

**MODELAGEM DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO LEITE ATRAVÉS DE  
INDICADORES METABÓLICOS EM VACAS LEITEIRAS DE ALTA  
PRODUÇÃO**

**Autor: Rómulo Campos Gaona, MV, MSc**

Tese apresentada como requisito  
parcial para obtenção do título de Doutor  
em Ciências Veterinárias na área de  
Patobiologia Veterinária.

Orientador: Félix Hilário Díaz González

**PORTO ALEGRE  
JANEIRO 2006**

**C198m Campos Gaona, Rómulo**

Modelagem da composição química do leite através de indicadores metabólicos em vacas leiteiras de alta produção. / Rómulo Campos Gaona - Porto Alegre: UFRGS, 2005.

114 f.; il. – Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2005. Félix Hilário Díaz González, Orient.

1. Leite : composição química : modelos matemáticos  
2. Gado leiteiro : lactação 3. Vacas leiteiras : metabolismo

I. Díaz González, Félix Hilário, Orient. II. Título

## **Dedicatória**

A Deus, em esta metade do sol,

Dedico meu trabalho:

A minha esposa Gloria, pela paciência, infinito amor, e apoio.

A minha filha Laura Marcela, pela sua inesgotável alegria, solidariedade e amor,  
e a meu filho Omar Andrés, por ser o meu parceiro, por seus adoráveis comentários de  
futebol, pela sua ternura.

A minha mãe e à memória de meu pai, meu eterno professor.

## **Agradecimentos**

Ao Governo da República Federativa do Brasil, e a suas instituições CAPES, CNPq e MEC, pelo auxílio financeiro no desenvolvimento do trabalho.

Ao maravilhoso povo brasileiro pela sua alegria, capacidade de trabalho, pela vontade que colocam em todo o que fazem e que será a energia para o seu grande desenvolvimento.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo ensino gratuito e de qualidade, por acolher e formar mais um aluno estrangeiro, ultrapassando assim, as fronteiras nacionais da sua influência acadêmica.

À Universidade Nacional de Colômbia, pela comissão de estudos, sem a qual os meus estudos tivessem sido só um sonho.

Ao Professor Félix González, pela confiança e oportunidade de permitir-me ser o seu primeiro orientado de doutorado, e a sua esposa Rê, pela acolhida e estagio na minha chegada ao Brasil.

Aos proprietários e pessoal das fazendas Santo Izidoro, São Jerônimo, Novo Horizonte, pela colaboração sem limites que sempre ofereceram no desenvolvimento do trabalho.

Ao pessoal e colegas do LACVet, pela amizade, colaboração e acolhida durante os meus estudos.

Aos meus amigos e colegas Giovani Noro, Felipe Cardoso, Daniel D'Avila, Marcelo Knorr, Izabel Carneiro, Fabiana Varago, Fabio Schuster e André da Silveira pela ajuda e oportunas observações.

A Luciana de Almeida Lacerda, colega, amiga e “filha adotiva” por seu imenso sentido de responsabilidade, parceria, pelas palavras de apoio, pela amizade.

A Arlei Coldebella, por ser parte ativa na construção deste trabalho, pelas inúmeras sugestões e pelo imenso sentido do serviço, por estar sempre disponível para resolver as pequenas e grandes dúvidas nos modelos estatísticos, pela amizade.

Ao professor Paulo Alberto Lovatto, da Universidade Federal de Santa Maria por transformar minha concepção sobre modelagem.

Ao professor Sérgio Ceroni da Silva, pela amizade, pelas tardes de confraternização, pela idéia da “mineração” com os dados.

Ao professor Harold Ospina pelos conhecimentos e sugestões sobre o trabalho, a sua esposa Fernanda e filhas, pela colaboração, carinho e amizade.

Aos professores do Departamento de Zootecnia da UFRGS, Paulo Roberto Mühlbach e Alexandre de Mello Kessler pelos conhecimentos compartilhados.

