	12	1	10	68	6,73	67,9	14,00	
50D	19	1	JH	12	1	20	68	6,72	72,1	15,00	
50E	19	1	JH	12	1	40	68	6,72	76,6	17,00	adição de até 40% de leite mais estável não modificou a estabilidade do tanque
T	20	3	TANQUE	TANQUE	3	0	70	6,55	103	20,00	tanque MENOS estável. Maior cai e Menor valor de acidez. DEL = 19

52	19	2	JH	23	1	100	74	6,58	88,2	22,00	
52A	19	2	JH	23	1	2	70	6,75	72,4	21,00	
52B	19	2	JH	23	1	5	70	6,74	68	20,00	
52C	19	2	JH	23	1	10	72	6,73	66,8	22,00	

52D	19	2	JH	23	1	20	74	6,73	71,8	19,00	adição de 10 e principalmente 20 e 40% leite teste aumentou estabilidade. Menor cai e acidez
52E	19	2	JH	23	1	40	74	6,71	67,4	19,00	
T	20	3	TANQUE	TANQUE	3	0	68	6,54	120	19,00	tanque MENOS estável. Maior cai e Menor valor de acidez. DEL = 18
54	19	3	JH	18	1	100	74	6,87	82	20,00	
54A	19	3	JH	18	1	2	70	6,77	86,2	19,00	
54B	19	3	JH	18	1	5	70	6,81	87,6	19,00	
54C	19	3	JH	18	1	10	70	6,83	85,5	20,00	
54D	19	3	JH	18	1	20	74	6,85	73,4	20,00	adição de 20 e 40% aumentaram estabilidade, pH, reduzindo cai sem alterar expressivamente acidez
54E	19	3	JH	18	1	40	74	6,88	72,5	20,00	
T	20	1	TANQUE	TANQUE	3	0	84	6,74	100	22,00	elevada estabilidade tanque e leite teste. Sem efeitos
1	1	1	HO	604	2	100	84	6,94	98,3	20,00	
1A	1	1	HO	604	2	2	84	6,74	92,6	26,00	
1B	1	1	HO	604	2	5	84	6,76	92,6	24,00	
1C	1	1	HO	604	2	10	84	6,78	81,4	23,00	

1D	1	1	HO	604	2	20	84	6,78	95,8	22,00	
1E	1	1	HO	604	2	40	84	6,81	83,5	21,00	
T	20	1	TANQUE	TANQUE	3	0	84	6,74	100	22,00	elevada estabilidade tanque e leite teste. Sem efeitos
2	2	1	JE	466	2	100	84	6,8	102	22,00	
2A	2	1	JE	466	2	2	84	6,77	90,2	21,00	
2B	2	1	JE	466	2	5	84	6,73	93,4	26,00	
2C	2	1	JE	466	2	10	84	6,76	95,2	21,00	
2D	2	1	JE	466	2	20	84	6,77	81,4	22,00	
2E	2	1	JE	466	2	40	84	6,82	82,8	26,00	
T	20	1	TANQUE	TANQUE	3	0	84	6,74	100	22,00	elevada estabilidade tanque e leite teste. Sem efeitos
3	3	1	HO	517	2	100	84	6,71	96,6	24,00	
3A	3	1	HO	517	2	2	84	6,65	92,5	23,00	

3B	3	1	HO	517	2	5	84	6,76	91,8	25,00	
3C	3	1	HO	517	2	10	84	6,73	99,1	23,00	
3D	3	1	HO	517	2	20	84	6,76	98,3	25,00	
3E	3	1	HO	517	2	40	84	6,75	92,6	20,00	
T	20	1	TANQUE	TANQUE	3	0	84	6,74	100	22,00	elevada estabilidade tanque e leite teste. Sem efeitos
4	4	1	HO	431	2	100	84	6,69	106	20,00	
4A	4	1	HO	431	2	2	84	6,67	84,2	22,00	

4B		4	1	HO	431	2	5	84	6,74	88,7	26,00	
4C		4	1	HO	431	2	10	84	6,73	89,4	22,00	
4D		4	1	HO	431	2	20	84	6,76	87,2	22,00	
4E		4	1	HO	431	2	40	84	6,76	87,9	23,00	
T		20	1	TANQUE	TANQUE	3	0	76	6,76	121	20,00	elevada estabilidade tanque e leite teste. Sem efeitos
	7	12	1	GI	715	2	100	86	7,14	75,8	15,00	
7A		12	1	GI	715	2	2	86	6,78	106	20,00	
7B		12	1	GI	715	2	5	86	6,8	116	20,00	
7C		12	1	GI	715	2	10	86	6,82	118	20,00	
7D		12	1	GI	715	2	20	86	6,84	117	23,00	
7E		12	1	GI	715	2	40	86	6,89	109	21,00	
T		20	1	TANQUE	TANQUE	3	0	76	6,76	121	20,00	elevada estabilidade tanque. Sem efeitos
	9	14	1	JH	353	2	100	68	7,01	122	17,00	
9A		14	1	JH	353	2	2	76	6,79	116	20,00	
9B		14	1	JH	353	2	5	76	6,79	109	19,00	
9C		14	1	JH	353	2	10	76	6,8	130	19,00	
9D		14	1	JH	353	2	20	76	6,62	121	22,00	
9E		14	1	JH	353	2	40	76	6,85	121	25,00	
T		20	1	TANQUE	TANQUE	3	0	76	6,76	121	20,00	Tanque com MENOR estabilidade, menor pH, cai e acidez. Leite teste com elevada estabilidade.

10	15	1	HO	450	2	100	86	7,18	52	16,00	
10A	15	1	HO	450	2	2	76	6,79	102	19,00	
10B	15	1	HO	450	2	5	76	6,8	106	21,00	

10C	15	1	HO	450	2	10	76	6,82	109	21,00	
10D	15	1	HO	450	2	20	84	6,84	94,8	23,00	adição de 20 e 40% de leite teste elevou estabilidade, baixando cai
10E	15	1	HO	450	2	40	84	6,92	88,3	20,00	
T	20	1	TANQUE	TANQUE	3	0	76	6,76	121	20,00	tanque com maior estabilidade. Menos cai e acidez.
11	16	1	JH	574	2	100	68	6,73	135	17,00	
11A	16	1	JH	574	2	2	76	6,8	90,6	21,00	
11B	16	1	JH	574	2	5	76	6,79	91,5	20,00	
11C	16	1	JH	574	2	10	76	6,78	89	18,00	
11D	16	1	JH	574	2	20	72	6,8	91,5	24,00	
11E	16	1	JH	574	2	40	68	6,8	93,1	21,00	adição de 20 e 40% de leite teste. Acidez aumentou, mas cai não
T	20	1	TANQUE	TANQUE	3	0	84	6,85	102	25,00	tanque com maior estabilidade. Maior cai e acidez.
12	6	1	JE	698	2	100	80	6,85	80,4	20,00	
12A	6	1	JE	698	2	2	84	6,8	72,5	25,00	
12B	6	1	JE	698	2	5	84	6,81	79,5	22,00	
12C	6	1	JE	698	2	10	84	6,81	73,3	23,00	
12D	6	1	JE	698	2	20	84	6,84	86	23,00	

12E	6	1	JE	698	2	40	80	6,75	73,9	25,00	adição de 40% leite teste reduziu estabilidade (mas ainda permaneceu em nível elevado). acidez similar
T	20	1	TANQUE	TANQUE	3	0	84	6,85	102	25,00	elevada estabilidade tanque. Sem efeitos
13	7	1	JE	545	2	100	84	6,79	83,1	25,00	
13A	7	1	JE	545	2	2	84	6,83	80,4	24,00	
13B	7	1	JE	545	2	5	84	6,82	70,7	23,00	
13C	7	1	JE	545	2	10	84	6,8	68,5	21,00	
13D	7	1	JE	545	2	20	84	6,8	86	30,00	
13E	7	1	JE	545	2	40	84	6,79	76,4	21,00	
T	20	1	TANQUE	TANQUE	3	0	84	6,85	102	25,00	elevada estabilidade tanque. Sem efeitos
14	8	1	JE	445	2	100	84	6,83	108	22,00	
14A	8	1	JE	445	2	2	84	6,8	68,5	25,00	
14B	8	1	JE	445	2	5	84	6,82	68,5	24,00	

14C	8	1	JE	445	2	10	84	6,8	77,7	25,00	
14D	8	1	JE	445	2	20	84	6,82	98,5	22,00	
14E	8	1	JE	445	2	40	84	6,84	89,7	21,00	
T	20	1	TANQUE	TANQUE	3	0	84	6,85	102	25,00	elevada estabilidade tanque. Sem efeitos
15	9	1	JE	634	2	100	86	6,87	72,1	25,00	
15A	9	1	JE	634	2	2	86	6,87	71,5	23,00	

15B	9	1	JE	634	2	5	86	6,85	106	22,00	
15C	9	1	JE	634	2	10	86	6,87	67,4	23,00	
15D	9	1	JE	634	2	20	86	6,82	72,7	23,00	
15E	9	1	JE	634	2	40	86	6,88	76,4	21,00	
T	20	1	TANQUE	TANQUE	3	0	84	6,85	102	25,00	
16	10	1	JE	472	2	100	84	6,75	81,1	27,00	elevada estabilidade tanque. Sem efeitos
16A	10	1	JE	472	2	2	84	6,87	96,7	23,00	
16B	10	1	JE	472	2	5	84	6,8	78,4	22,00	
16C	10	1	JE	472	2	10	84	6,79	77,7	22,00	
16D	10	1	JE	472	2	20	84	6,78	76,4	21,00	
16E	10	1	JE	472	2	40	84	6,84	83,8	24,00	
T	20	2	TANQUE	TANQUE	3	0	70	6,62	101	34,00	Tanque com MENOR estabilidade, menor pH, MAIOR cai e acidez.
17	4	2	HO	441	2	100	76	6,72	80,5	31,00	
17A	4	2	HO	441	2	2	70	6,51	86,1	23,00	adição de 5 a 40% aumentaram a estabilidade
17B	4	2	HO	441	2	5	74	6,64	80,5	25,00	
17C	4	2	HO	441	2	10	74	6,62	95,1	28,00	
17D	4	2	HO	441	2	20	74	6,65	81,9	29,00	
17E	4	2	HO	441	2	40	76	6,57	83,9	23,00	
T	20	2	TANQUE	TANQUE	3	0	70	6,62	101	34,00	Tanque com MENOR estabilidade, menor pH, MAIOR cai e acidez.