Ao Engenheiro Sandro da Silva Camargo, pela grande parceria e ensino nos modelos de redes neurais.

Aos professores João Dürr, presidente do Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite; Luis Barros, da Universidade da República de Uruguai e Marcelo Cecim, da Universidade Federal de Santa Maria, pelas sugestões e participação na banca de qualificação e defesa.

Ao pessoal do Serviço de Análises de Rebanhos Leiteiros, SARLE, da Universidade de Passo Fundo, em especial a Darlene Moro pela colaboração nas análises do Leite.

Ao pessoal da Cooperativa Castrolanda, em Castro, Paraná e ao pessoal da Associação de Criadores da raça Holandesa de Paraná pela permissão para visitar suas instalações.

A o sector de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por facilitar a dosagem dos hormônios em suas instalações.

Aos professores e colegas da Universidade Federal de Minas Gerais, em especial à professora Sandra Gesteira Coelho e aos professores Ronaldo Braga Reis, José Monteiro Filho, Marcelo de Souza e Alan Maia Borges, por sua simplicidade e grande conhecimento.

A Luz Ângela Vanegas, por sua paciência e colaboração inestimável para ser minha representante na Colômbia, para todo o que foi necessário, a Alberto por manter sempre vivo meu sentido do humor, pela amizade.

Aos meus colegas e amigos Oscar Sanz e Carlos Vicente Duran pela colaboração e amizade, sem importar a distância nem as limitações de tempo.

A minha família, fonte inesgotável de amor, paciência, alegria e compressão, por ter sido sempre parceiros incondicionais nesta caminhada, por todas as horas que tenho a eles sonogado tentado ir atrás do conhecimento de alguma coisa.

A Jairo e Eliana, pela solidariedade, parceria e permanente presença em todos os momentos de minha estadia no Brasil.

Em fim, a todos aqueles e a tudo aquilo, que me ensinou ou me facilitou chegar ao final do trabalho e que permitiu seu desenvolvimento, o meu

***Muito obrigado!!!!***

“Os limites normais têm tido um papel indefinido, mas tranquilizador no laboratório clínico. Aparecem no horizonte de nossa consciência, perfeitamente simétricos como o monte Fujiyama, um pouco nebulosos no seu significado, mas aceitos e reverenciados com gratidão. No entanto, longe de ser puros e simples, como uma ilusão infantil, examinados de perto, resultam ser insuportavelmente complicados, sendo na realidade uns dos problemas mais difíceis e que mais limitam a utilidade dos dados de um laboratório clínico”

(J. Benson, Universidade de Minnesota)

## RESUMO

### MODELAGEM DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO LEITE ATRAVÉS DE INDICADORES METABÓLICOS EM VACAS LEITEIRAS DE ALTA PRODUÇÃO