18	3	2	HO	527	2	100	72	6,69	81,9	25,00	
18A	3	2	HO	527	2	2	70	6,64	81,9	25,00	
18B	3	2	HO	527	2	5	70	6,5	97,5	26,00	
18C	3	2	HO	527	2	10	70	6,52	92	27,00	
18D	3	2	HO	527	2	20	70	5,55	95,2	24,00	
18E	3	2	HO	527	2	40	72	6,59	101	26,00	adição de 40% leite teste aumentou estabilidade. Menor acidez
T	20	2	TANQUE	TANQUE	3	0	70	6,62	101	34,00	Tanque com MENOR estabilidade, menor pH, MAIOR cai e acidez.
19	1	2	HO	614	2	100	76	6,76	111	25,00	
19A	1	2	HO	614	2	2	70	6,62	86,1	26,00	
19B	1	2	HO	614	2	5	70	6,48	112	25,00	
19C	1	2	HO	614	2	10	70	6,55	98,3	25,00	
19D	1	2	HO	614	2	20	74	6,59	114	27,00	
19E	1	2	HO	614	2	40	76	6,67	83,9	24,00	adição de 20 e 40 % de leite teste aumentou a estabilidade. Menor cai e acidez
T	20	2	TANQUE	TANQUE	3	0	70	6,62	101	34,00	tanque com MENOR estabilidade, especialmente acidez
20	2	2	JE	476	2	100	76	6,76	96,7	26,00	
20A	2	2	JE	476	2	2	70	6,63	93,5	26,00	
20B	2	2	JE	476	2	5	70	6,53	79,8	23,00	
20C	2	2	JE	476	2	10	74	6,54	92	26,00	adição de 10, 20 e 40% elevaram estabilidade.acidez menor

20D	2	2	JE	476	2	20	74	6,55	103	23,00	
20E	2	2	JE	476	2	40	74	6,65	89	25,00	
T	20	2	TANQUE	TANQUE	3	0	76	6,93	101	20,00	tanque com estabilidade similar ao leite testado
22	10	2	JE	482	2	100	76	6,83	88	20,00	
22A	10	2	JE	482	2	2	74	6,92	91,8	20,00	sem explicação pra efeitos de 2 e 5%
22B	10	2	JE	482	2	5	74	6,93	88,7	15,00	
22C	10	2	JE	482	2	10	76	6,92	77,4	22,00	
22D	10	2	JE	482	2	20	76	6,9	94,2	23,00	
22E	10	2	JE	482	2	40	76	6,87	100	22,00	
T	20	2	TANQUE	TANQUE	3	0	76	6,93	101	20,00	tanque com estabilidade maior que o leite teste. Maior cai e menor acidez
23	8	2	JE	455	2	100	74	6,81	80,1	24,00	
23A	8	2	JE	455	2	2	74	6,92	92,6	21,00	
23B	8	2	JE	455	2	5	76	6,92	92,6	21,00	

23C	8	2	JE	455	2	10	76	6,93	128	20,00	
23D	8	2	JE	455	2	20	76	6,9	101	20,00	
23E	8	2	JE	455	2	40	76	6,87	107	24,00	sem explicação efeito
T	20	2	TANQUE	TANQUE	3	0	76	6,93	101	20,00	tanque e leite teste com estabilidade parecida. Valores de cai e pH parecidos.
24	9	2	JE	644	2	100	76	6,93	95	23,00	sem efeito mistura
24A	9	2	JE	644	2	2	76	6,93	114	19,00	

24B		9	2	JE	644	2	5	76	6,91	99,2	21,00	
24C		9	2	JE	644	2	10	76	6,93	92,6	23,00	
24D		9	2	JE	644	2	20	76	6,94	91,5	23,00	
24E		9	2	JE	644	2	40	76	6,44	92,6	23,00	
T		20	2	TANQUE	TANQUE	3	0	76	6,93	101	20,00	tanque com maior estabilidade que o leite teste. Maior cai e menor acidez
	25	7	2	JE	555	2	100	74	6,87	92,6	22,00	
25A		7	2	JE	555	2	2	76	6,92	114	21,00	
25B		7	2	JE	555	2	5	76	6,92	94,2	20,00	
25C		7	2	JE	555	2	10	76	6,92	114	20,00	
25D		7	2	JE	555	2	20	76	6,92	95,8	23,00	
25E		7	2	JE	555	2	40	74	6,89	109	23,00	adição de 40% de leite teste reduziu a estabilidade. Maior cai e acidez
T		20	2	TANQUE	TANQUE	3	0	76	6,93	101	20,00	tanque com estabilidade MENOR que leite teste. Menor pH e acidez , maior cai
	26	6	2	JE	708	2	100	82	7,09	68,7	22,00	
26A		6	2	JE	708	2	2	76	6,95	92,6	22,00	
26B		6	2	JE	708	2	5	76	6,93	97,5	16,00	
26C		6	2	JE	708	2	10	76	6,97	91,8	23,00	
26D		6	2	JE	708	2	20	76	6,96	90,3	20,00	
26E		6	2	JE	708	2	40	80	7,02	86,5	18,00	adição de 40% de leite teste aumentou a estabilidade, baixou cai e acidez e elevou pH
T		20	2	TANQUE	TANQUE	3	0	70	6,82	126	24,00	tanque com estabilidade maior que o leite teste. Menor cai

28	16	2	JH	579	2	100	68	6,89	145	24,00	sem efeito das misturas
28A	16	2	JH	579	2	2	68	6,78	94,5	16,00	

28B	16	2	JH	579	2	5	68	6,81	101	18,00	
28C	16	2	JH	579	2	10	68	6,82	101	20,00	
28D	16	2	JH	579	2	20	68	6,82	102	20,00	
28E	16	2	JH	579	2	40	68	6,83	99,2	25,00	
T	20	2	TANQUE	TANQUE	3	0	70	6,82	126	24,00	tanque com estabilidade MENOR que leite teste. Menor pH , maior cai e acidez
29	13	2	JE	673	2	100	74	7,27	76,1	22,00	
29A	13	2	JE	673	2	2	70	68	102	21,00	
29B	13	2	JE	673	2	5	70	6,82	104	21,00	
29C	13	2	JE	673	2	10	70	6,83	112	22,00	
29D	13	2	JE	673	2	20	70	6,84	126	20,00	
29E	13	2	JE	673	2	40	72	6,88	85	23,00	adição de 140% aumentou estabilidade, pH, reduziu cai e acidez
T	20	2	TANQUE	TANQUE	3	0	70	6,82	126	24,00	tanque com estabilidade maior que o leite teste. Maior pH, maior cai e menor acidez
30	12	2	GI	720	2	100	68	6,9	167	14,00	
30A	12	2	GI	720	2	2	74	6,84	109	16,00	
30B	12	2	GI	720	2	5	74	6,87	114	22,00	
30C	12	2	GI	720	2	10	74	6,83	123	18,00	
30D	12	2	GI	720	2	20	70	6,86	113	20,00	adição de 20 e 40% de leite teste elevou estabilidade, baixando cai e acidez

30E	12	2	GI	720	2	40	70	6,88	112	19,00	
T	20	2	TANQUE	TANQUE	3	0	70	6,82	126	24,00	tanque com menor estabilidade que leite teste. Menor pH e maior cai
31	14	2	JH	358	2	100	80	7,25	70	24,00	
31A	14	2	JH	358	2	2	70	6,83	110	20,00	
31B	14	2	JH	358	2	5	74	6,81	108	20,00	
31C	14	2	JH	358	2	10	74	6,83	105	28,00	
31D	14	2	JH	358	2	20	74	6,87	99,2	19,00	
31E	14	2	JH	358	2	40	76	6,93	102	22,00	adição de 5, 10, 20 e 40% elevaram estabilidade, especialmente de 40%. Menor cai
T	20	2	TANQUE	TANQUE	3	0	70	6,82	126	24,00	tanque com menor estabilidade que leite teste. Menor pH e maior cai
32	15	2	HO	455	2	100	82	7,14	93,5	24,00	

32A	15	2	HO	455	2	2	70	6,81	107	20,00	
32B	15	2	HO	455	2	5	70	6,82	103	22,00	
32C	15	2	HO	455	2	10	74	6,83	98,4	20,00	
32D	15	2	HO	455	2	20	76	6,89	102	28,00	
32E	15	2	HO	455	2	40	82	6,94	95,3	19,00	adição de 10, 20 e 40% elevaram estabilidade. cai menor
T	20	3	TANQUE	TANQUE	3	0	76	6,71	98,3	22,00	tanque com estabilidade igual ao leite testado. Sem efeitos
33	4	3	HO	446	2	100	76	6,73	98,3	26,00	
33A	4	3	HO	446	2	2	76	6,62	77,6	23,00	