Autor: Rómulo Campos Gaona

A lactação é um processo fisiológico complexo que ainda não foi compreendido na sua totalidade. Inúmeros fatores intervêm na síntese e secreção do leite, sendo os mais importantes a nutrição e o metabolismo endógeno dos nutrientes. A qualidade do leite é valorizada tanto pela sua composição química, como pelo conteúdo de células somáticas. No entanto, visando a comercialização do leite, as maiores mudanças e melhoras na qualidade podem ser atingidas através da manipulação da dieta dos animais, em especial em vacas leiteiras de alta produção. Avaliar os processos de absorção de alimentos, bem como o metabolismo catabólico e anabólico direcionado para a síntese do leite, têm sido uma grande preocupação na pesquisa de nutrição e bioquímica da produção animal. O principal objetivo da presente pesquisa foi gerar modelos matemáticos que pudessem explicar a participação de diferentes metabólitos sobre a composição química do leite. Neste intuito foram coletadas amostras de fluido ruminal, sangue, urina e leite de 140 vacas da raça Holandesa nas primeiras semanas de lactação e mantidas sob sistema semi-intensivo de produção e dieta controlada. Os animais foram selecionados de sistemas de produção no ecossistema do Planalto Médio de Rio Grande do Sul e foram amostrados em dois períodos climáticos críticos. No fluido ruminal foram avaliados o pH e o tempo de redução do azul de metileno. No sangue foram determinados os metabólitos: glicose, colesterol,  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB), triglicerídeos, fructosamina, ácidos graxos não esterificados (NEFA), proteínas totais, albumina, globulina, uréia, creatinina, cálcio, fósforo e magnésio. As enzimas: aspartato amino transferase (AST), gama glutamil transferase (GGT) e creatina kinase (CK). Os hormônios: cortisol, insulina, triiodotironina (T3), tiroxina (T4), e leptina. Foi efetuado hemograma, para conhecer: hematócrito, hemoglobina, e contagem total e diferencial de células brancas. Na urina foram dosados: corpos cetônicos, pH e densidade. No leite foi determinada: proteína, gordura, lactose, sólidos totais, sólidos não gordurosos, contagem de células somáticas e uréia. Para a determinação de cada um dos metabólitos ou compostos foram usadas técnicas específicas validadas internacionalmente. Os diferentes valores obtidos constituíram os parâmetros básicos de entrada para a construção dos diversos modelos matemáticos executados para prever a composição do leite. Mediante procedimentos de regressão linear múltipla algoritmo Stepwise, procedimentos de correlação linear simples de Pearson e procedimentos de análise computacional através de redes neurais, foram gerados diferentes modelos para identificar os parâmetros endógenos de maior relevância na predição dos diferentes componentes do leite. A parametrização das principais rotas bioquímicas, do controle endócrino, do estado de funcionamento hepático, da dinâmica ruminal e da excreção de corpos cetônicos aportou informação suficiente para prever com diferente grau de precisão o conteúdo dos diferentes sólidos no leite. O presente trabalho é apresentado na forma de quatro artigos correspondentes aos parâmetros energéticos, de controle endócrino, modelagem matemática linear múltipla e predição através de Artificial Neural Networks (ANN).

**Palavras chave:** lactação, modelos matemáticos, composição do leite, metabolismo.

## ABSTRACT

### *MODELING OF THE CHEMICAL COMPOSITION OF THE MILK THROUGH METABOLIC PARAMETERES IN HIGH YIELDING DAIRY COWS*

Author: Rómulo Campos Gaona

*The lactation is a complex physiological process that has not yet been understood in its totality. Diverse factors intervene in the synthesis and secretion of the milk, being nutrition and endogenous metabolism of the nutrients the most important. The quality of the milk is recognized greatly by the chemical composition, as by the content of somatic cells. Furthermore, the search of better quality of the milk induces that changes and advances should be reached through manipulation of the diet of the animals, especially in high yielding dairy cows. The evaluation of the food absorption processes, as well as the anabolic and catabolic metabolism for the synthesis of the milk, have been a major focus in the investigation on nutrition and biochemistry of the animal production. The main objective of this present work was to generate mathematical models that could explain the participation of different metabolites on the chemical composition of the milk. For this purpose, samples of rumenal liquid, blood, urine and milk of 140 Holstein Friesian cows were taken during the first weeks of lactation. The animals were kept in a semi-intensive production system with controlled diet and in the ecosystem of the Planalto Medium in the State of Rio Grande do Sul (Brazil.) Two critical climatic periods were evaluated. In rumenal liquid, pH and methylene blue reduction time were evaluated. In blood, the metabolic profile was determined and included: glucose, cholesterol, b-hydroxybutyrate (BHB), triglycerides, fructosamine, non-esterified fatty acids (NEFA), total protein, albumin, globulin, urea, creatinine, calcium, phosphorus and magnesium. Enzymes: aspartate aminotransferase (AST), gamma glutamyltransferase (GGT) and Creatine Kinase (CK). Hormones: cortisol, insulin, triiodothyronine (T3), thyroxine (T4) and leptine. In the hemogram were determined: hematocrit, hemoglobin, complete blood count and white blood cell differential. In the urine, ketonic bodies, pH and specific density were determined. In milk, the content of protein, fat, lactose, total solids, solids-non-fat, count of somatic cells (CCS) and urea were evaluated. The determination of each one of these metabolites or compounds was obtained by using internationally validated specific techniques. The obtained values constituted the input of basic parameters for the construction of more elaborated mathematical models to predict the milk composition. Through procedures of stepwise multiple regression, simple linear correlation (Pearson coefficient) and computational analysis through neural networks, mathematical models were generated to identify the endogenous parameters of greater relevance in the prediction of the different chemical components of the milk. The parameterization of the main biochemical routes, endocrine control, status of the liver function, rumenal dynamic and excretion of ketonic bodies provided sufficient information to predict with diverse degrees of precision the content of the different solids of the milk. The current study is presented by the support of four pertaining articles: energy parameters, endocrine control, mathematical models of multiple linear regression and prediction through ANN (Artificial Neural Networks).*