33B	4	3	HO	446	2	5	76	6,57	73,2	21,00	
33C	4	3	HO	446	2	10	76	6,61	77,3	21,00	
33D	4	3	HO	446	2	20	76	6,56	79,5	23,00	
33E	4	3	HO	446	2	40	76	6,69	73,2	23,00	
T	20	3	TANQUE	TANQUE	3	0	76	6,71	98,3	22,00	tanque com estabilidade igual ao leite testado. Sem efeitos
34	2	3	JE	481	2	100	76	6,72	71,9	27,00	
34A	2	3	JE	481	2	2	76	6,54	122	23,00	
34B	2	3	JE	481	2	5	76	6,61	15,9	22,00	
34C	2	3	JE	481	2	10	76	6,59	109	19,00	
34D	2	3	JE	481	2	20	76	6,56	75,9	20,00	
34E	2	3	JE	481	2	40	76	6,56	78,1	14,00	
T	20	3	TANQUE	TANQUE	3	0	76	6,71	98,3	22,00	
35	1	3	HO	621	2	100	76	6,65	104	21,00	
35A	1	3	HO	621	2	2	76	6,57	82	21,00	
35B	1	3	HO	621	2	5	76	6,6	63,2	26,00	
35C	1	3	HO	621	2	10	76	6,6	65	23,00	
35D	1	3	HO	621	2	20	76	6,56	63,8	22,00	
35E	1	3	HO	621	2	40	76	6,58	6	15,00	
T	20	3	TANQUE	TANQUE	3	0	76	6,71	98,3	22,00	tanque com MENOR estabilidade que leite teste. maior cai

37	3	3	HO	532	2	100	78	6,72	84,9	23,00	
37A	3	3	HO	532	2	2	78	6,64	84,8	22,00	
37B	3	3	HO	532	2	5	78	6,57	85,6	23,00	
37C	3	3	HO	532	2	10	76	6,56	80,2	17,00	a aprtir de 10% a estabilidade se reduziu.
37D	3	3	HO	532	2	20	76	6,55	79,5	22,00	
37E	3	3	HO	532	2	40	76	6,64	90,1	21,00	
T	20	3	TANQUE	TANQUE	3	0	76	6,99	100	22,00	tanque e leite teste com estabilidade parecida. Maior pH, cai e menor acidez
38	9	3	JE	649	2	100	76	6,72	82,4	25,00	sem efeitos das misturas
38A	9	3	JE	649	2	2	76	6,82	71,5	23,00	
38B	9	3	JE	649	2	5	76	6,9	84,9	23,00	
38C	9	3	JE	649	2	10	76	6,91	83,4	18,00	
38D	9	3	JE	649	2	20	76	6,94	56,5	24,00	
38E	9	3	JE	649	2	40	76	6,9	56,5	25,00	
T	20	3	TANQUE	TANQUE	3	0	76	6,99	100	22,00	tanque e leite teste com estabilidade parecida. Maior pH, cai e menor acidez
39	7	3	JE	560	2	100	76	6,64	89,5	26,00	sem efeitos das misturas
39A	7	3	JE	560	2	2	76	6,72	88,9	24,00	
39B	7	3	JE	560	2	5	76	6,7	72,8	24,00	
39C	7	3	JE	560	2	10	76	6,71	63,6	21,00	
39D	7	3	JE	560	2	20	76	6,71	63	18,00	

39E	7	3	JE	560	2	40	76	6,71	64,7	23,00	
T	20	3	TANQUE	TANQUE	3	0	76	6,99	100	22,00	tanque e leite teste com estabilidade parecida. Maior pH, cai e menor acidez
40	6	3	JE	713	2	100	76	6,64	82,4	24,00	
40A	6	3	JE	713	2	2	76	6,7	72,8	22,00	sem efeitos das misturas
40B	6	3	JE	713	2	5	76	6,71	81,2	24,00	
40C	6	3	JE	713	2	10	76	6,72	85,7	27,00	
40D	6	3	JE	713	2	20	76	6,78	72,8	21,00	
40E	6	3	JE	713	2	40	76	6,8	69,6	22,00	
T	20	3	TANQUE	TANQUE	3	0	76	6,99	100	22,00	tanque e leite teste com estabilidade parecida. Maior pH, cai e menor acidez
41	8	3	JE	460	2	100	76	6,7	88,7	27,00	
41A	8	3	JE	460	2	2	76	6,85	54	21,00	sem efeitos das misturas
41B	8	3	JE	460	2	5	76	6,85	57,5	18,00	

41C	8	3	JE	460	2	10	76	6,86	67,1	20,00	
41D	8	3	JE	460	2	20	76	6,87	69,6	23,00	
41E	8	3	JE	460	2	40	76	6,88	50,2	24,00	
T	20	3	TANQUE	TANQUE	3	0	76	6,99	100	22,00	tanque e leite teste com estabilidade parecida. Maior pH, cai e menor acidez
42	10	3	JE	487	2	100	76	6,64	92	26,00	
42A	10	3	JE	487	2	2	76	6,7	74,1	23,00	sem efeitos das misturas
42B	10	3	JE	487	2	5	76	6,7	48,9	23,00	

42C	10	3	JE	487	2	10	76	6,78	49,8	22,00	
42D	10	3	JE	487	2	20	76	6,78	64,1	22,00	
42E	10	3	JE	487	2	40	76	6,8	64,7	24,00	
T	20	3	TANQUE	TANQUE	3	0	68	6,72	102	21,00	tanque com MENOR estabilidade que o leite teste. Menor pH, maior cai e acidez similar
44	15	3	HO	460	2	100	82	7,22	95	22,00	
44A	15	3	HO	460	2	2	70	6,77	111	18,00	
44B	15	3	HO	460	2	5	74	6,76	105	17,00	
44C	15	3	HO	460	2	10	74	6,81	99,1	24,00	
44D	15	3	HO	460	2	20	76	6,84	79,9	15,00	
44E	15	3	HO	460	2	40	76	6,9	88,6	17,00	
T	20	3	TANQUE	TANQUE	3	0	68	6,72	102	21,00	tanque com estabilidade similar ao leite testado
45	16	3	JH	584	2	100	68	6,91	189	22,00	sem efeitos adiçao de leite teste
45A	16	3	JH	584	2	2	68	6,75	142	17,00	
45B	16	3	JH	584	2	5	68	6,76	126	20,00	
45C	16	3	JH	584	2	10	68	6,73	124	19,00	
45D	16	3	JH	584	2	20	68	6,82	118	16,00	
45E	16	3	JH	584	2	40	68	6,78	113	18,00	
T	20	3	TANQUE	TANQUE	3	0	68	6,72	102	21,00	tanque com estabilidade MENOR que leite teste.valor menor de pH, maior de cai e de acidez
46	13	3	JE	678	2	100	76	7,36	72	20,00	

46A	13	3	JE	678	2	2	70	7,1	95	18,00	
46B	13	3	JE	678	2	5	70	7,11	81,3	22,00	
46C	13	3	JE	678	2	10	70	7,12	88,2	20,00	
46D	13	3	JE	678	2	20	74	7,2	90	17,00	
46E	13	3	JE	678	2	40	74	7,24	95	22,00	adição de 20 e 40% de leite teste aumentaram a estabilidade. Sem identificação de fator
T	20	3	TANQUE	TANQUE	3	0	68	6,72	102	21,00	tanque com estabilidade MENOR que leite teste.valor menor de pH, maior de cai
47	14	3	JH	363	2	100	70	6,86	71,4	22,00	
47A	14	3	JH	363	2	2	74	6,81	104	20,00	
47B	14	3	JH	363	2	5	72	6,81	109	16,00	
47C	14	3	JH	363	2	10	72	6,81	109	15,00	
47D	14	3	JH	363	2	20	68	6,85	94,1	17,00	
47E	14	3	JH	363	2	40	68	6,82	95	13,00	adição de 20 e 40% de leite teste (com maior estabilidade) reduziu a estabilidade. Sem explicação
T	20	3	TANQUE	TANQUE	3	0	68	6,72	102	21,00	tanque com estabilidade similar ao leite testado
48	12	3	GI	725	2	100	68	7,17	165	15,00	sem efeitos adição de leite teste
48A	12	3	GI	725	2	2	68	6,77	108	15,00	
48B	12	3	GI	725	2	5	68	6,8	85,6	15,00	
48C	12	3	GI	725	2	10	68	6,81	82	15,00	
48D	12	3	GI	725	2	20	68	6,86	85,6	21,00	

48E	12	3	GI	725	2	40	68	6,94	70,8	12,00	
T	20	1	TANQUE	TANQUE	3	0	76	6,76	121	20,00	tanque com estabilidade menor que o leite teste. Menor valor de p, maior de cai e de acidez
8	13	1	JE	668	1	100	86	7,3	100	13,00	sem efeitos adição de leite teste
8A	13	1	JE	668	1	2	86	6,79	105	20,00	
8B	13	1	JE	668	1	5	86	6,8	100	19,00	
8C	13	1	JE	668	1	10	86	6,82	103	17,00	
8D	13	1	JE	668	1	20	86	6,86	99,1	20,00	
8E	13	1	JE	668	1	40	86	6,92	97,4	18,00	

Amostra= identificação das amostras conforme o número da amostra;

ID vaca = Número da vaca para controle entre as coletas. Só número é o leite testado do animal, número seguido pela letra, condiz com A inclusão de 2%, B-5%, C-10%, D-20% e E-40%. Letra T é leite do conjunto de tanque resfriador;

Coleta = coleta 1, 2 ou 3. Para identificar qual data foi realizada a coleta;

Raça = HO - Holandesa, JE - Jersey, JH – Jersolando e GI – Girolando;

DEL = Dias em lactação, número de dias que o animal está produzindo leite, a partir da data do último parto; Trat

= Tratamento 1= Início de lactação, 2- Lactação estendida e 3- Leite de tanque.

Inclusão é o percentual de inclusão que foi: 0-leite do tanque, 100-leite testado leite individual do animal, 2- 2%, 5-5%, 10-10%, 20 - 20% e 40-40%. Fatores = Comentários sobre as mudanças no leite.

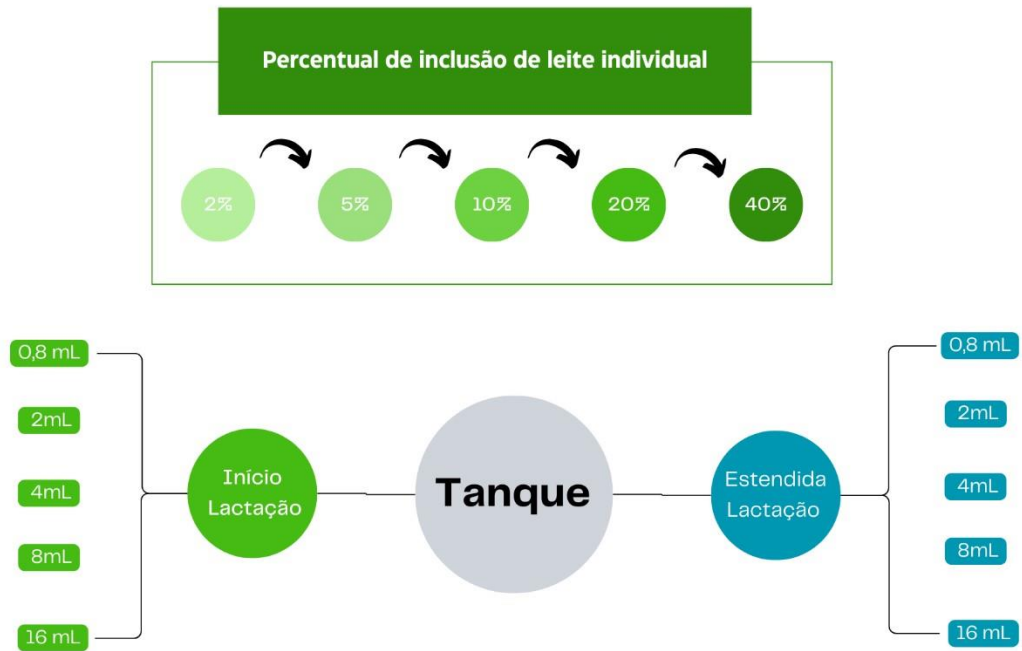


Figura 3 Esquema da metodologia de inclusão do leite

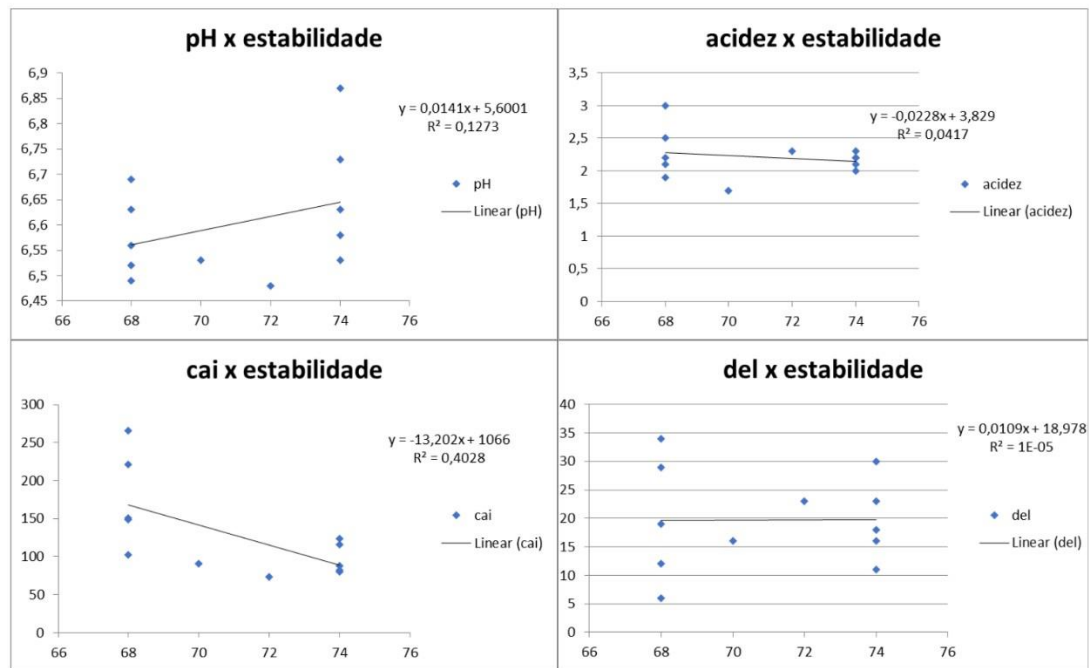


Figura 4 Interação entre estabilidade no teste do álcool e pH, iCa, acidez titulável e Dias em lactação (del) em leite de início de lactação.

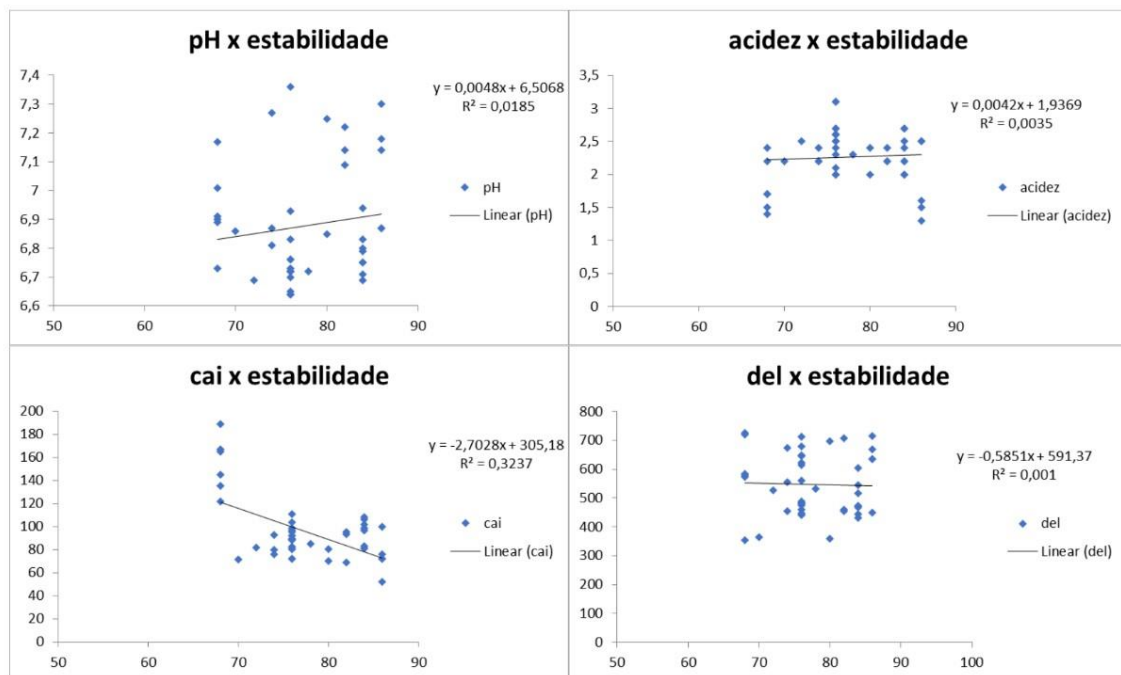


Figura 5 Interação entre estabilidade no teste do álcool e pH, iCa, acidez titulável e dias em lactação (del) em leite de lactação estendida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABREU, Alexandre S. *et al.* Natural tree shade increases milk stability of lactating dairy cows during the summer in the subtropics. **Journal of Dairy Research**, London, v. 87, n. 4, p. 444-447, 2020.

ALESSIO, Dileta Regina Moro *et al.* Lactose and its relationship with other milk constituents, somatic cell count, and total bacterial count. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 252, p. 1-7, 2021.

ALESSIO, Dileta Regina Moro *et al.* Multivariate analysis of lactose content in milk of Holstein and Jersey cows. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 4, p. 2641-2652, 2016.

ALESSIO, Dileta Regina Moro. **Estudo Meta-Analítico e dados do teor de lactose no leite bovino**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2013.

ANEMA, Skelte G. Storage stability and age gelation of reconstituted ultra-high temperature skim milk. **International Dairy Journal**, Barking, v. 75, p. 56-67, 2017.

AULDIST, M. J. *et al.* Effect of somatic cell count and stage of lactation on the quality and storage life of ultra high temperature milk. **Journal of Dairy Research**, London, v. 63, n. 3, p. 377-386, 1996.

BARBOSA, Rosângela Silveira *et al.* Caracterização eletroforética de proteínas e estabilidade do leite em vacas submetidas à restrição alimentar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 4, p. 621-628, 2012.

BARCHIESI-FERRARI, Claudia Gabriella. Inestabilidad de la leche asociada a componentes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 12, p. 1-8, 2007.

BARROS L.; DENIS N.; GONZALEZ A. Prueba del alcohol em leche y relación con calcio iónico. **Veterinary Practice**, Florida, v. 9, p. 315-318, 1999.

BARROS, L. Metabolic disorders that affect milk quality. Use of milk to monitor nutrition and metabolism of dairy cows. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, Rio de Janeiro, v. 44, p. 46-60, 2001.

BARROS, L. Problemas de calidad de leche asociados a la alimentación: estabilidad de la leche. *In: JORNADAS DE LA LECHERÍA*, 2002, Uruguay. **Anais [...]** Uruguay: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, 2002. p 58-68.