**Keywords:** lactation, mathematical models, milk composition, metabolism.

## RESUMEN

### MODELAJE DE LA COMPOSICION QUIMICA DE LA LECHE A TRAVES DE INDICADORES METABOLICOS EN VACAS LECHERAS DE ALTA PRODUCCION

Autor: Rómulo Campos Gaona

La lactancia es un proceso fisiológico complejo que aún no ha sido comprendido en su totalidad. Diversos factores intervienen en la síntesis y secreción de la leche, siendo los más importantes la nutrición y el metabolismo endógeno de los nutrientes. La calidad de la leche es reconocida tanto por la composición química, como por el contenido de células somáticas. Por otra parte, la búsqueda de mejor calidad de la leche, induce a que los cambios y avances deban ser alcanzados a través de la manipulación de la dieta de los animales, en especial en vacas lecheras de alta producción. Evaluar los procesos de absorción de alimentos, así como el metabolismo anabólico y catabólico para la síntesis de la leche, ha sido una gran preocupación en la investigación sobre nutrición y bioquímica de la producción animal. El principal objetivo del presente trabajo fue generar modelos matemáticos que pudieran explicar la participación de diferentes metabolitos sobre la composición química de la leche. Para este propósito, fueron colectadas muestras de líquido ruminal, sangre, orina y leche de 140 vacas de la raza Holstein Friesian, durante las primeras semanas de lactación. Los animales estuvieron en sistemas semi-intensivos de producción con dieta controlada, en el ecosistema del Planalto Medio en el Estado de Rio Grande do Sul (Brasil). Fueron evaluados dos períodos climáticos críticos. En el líquido ruminal fue evaluado pH y tiempo de reducción del azul de metileno (TRAM). En sangre fueron determinados los metabolitos: glucosa, colesterol,  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB), triglicéridos, fructosamina, ácidos grasos no esterificados (NEFA), proteínas totales, albúmina, globulina, urea, creatinina, calcio, fósforo y magnesio. Las enzimas aspartato amino transferasa (AST), gama glutamil transferasa (GGT) y creatina Kinasa (CK). Las hormonas cortisol, insulina, triiodotironina (T3), tiroxina (T4) y leptina. En hemograma se determinó hematócrito, hemoglobina y conteo total y diferencial de células blancas. En la orina se determinó: cuerpos cetónicos, pH y densidad específica. En leche se evaluó proteína, grasa, lactosa, sólidos totales, sólidos libres de grasa, conteo de células somáticas (CCS) y urea. Para la determinación de cada uno de los metabolitos o compuestos, fueron usadas técnicas específicas validadas internacionalmente. Los valores obtenidos constituyeron los parámetros básicos de entrada para la construcción de modelos matemáticos, elaborados para predecir la composición de la leche. A través de procedimientos de regresión lineal múltiple algoritmo stepwise, correlación lineal simple de Pearson y análisis computacional a través de redes neurales, fueron generados modelos matemáticos para identificar los parámetros endógenos de mayor relevancia en la predicción de los diferentes componentes químicos de la leche. La parametrización de las principales rutas bioquímicas, del control endocrino, del estado de funcionamiento hepático, la dinámica ruminal y la excreción de cuerpos cetónicos, aporta información suficiente para predecir con diferentes grados de precisión el contenido de los diferentes sólidos de la leche. El presente trabajo, es presentado mediante cuatro artículos correspondientes a: parámetros energéticos, control endocrino, modelos matemáticos de regresión lineal múltiple y predicción a través de ANN (Artificial Neural Networks).