BOTARO, Bruno Garcia *et al.* Efeito do polimorfismo do gene da kappa-caseína, da raça e da sazonalidade sobre as características físico-químicas, de composição e de estabilidade do leite bovino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, n. 12, p. 2447-2454, 2009.

BOTARO, Bruno Garcia *et al.* Polimorfismo da beta-lactoglobulina não afeta as características físico-químicas e a estabilidade do leite bovino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 5, p. 747-753, 2007.

BRASIL. Decreto n. 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**: Seção 1, Brasília, DF, ano 154, n. 62, p. 1-76, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n. 68, de 12 dezembro de 2006. **Diário Oficial da União**: Seção 1, Brasília, DF, ano 143, n. 239, p. 8-30, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 76, de 26 de novembro de 2018. **Diário Oficial da União**: Seção 1, Brasília, DF, ano 155, n. 230, p. 9-13, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 370, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UHT (UAT). **Diário Oficial da República da Brasil**, Brasília, DF, v. 14, n. 1, p. 121-128, 1997.

BRITO, Renaldi Feitosa; APARECIDA, Maria. **Qualidade Higiênica do leite**. Juiz de Fora: EMBRAPA, 1998. (EMBRAPA-CNPGL. Documentos, 62).

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

CHEN, B. Y.; GRANDISON, A. S.; LEWIS, M. J. Comparison of heat stability of goat milk subjected to ultra-high temperature and in-container sterilization. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, PA, v. 95, n. 3, p. 1057-1063, 2012.

COSTA, F. F. *et al.* Efeito da temperatura das amostras de leite na concentração de cálcio solúvel e de beta-caseína: interferência no teste de estabilidade frente ao etanol. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 66, n. 2, p. 573-578, 2014.

DALGLEISH, Douglas G.; CORREDIG, Milena. The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. **Annual Review of Food Science and Technology**, Palo Alto, v. 3, n. 1, p. 449-467, 2012.

DATTA, N.; DEETH, H. C. Age gelation of UHT milk: a review. **Food and Bioproducts Processing**: Transactions of the Institution of Chemical Engineers, Part C, Basingstoke, v. 79, n. 4, p. 197-210, 2001.

DAVIES, D. T.; WHITE, J. C. D. 713. The relation between the chemical composition of milk and the stability of the caseinate complex: II. Coagulation by ethanol. **Journal of Dairy Research**, London, v. 25, n. 2, p. 256-266, 1958.

Deeth, H. C.; Lewis, M. J. **High Temperature Processing of Milk and Milk Products**. Chichester: John Wiley & Sons, 2017.

DEETH, H. Improving UHT processing and UHT milk products. *In*: Griffiths, Mansel W. Improving the Safety and Quality of Milk. Oxford: Woodhead Publishing, 2010. p. 302-329.

DEETH, hilton; LEWIS, Mike. Protein Stability in Sterilised Milk and Milk Products. *In*: MCSWEENEY, Paul L. H.; O'MAHONY, James A. **Advanced dairy chemistry**: volume 1B: proteins: applied aspects. New York: Springer, 2016. p. 247-286.

DIKMEN S.; HANSEN P. J. Is the temperature-humidity index the best indicator of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment?. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, PA, v. 92, p. 109-116, 2009.

DIKMEN, S.; HANSEN, P. J. Is the temperature-humidity index the best indicator of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, PA, v. 92, n. 1, p. 109-116, 2009.

DONATELE, D. M.; VIEIRA, L. F. P.; FOLLY, M. M. Relação do teste de Alizarol a 72% (v/v) em leite "in natura" de vaca com acidez e contagem de células somáticas: análise microbiológica. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 7, n. 110, p. 95-100, 2003.

DONNELLY, William J.; HORNE, David S. Relationship between ethanol stability of bovine milk and natural variations in milk composition. **Journal of Dairy Research**, London, v. 53, n. 1, p. 23-33, 1986.

DOSKA, Maria Cecília *et al.* Sources of variation in milk urea nitrogen in Paraná dairy cows. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 41, n. 3, p. 692-697, 2012.

FAGNANI, Rafael; ARAÚJO, João Paulo Andrade de; BOTARO, Bruno Garcia. Field findings about milk ethanol stability: a first report of interrelationship between α -lactalbumin and lactose. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 98, n. 7, p. 2787-2792, 2018.

FAGNANI, Rafael; BELOTI, Vanerli; BATTAGLINI, Ana Paula P. Acid-base balance of dairy cows and its relationship with alcoholic stability and mineral composition of milk. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 5, p. 398-402, 2014.

FISCHER, V *et al.* Leite instável não ácido (LINA): prevenção na propriedade leiteira e impactos nos laticínios. *In*: SIMPÓSIO NACIONAL DE BOVINOCULTURA

LEITEIRA, 3.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE BOVINOCULTURA LEITEIRA, 1., 2011, Viçosa, MG. **Anais [...]**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2011. p. 45-66.

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

FOX, P. F. *et al.* **Dairy chemistry and biochemistry**. 2. ed. Cham: Springer, 2015.

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

GABBI, A. M. *et al.* Corrigendum to “Typology and physical-chemical characterization of bovine milk produced with different productions strategies”. **Agricultural Systems**, v. 121, p. 130-134, 2013.

GABBI, A. M. *et al.* Different levels of supplied energy for lactating cows affect physicochemical attributes of milk. **Journal of Animal and Feed Sciences**, Jabłonna, Poland, v. 27, n. 1, p. 11-17, 2018.

GABBI, Alexandre Mossate *et al.* Milk traits of lactating cows submitted to feed restriction. **Tropical Animal Health and Production**, Edinburgh, v. 48, n. 1, p. 37-43, 2016.

DIAZ GONZALEZ, Felix Hilario; DURR, Joao Walter; FONTANELI, Roberto Serena. **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

HEISLER, Guilherme *et al.* Avaliação das características físico químicas do leite nos primeiros 21 dias de lactação. *In*: Congresso Brasileiro de Qualidade do Leite, 7., 2017, Curitiba. **Anais [...]**. Curitiba: Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite, 2017. p. 221-222.

HOLT, C. Structure and stability of bovine casein micelles. **Advances in protein chemistry**, New York, v. 43, p. 63-151, 1992.

HOLT, Carl. Casein and casein micelle structures, functions and diversity in 20 species. **International Dairy Journal**, Barking, v. 60, p. 2-13, 2016.

HOLT, Carl; SAWYER, Lindsay. Caseins as rheomorphic proteins: Interpretation of primary and secondary structures of the α s1-, β - and κ -caseins. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions**, Cambridge, v. 89, n. 15, p. 2683-2692, 1993.

Horne, D. S. Ethanol Stability and Milk Composition. *In*: McSweeney, P. L. H.; O'Mahony, James A. (ed.). **Advanced Dairy Chemistry: Volume 1B: Proteins: Applied Aspects**. 4. ed. New York: Springer, 2016. p. 225-246.

HORNE, D. S.; PARKER, T. G. Factors affecting the ethanol stability of bovine milk. I. effect of serum phase components. **Journal of Dairy Research**, London, v. 48, n. 2, p. 273-284, 1981.

HORNE, David S. Casein micelles as hard spheres: Limitations of the model in acidified gel formation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 213, n. 2-3, p. 255-263, 2003.

HORNE, David S.; MUIR, D. Donald. Alcohol and Heat Stability of Milk Protein. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, PA, v. 73, n. 12, p. 3613-3626, 1990.

HORNE, David S.; PARKER, Thomas G. Factors affecting the ethanol stability of bovine milk. I. effect of serum phase components. **Journal of Dairy Research**, London, v. 48, n. 2, p. 273-284, 1981.

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

KASSA, F. *et al.* Evaluation of Lactoperoxidase system as raw milk preservative at different storage temperature conditions in the central highlands of Ethiopia. **Livestock Research for Rural Development**, Cali, v. 25, p. 1-9, 2013.

KOLLING, Giovani Jacob. **Influência da mastite na qualidade do leite e leite instável não ácido em diferentes quartos mamários**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

LEWIS, Michael J. The measurement and significance of ionic calcium in milk: a review. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 64, n. 1, p. 1-13, 2011.

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

LIN, M. J.; LEWIS, M. J.; GRANDISON, A. S. Measurement of ionic calcium in milk. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 59, n. 3, p. 192-199, 2006.

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

MANUELIAN, Carmen L. *et al.* Mineral composition of cow milk from multibreed herds. **Animal Science Journal**, Tokyo, v. 89, n. 11, p. 1622-1627, 2018.

Marques LT, Fischer V, Zanela MB, Ribeiro MER, Junior WS and Rodrigues CM (2011) Produção leiteira, composição do leite e perfil bioquímico sanguíneo de vacas

- lactantes sob suplementação com sal aniônico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, 40, 1088-1094.
- MARQUES, Lúcia *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, Lúcia Treptow *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, 2010.
- MARQUES, Lúcia Treptow *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.
- MARQUES, Lúcia Treptow *et al.* Suplementação de vacas holandesas em estágio avançado de lactação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 6, p. 1392-1398, 2010.
- MARTINS, C. M. M. R. *et al.* Effect of dietary cation-anion difference on performance of lactating dairy cows and stability of milk proteins. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, PA, v. 98, p. 2650-2661, 2015.
- MARTINS, C. M. M. R. *et al.* Effect of dietary crude protein degradability and corn processing on lactation performance and milk protein composition and stability. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, PA, v. 102, n. 5, p. 4165-4178, 2019.
- MARTINS, F. A. **Caracterização de variáveis relacionadas com a estabilidade do leite bovino**. 2022. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Setor de Engenharias, Ciências Agrárias e de Tecnologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2022.
- MARTINS, Cristian Marlon de Magalhães Rodrigues *et al.* Subclinical intramammary infection does not affect bovine milk ethanol stability. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 55, n. 2, p. 1-9, 2018.
- LEWIS, Michael. Ultra High Temperature Processing. *In*: SMITHERS, Geoffrey W. **Reference Module in Food Science**. Amsterdam: Elsevier, 2018. p. 187-192.
- MILLER, P. G.; SOMMER, H. H. The Coagulation Temperature of Milk as Affected by pH, Salts, Evaporation and Previous Heat Treatment. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, PA, v. 23, n. 5, p. 405-421, 1940.
- MOLINA, L. H. *et al.* Correlacion entre la termoestabilidad y prueba de alcohol de la leche a nivel de un centro de acopio lechero. **Archivos de Medicina Veterinaria**, Santiago, v. 33, p. 1-9, 2001.
- NEGRI, Livia *et al.* Factores que afectan el resultado de la prueba del alcohol en leches con bajos recuentos de bacterias viables. *In*: CONGRESO ARGENTINO DE PRODUCCIÓN ANIMAL, 24., 2001, Rafaela. **Anais [...]**. Rafaela: Asociación Argentina de Producción Animal, 2001. p. 1-2.

NEVES, T. F. F. **Estabilidade do leite**: características físico-químicas e parâmetros de desempenho de rebanhos especializados das raças holandesa e jersey. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2021.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7. ed. Washington, D. C.: National Academy Press, 2001.

O'CONNELL, J. E.; FOX, P. F. The two-stage coagulation of milk proteins in the minimum of the heat coagulation time-pH profile of milk: Effect of casein micelle size. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, PA, v. 83, n. 3, p. 378-386, 2000.

O'CONNELL, J. E.; FOX, P. F. The two-stage coagulation of milk proteins in the minimum of the heat coagulation time-pH profile of milk: Effect of casein micelle size. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, PA, v. 83, n. 3, p. 378-386, 2000.

OLIVEIRA, C. A. F *et al.* Composição e características físico-químicas do leite instável não ácido recebido em laticínio do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 12, n. 2, p. 508-515, 2011.

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

ORMSTON, Sabrina *et al.* Performance and milk quality parameters of Jersey crossbreds in low-input dairy systems. **Scientific Reports**, London, v. 12, n. 1, p. 1-17, 2022.

PALMQUIST, D. L.; JENKINS, T. C. A 100-Year Review: Fat feeding of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, PA, v. 100, n. 12, p. 10061-10077, 2017.

PERKINS, Melinda L.; DEETH, Hilton C. A survey of Australian consumers' attitudes towards UHT milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, Melbourne, v. 56, n. 1, p. 28-34, 2001.

RATHNAYAKE, R. M. C. S. *et al.* Changes in Compositional and Keeping Quality Parameters of Cow Milk on Ethanol Stability. **International Journal of Livestock Research**, Rishikesh, v. 6, n. 4, p. 83, 2016.

RIBEIRO, M. E. R.; BARBOSA, R.S.; FISCHER, V.; JUNIOR STUMPF, W.; ARROS, L. **Método de Determinação de Cálcio Iônico no Leite Bovino**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 321).

ROBITAILLE, Gilles; BRITTEN, Michel; PETITCLERC, Denis. Effect of a differential allelic expression of kappa-casein gene on ethanol stability of bovine milk. **Journal of Dairy Research**, London, v. 68, n. 1, p. 145-149, 2001.

SANJAYARANJ, Inthujaa *et al.* Effect of Breed on the Fatty Acid Composition of Milk from Dairy Cows Milked Once and Twice a Day in Different Stages of Lactation. **Dairy**, Basel, v. 3, n. 3, p. 608-621, 2022.

- SCHMIDT, Fernando André. **Efeito do suprimento das exigências de energia e/ou proteína na recuperação da instabilidade do leite ao teste do álcool**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2014.
- SHEW, D. I. Technical aspects of quality assurance. **Bulletin of the IDF**, Brussels, v. 133, p. 115-121,
- SILVA, P. H. F. da. **Leite UHT: fatores determinantes para sedimentação e gelificação**. 2003. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.
- STUMPF, M. T. *et al.* Severe feed restriction increases permeability of mammary gland cell tight junctions and reduces ethanol stability of milk. **Animal**, Cambridge, v. 7, n. 7, p. 1137-1142, 2013.
- 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**, Lancaster, PA, v. 90, n. 11, p. 5012-5017, 2007.
- TSIOULPAS, A.; LEWIS, M. J.; GRANDISON, A. S. Effect of minerals on casein micelle stability of cows' milk. **Journal of Dairy Research**, London, v. 74, n. 2, p. 167-173, 2007.
- Veloso, C.R.V. Noções básicas da acidez. *In*: BRITO, J. R. F.; DIAS, J. C. (ed.). **A qualidade do leite**. Juiz de Fora: Embrapa-CNPGL; São Paulo: Tortuga, 1998. p. 37-45.
- VIDAL, Ana Maria Centola; SARAN NETTO, Arlindo. **Obtenção e processamento do Leite e Derivados**. Pirassununga: Universidade de São Paulo, 2018.
- VIDAL-MARTINS, Ana M. C. *et al.* Evolução do Índice Proteolítico e do comportamento reológico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 698-704, 2005.
- VIZZOTTO, E. F. *et al.* Supplementation with green tea and oregano extracts on productive characteristics, blood metabolites, and antioxidant status of Jersey cows during the transition period. **Animal**, Cambridge, v. 15, n. 2, p. 1-8, 2021.
- VOGES, Joana Gerent *et al.* Relationship between farm structure and animal feed in unstable non-acid milk occurrence in Planalto Norte of Santa Catarina. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, n. 19, p. 1-13, 2018.
- WALSTRA, Pieter. Casein sub-micelles: Do they exist?. **International Dairy Journal**, Barking, v. 9, n. 3-6, p. 189-192, 1999.
- WERNCKE, D. *et al.* Qualidade do leite e perfil das propriedades leiteiras no sul Santa Catarina: Abordagem multivariada. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 68, n. 2, p. 506-516, 2016.

WERNECK, Daíse. **Relação entre restrição nutricional e acidose ruminal com as alterações na produção e composição do leite**. 2017. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R.; FISCHER, V. Leite instável não ácido (LINA) do campo a indústria. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 6., 2015, Curitiba. **Anais [...]**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2015. p. 1-16.

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

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

ZANELA, Maira Balbinotti. **Caracterização do leite produzido no Rio Grande do Sul, ocorrência e indução experimental do leite instável não ácido (LINA)**. 2004. 175f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004.

APÊNDICE II – Normas da revista utilizadas para preparo do capítulo II

Journal of Dairy Research General

The Journal of Dairy Research publishes original scientific research on all aspects of the biology, wellbeing and technology of lactating animals and the foods they produce. Research Papers report innovative, hypothesis-driven research that is likely to have international impact. Research Communications are shorter and intended primarily for descriptive research and research of regional or technical impact. The Journal also publishes additional categories of Research Reviews and Research Reflections, which may be short review articles, opinion papers or hypothesis-based data-less papers. It also publishes Letters to the Editor, Book Reviews and Editorials. Research Reviews and Editorials are usually by invitation only. These Instructions for Contributors give the important information that applies to all submissions. Further information specific to the additional categories of article is provided in the Annex. Material for publication should be submitted using the online submission system at www.journalofdairyresearch.org where you will also find further details of the Journal's scope, advice on preparing your manuscript and access to track your manuscript through Peer Review. If you have been directed to a dedicated submission portal (for a Special Issue, for instance) that is the one to use. Submission of a manuscript will be taken to imply that it reports original unpublished work that it is not under consideration elsewhere and that if accepted by the Journal it will not be published elsewhere in any language without the consent of the Editors. You will be asked to confirm that you accept these conditions. Your manuscript will be peer reviewed. If it is accepted for publication you will be asked to assign the copyright, under certain conditions, to the Journal to help protect your material. Although it is not a formal requirement, authors of submitted manuscripts are strongly encouraged to participate in the Peer Reviewing of other submissions.

Submission of manuscripts

Submission is online via www.journalofdairyresearch.org You should first consult the online guidance and these Instructions for Contributors to ensure that your manuscript is prepared in accordance with the Journal's requirements. You must submit the manuscript as a

single Word document that incorporates all the tables and figures that are essential to the understanding of the research and its conclusions. If we subsequently require higher quality original files of figures or images we will ask you for them. When you submit the manuscript you take responsibility for all subsequent correspondence relating to the manuscript and, if deemed acceptable, the published paper, and the manuscript must identify you as Corresponding Author. You will also normally be required to submit a Supplementary File that provides the methodological detail required for repetition as well as data and other information that corroborate the conclusions without being essential to them.

Journal Scope

The Journal's ability to cover the entire dairy foods chain is a major strength. The remit spans from animal nutritional aspects of feed input through the biology of lactating animals and the mammary gland to milk quality, technological aspects of processed dairy products and healthy nutrition for the consumer. The focus is on dairy species, but we also welcome comparative research related to human lactation and lactation in non-dairy animal species. The Journal does not categorize published articles by topic. Each issue will follow the dairy foods chain, starting with feeding-related research and ending with consumer-related.

Types of manuscript and general considerations

In the original research category the Journal publishes submitted Research Papers and Research Communications. Research Papers report innovative hypothesis-driven research of international impact and will not normally be appropriate for research that is purely descriptive. Research Communications are shorter. In addition to international impact research, Research Communications can also report descriptive studies of regional or technical interest. Within the Journal there is no categorization of original research by article type, which must be briefly stated in the first line of the Abstract. Page limits apply to all types of manuscript. These are reported as Text Equivalent (TEQ) where one word is one TEQ and each figure or table is 250 TEQ. Research Papers should be no longer than around 6000 TEQ and should include only

figures, tables and reference citations that are essential to the understanding of the research objectives. Research Communications should be no longer than around 2500 TEQ and should include only one or two tables or figures and a maximum of around 10 citations. Manuscripts that exceed these recommendations will be returned for revision. The Journal places great emphasis on conciseness, and strongly encourages the use of a Supplementary File to ensure that the article is focused and succinct. Authors who choose not to include a Supplementary File will be asked to justify that decision.

Reviews and Editorials

These are invited, and separate guidance will be provided with the invitation. The Editors are always interested to receive suggestions for topics, with or without possible authors.

Other Materials

Separate information is provided in an Annex for submission of Research Reviews, Research Reflections (mini-reviews, opinion papers, hypothesis-only papers), Letters to the Editor, Book Reviews and Editorials.

General style of all manuscripts

Please consult the online guidance and refer to a recent issue to familiarize yourself with Journal conventions and layout. Attention to these and other details will speed publication. Manuscripts should be written in UK English using the spelling of the Concise Oxford Dictionary and should as far as possible be comprehensible to the non-specialist reader. They should be concise and focused on the scientific hypothesis and objectives. Research Papers and Research Communications must be completely comprehensible without reference to any Supplementary File; what was done and what was found must be fully apparent. However, the detailed methodological descriptions or cited methodologies required to allow repetition must be given in the Supplementary File, and not in the manuscript. Similarly, data that is methodological (eg tabular description of a diet) or that is supportive of the conclusions without being essential to them must be given in the Supplementary File. Formatting should include double spaced and consecutively numbered lines, standard margins and

an appropriate font of appropriate size. Do not hyphenate words at the end of a line unless a hyphen is to appear in the printed text.

Layout of Research Paper manuscripts

The manuscript should generally be divided as follows:

Cover sheet should give the title of the article, names of the authors each with one forename together with their affiliations, a shortened version of the title suitable as a heading, and the name and email of the author to whom correspondence and proofs should be sent.

Abstract, preferably not more than 300 words, should encapsulate the whole paper, showing clearly the new knowledge acquired. The first line of the summary should identify the article as a Research Paper and present the objectives, preferably in the form of a hypothesis (eg This Research Paper addresses the hypothesis that...). Without using separate sections, the Abstract should briefly explain what was done, why it was done, how it was done and what was found. Results and conclusions should be clearly stated, but the Abstract should not contain individual data values unless this is essential to the conclusions.

Keywords: up to 5 keywords must be supplied

Introduction should not have a heading. It should not contain a full review of the literature, but should help the non-specialist to understand why the subject of enquiry is interesting or important, why the authors have chosen the approach described and what the likely impact of the research will be. The objectives must be clearly stated, preferably in the form of a hypothesis.

Materials and Methods section should be sufficiently informative to allow the reader to understand what was done, but should not contain the detail needed to allow repetition (this should be given in the Supplementary File). Proper reference must be made to the Supplementary Materials and Methods.

Results should be as concise as possible, without repetition or inclusion of irrelevant material. Tables and illustrations should be used efficiently. All data reported must directly relate to the understanding of the research objectives and conclusions. Supporting or confirmatory data that corroborate the conclusions without being essential to them should be

presented separately as part of the Supplementary File. Proper reference must be made to this Supplementary Data.

Discussion should not repeat the results but discuss their significance. Refer to existing or accepted knowledge in the present tense and the authors' work in the past tense; the difference in tense should clearly show the authors' contribution. A separate conclusion is not necessary but authors should summarize their main conclusions briefly at the end of the Discussion. A combined Results and Discussion is acceptable but not preferred.

Acknowledgements of financial support, technical assistance and so on are given in a separate paragraph. It is the responsibility of the authors to ensure that individuals or organizations acknowledged as providing materials or otherwise are willing to be identified.

References must be consistent and must use the style described below.

Tables and table legends, following the style described below.

Figure legends sufficient to allow the figure to be understood without reference to the text

Figures should be produced using an editable software and copied into the Word document. Please remember that the complete manuscript should be submitted as a single document.

Layout of submitted Research Communication manuscripts

In general, follow the same format and layout as for a Research Paper. The introduction will typically be shorter and the results and discussion are more likely to be combined into one section. The number of citations will be less, and presentation of data should be restricted to one or two figures and tables. Use of a Supplementary File for the presentation of supporting data is normally a requirement. The Abstract should start with a sentence clearly identifying the article type and presenting the objectives (eg This Research Communication describes....)

References

Refer to a recent issue and ensure that your reference citations comply with Journal style. References should be given in the text as Brown & Jones (1987) or (Schmidt, 1985; Nakamura et al.1989); the first author with et al. is used for papers with three or more authors. Where necessary, papers are distinguished as Lenoir (1988a), (Litov et al. 1990a, b). When several references appear together in the text, cite them in chronological order, and alphabetically within years. The Reference list at the end of the paper, which should begin on a fresh page, is given in strict alphabetical order and uses the minimum of punctuation. Each reference should contain authors' names, with initials (in capitals), the year, the title of the paper, the name of the journal in full, the volume and the page range. Titles of articles originally published in another language should be given in English translation, and this indicated by the use of square brackets. References to books should include the town of publication and the publisher, with editor(s) and volume and edition number where appropriate. Unpublished work should be given in the text (use authors' initials and surname) and not in the Reference list. You are reminded that it is your responsibility to check all references.

Data presentation

Choose the most economical form of data presentation, remembering that this could include data presented briefly in the text. All data included in the manuscript must directly relate to the hypothesis or objectives and be essential to establish the conclusions. Confirmatory or supportive data that corroborate the conclusions should not be given in the manuscript, but as part of the Supplementary File. For investigative research, avoid including in the main text large tables and figures that are comprised mainly of data that do not differ significantly between treatments. For descriptive research, use the Supplementary File for all apart from the most important observations.

Tables

Tables should be numbered and carry headings enabling them to be understood without reference to the main text. Any abbreviations should be defined. Each Table should be typed separately at the end of

the main text, but their approximate position should be indicated by a marginal mark (eg Table 1 near here). Symbols for footnotes should avoid use of *, **, etc, which should be used to indicate levels of significance. Additional Tables given in the Supplementary File should follow the same conventions and should be numbered Supplementary Table S1, S2 etc. Ensure that the manuscript includes proper reference to each.

Supplementary Table.

Figures and Illustrations

Figures should be numbered and the combination of figure and legend should be comprehensible without reference to the main text. Figures must be prepared using an editable file format and then copied into the Word document. Data points should be indicated by clearly distinguishable symbols. Illustrations such as photographic images should be accompanied by a legend as above, with scale bars if appropriate. Additional Figures given in the Supplementary File should follow the same conventions and should be numbered Supplementary Figure S1, S2 etc. Ensure that the manuscript includes proper reference to each Supplementary Figure. Colour figures and artwork submitted to the Journal as part of the manuscript will be published online free of charge. If you request colour figures in the printed version, you will be contacted by CCC-Rightslink who are acting on our behalf to collect Author Charges. Please follow their instructions in order to avoid any delay in the publication of your article.

Colour reproduction

To optimize the online colour reproduction, you will be given the opportunity to submit a colour graphic as either TIFF or EPS file, together with further instructions. It is your responsibility to ensure that any figures provided for colour online will reproduce well when converted to black and white for the print version.

Statistical treatment

Authors should, where possible, discuss their work with a statistician at an early stage and give attention to sample size. Individual results should not normally be given. The methods of statistical analysis

should be clearly described; a suitable reference is adequate. Authors should make it clear whether they are quoting SED, SEM, SD, SE and so on. Any statement that two groups of values are different should be supported by the level of significance involved. Differences should not be claimed or implied if $P > 0.05$. **Gene Sequences**

Original DNA sequences reported in the Journal must also be submitted to GenBank.

Instructions can be found at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>.

Ethics of experiments

All research published in the Journal must comply with the locally-applicable ethical legislation or codes for animal or human research, and there must be a clear statement detailing that compliance.

Units

SI and commonly-used non-SI metric units should be used whenever possible. Solutions may be reported in terms of molarity (M) or as mol/l, providing there is consistency and no ambiguity. Give compositions based on mass or volume as (e.g.) mg/l or mg/kg and not percentage. Report as part of the Supplementary File all details of buffers etc that would be required for repetition. Normality should not be used.

Microorganisms

The organism should be described unambiguously, with genus, species and subspecies (if any) in italic and strain number or source in roman. Usage should conform to current international rules. Shortened forms or synonyms may be used after the first mention if desired.

Chemical formulae

These should be unambiguous. It is permissible but not required to use symbols for inorganic formulae.

Enzymes

The recommendations of the International Union of Biochemistry (Enzyme Nomenclature, 1984, London: Academic Press) should be followed, and the EC number given where known.

Other nomenclature, symbols, abbreviations and conventions

Authors should consult a current issue for guidance. Useful information on biochemical nomenclature and permitted acronyms can be found in *Biochemical Journal* 169, 11-14 and on nutrient nomenclature in the *British Journal of Nutrition*. If authors use other abbreviations or acronyms, they should be defined at first mention, and their number restricted to ensure that the text is readable. Always use Arabic numerals with units; otherwise use words for 1-10 and figures for more than 10, (e.g. 3 weeks, three cows, 34 sheep) but avoid mixed lists. Time should be given by the 24 h clock, e.g. 14.15, without h or hours.

Supplementary File

A Supplementary File is now a normal requirement when submitting your research to the Journal, and if you choose not to include one you will be asked to justify that decision. It must be submitted by the same Corresponding Author as the original article. The purpose of the Supplementary File is to enhance the impact of the manuscript. The relationship between the two is straightforward: the article communicates the research in a scientifically validated and focused way, whilst the Supplementary File allows the research to be repeated by those who may wish to do so. The Supplementary File must be submitted as a single Word document that begins with the title of the paper and a list of authors (affiliations are not required) followed by the statement SUPPLEMENTARY FILE. The Supplementary File should be restricted to those materials that are specifically identified in the manuscript and will not normally be understandable without reference to the manuscript. The exact composition of the Supplementary File is flexible, but in general it will contain detailed materials and methods followed by data presented as tables and/or figures. Additional references may also be given. Tables must be numbered consecutively in the format Supplementary Table S1, S2 etc. Figures must similarly be numbered Supplementary Figure S1, S2 etc. The Supplementary File will be published online as a single pdf file with a link to that file provided at the end of the main article.

Revision of papers

If a paper is returned to authors for possible amendment or revision, a period of 2 months will normally be allowed. The editors are ready to

consider a revised or rewritten paper at any time, but after 2 months it will be considered a new paper and given a new submission date unless an extension has been agreed with the Editor.

Proofs

Authors will be advised when to expect proofs, which should be returned without delay following the instructions supplied at the time. Proofs are sent for the correction of any printer's or editorial errors, not for addition of new material or revision of the text. Excessive alteration may have to be disallowed or made at the authors' expense, and may delay publication. Order forms for paid offprints are sent with proofs and should be returned directly to Cambridge University Press following the instructions supplied at the time.

Cambridge Journals Language Editing Service

Cambridge recommends that authors have their manuscripts checked by an English language native speaker before submission; this will ensure that submissions are judged at peer review exclusively on academic merit. We list a number of third-party services specialising in language editing and / or translation, and suggest that authors contact as appropriate. Use of any of these services is voluntary, and at the author's own expense.

<http://journals.cambridge.org/action/stream?pagelId=8728&level=2&menu=Authors&pagelId=3608>

Journal of Dairy Research

Annex to Instructions for Contributors relating to Additional Materials

The Journal of Dairy Research publishes original research articles and other additional materials. This annex to the Instructions for Contributors covers those additional materials, namely Research Reviews, Research Reflections, Letters to the Editor, Book Reviews and Editorials. It should be read in conjunction with those Instructions, which give full details of the Journal's scope and stylistic requirements.

Types of Article

In addition to publishing original research, the Journal of Dairy Research also publishes Invited Review Articles and shorter Research Reflections. Book Reviews and Letters to the Editor are also welcomed, as are invited Editorials. Review Articles are intended to be prospective, stimulating and thoughtprovoking and should give a distillation of earlier research followed by a description of how the topic might develop in the foreseeable future, highlighting the types of research that are needed to achieve progress and the impact that the new discovery will have. These Review Articles are invited (rather than submitted) and the topic will have been discussed and agreed beforehand. The Editors are always interested to receive suggestions for topics, with or without possible authors. Topic proposals must be novel and timely. Research Reflections are of three types: literature-based, opinion-based and hypothesisbased. A literature-based Research Reflection is essentially a shorter form of review article and may be either invited or submitted. Novelty and timeliness are essential. An opinion-based Research Reflection presents and justifies an arguable opinion about an issue, and so is essentially a position paper. A hypothesis-based Research Reflection presents an untested but justifiable hypothesis together with an account of how that hypothesis might be tested. Novelty is paramount for both of these categories: the opinion or hypothesis that is presented must be prospective, stimulating and potentially ground-breaking.

Topic proposals and Submission

If you have been invited to submit a Review Article or Research Reflection you will have been given access to the dedicated online Submission Portal within www.journalofdairyresearch.org If you wish to propose a topic for a Review Article please use the online Contact Form or talk directly to a member of the Editorial Board Research Reflections can also be submitted without invitation using the usual Submission Form Before submitting you should consult the online guidance and the Journal's main Instructions for Contributors to ensure that your manuscript is prepared in accordance with the Journal's requirements. Submission of a manuscript will be taken to imply that it is not under consideration elsewhere and that, if accepted by the Journal, it will not be published elsewhere in any language without the consent of the Editors. You will be asked to confirm that you accept these conditions. Your manuscript will be peer reviewed. If it is accepted for publication you will be asked to assign the copyright, under certain conditions, to the Journal to help protect your material.

Review Articles

Review Articles will typically be in the region of 10,000 to 12,000 Text Equivalents (TEQ), where each word = 1 TEQ and each illustration = 250 TEQ. This equates to an original manuscript of approximately 30 pages (double spaced text, references and illustrations). This is a guideline; shorter manuscripts are likely to be completely acceptable and longer manuscripts may be acceptable (conciseness is encouraged). The review should start with a cover sheet, Abstract and keywords all in JDR style and should end with concluding remarks that draw the discussion together. The main body of text should be divided into sections of sensible length by subject matter, remembering that readability is of high priority. References should be cited correctly in JDR style and listed at the end of the main text; typically 40 to 80 references are likely to be appropriate but once again, this is a guideline. Please avoid citing an excessive number of references. If you have a specific reason for wishing to provide a comprehensive list of references, this can be done through the use of a separate Supplementary File in normal JDR style. Illustrations (schematic diagrams, figures, tables, images) are strongly encouraged. Infographic presentations (an infographic is a collection of imagery, charts, and minimal text that gives an easy-to-understand overview of a topic) can be used and should be discussed with the Editor or Editorial Board member

at the invitation stage. All illustrations should appear after the reference list together with captions that make them understandable without reference to the main text. Please remember that the Review should be readable, stimulating and forward-looking. Appropriate speculation and hypothesis-setting is strongly encouraged. Submissions that are purely retrospective “catalogues” of published work will be rejected.

Research Reflections

All Research Reflections should start with the same style of cover sheet as for a Review Article, and should typically be in the region of 4,000 to 6,000 TEQ and include between 10 and 40 references. Reasonable deviations from these guidelines may be acceptable.

For literature-based Research Reflections you should follow the same guidelines as for Review Articles (apart from length). The same ethos of writing a stimulating, prospective article should be followed.

Opinion-based Research Reflections should clearly state the issue at stake and the position that you intend to adopt and defend. This should appear in the Abstract and again at the start of the main body text. The body text should be divided into appropriate sections remembering that the objective is to make a strong case in support of your view.

Hypothesis-based Research Reflections should clearly state the hypothesis both in the Abstract and again at the start of the body text. This text should start with an Introduction which clearly and succinctly sets out the justification for the hypothesis, including due reference to established literature. A Methods section should follow, written in the form of a proposal of how the hypothesis would be tested. This should be sufficiently informative to persuade the reader that there is a reasonable chance of the hypothesis being proven or disproven. Detailed accounts of proposed materials are not needed unless there is a specific reason for stating them. A Discussion section should then explain the potential impact of the research, were it to be conducted. For obvious reasons there should not be any results section, and the conclusions should be restricted to a restatement of the hypothesis. In an Acknowledgements section reference

may be made, if appropriate, to scientific assessment by a recognized grant awarding body, which may then be accepted by the Journal as evidence of scientific credibility in lieu of Peer Review.

Book Reviews

Book Reviews must be submitted using the usual Submission Form as a Word file that starts with the short title “Book Review” followed by the title in the format “Book Review: Name of Book), names of the author(s), their affiliation(s) and then the body text. This text should not be longer than approximately 1000 to maximum 2000 words and may be much shorter. The Review should not contain figures or tables. The Review must include a full citation for the book or volume(s) being reviewed and may contain other references only if that is necessary as a part of the critique of the book. The Book Review cannot be anonymous and for obvious reasons cannot be written or submitted by the author of the book being reviewed. Publication of the Book Review is at the discretion of the Editor.

Letters to the Editor

Letters may be a comment (critical or supportive) on articles that have been published in JDR. In this case the original author will be given a chance to respond before publication of the letter. Letters may also be a short account of a relevant piece of news, policy decision, advice or similar. Letters must be submitted using the dedicated Letters to the Editor form as a Word file that starts with the short title “Letter to the Editor” followed by the title (which should start with the words “Letter to the Editor:”), names of the author(s), their affiliation(s) and then the body text. This text should not be longer than approximately 1000 words and may be much shorter. There should not normally be any presentation of data, and so the Letter should not contain figures or tables. The Letter may contain a limited number of references, we suggest a maximum of 5. Letters cannot be anonymous, and publication of the Letter is at the discretion of the Editor.

Editorials

Editorials will normally be invited by the Editor. Editorials must be submitted using the usual Submission Form as a Word file that starts with the short title “Editorial” followed by the title (which should start with the word

“Editorial:”), names of the author(s), their affiliation(s) and then the body text. This text should not be longer than approximately 1000-1500 words and may be much shorter. The content will normally have been discussed with the Editor beforehand and will usually address a topical issue in an informed lay-audience style. Judicious use of references and illustrations is allowed. Please consult recent Editorials for further guidance.

VITA

Bruna Schmitz é brasileira, natural de Vitor Meirelles, SC, nascida em 21 de novembro de 1997, filha de Erineis Sadlowski Schmita e Volnei Schmitz, realizou o Ensino fundamental na Escola de Educação Básica Guilherme André Dalri em Salete, SC. Ensino médio integrado com o técnico em agropecuária no Instituto Federal Catarinense- Campus Rio do Sul.

Em 2016, ingressou no curso de Bacharel em Zootecnia na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Dois Vizinhos. Finalizando o mesmo em 2020. Iniciou o mestrado acadêmico no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, vinculado à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação da Prof.^a: Vivian Fischer e Co-orientador: Prof. Dr. Adriano Henrique do Nascimento Rangel UFRN), com linha de pesquisa de Inovação em Sistema de Produção Animal. Em outubro de 2022, fez a progressão dentro do programa para o doutorado direto.