**Palabras clave:** lactancia, modelos matemáticos, composición de la leche, metabolismo.

## SUMÁRIO

RESUMO _____	viii
ABSTRACT _____	ix
RESUMEN _____	x
SUMÁRIO _____	xi
LISTA DE TABELAS _____	xiii
LISTA DE FIGURAS _____	xiv
LISTA DE SIGLAS _____	xv
1. INTRODUÇÃO _____	16
2. REVISÃO DE LITERATURA _____	19
2.1 O setor lácteo _____	19
2.2 Composição química do leite _____	23
2.3 Manipulação da composição do leite _____	24
2.4 Indicadores do metabolismo _____	29
2.4.1 Indicadores no sangue _____	30
2.4.2 Indicadores na urina _____	31
2.4.3 Indicadores no suco ruminal _____	33
2.4.4 Indicadores no leite _____	36
2.5 A modelagem como ferramenta de análise _____	37
2.5.1 Tipos de modelos _____	39
2.6 Metabolismo e modelagem _____	41
2.7 Principais usos de modelos em animais _____	42
2.7.1 Perspectivas de modelos em produção animal _____	45
3. INDICADORES DO METABOLISMO ENERGETICO NO PÓS-PARTO DE VACAS LEITEIRAS DE ALTA PRODUÇÃO E SUA RELAÇÃO COM A COMPOSIÇÃO DO LEITE _____	47
3.1 Resumo _____	47
3.2 Summary _____	47
3.3 Introdução _____	48

3.4	Material e métodos	49
3.5	Resultados e Discussão	51
3.6	Conclusões	58
4	INDICADORES DO CONTROLE ENDOCRINO EM VACAS LEITEIRAS DE ALTA PRODUÇÃO E SUA RELAÇÃO COM A COMPOSIÇÃO DO LEITE	59
4.1	Resumo	59
4.2	Summary	59
4.3	Introdução	60
4.4	Material e Métodos	61
4.5	Resultados e Discussão	62
4.6	Conclusões	68
5	MODELAGEM DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO LEITE EM VACAS DE ALTA PRODUÇÃO	69
5.1	Resumo	69
5.2	Summary	69
5.3	Introdução	70
5.4	Material e métodos	71
5.5	Resultados e discussão	73
5.6	Conclusões	79
6	PREDICTING MILK QUALITY USING AN ARTIFICIAL NEURAL NETWORK BASED MODEL	80
6.1	Summary	80
6.2	Resumo	80
6.3	Introduction	81
6.4	Material and methods	82
6.5	Results and discussion	87
6.6	Conclusions	95
7	DISCUSSÃO	96
8	CONCLUSÕES	106
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média, erro padrão e nível descritivo de probabilidade do teste F(p) da análise de variância para o efeito de período sobre a composição do leite e os principais indicadores de qualidade do leite em vacas de alta produção _____	52
Tabela 2. Coeficientes de correlação entre gordura, proteína, lactose e sólidos totais do leite e os indicadores sanguíneos do metabolismo energético em vacas de alta produção _____	54
Tabela 3. Valores médios ajustados (mmol/L) e erro padrão para os indicadores do metabolismo energético e nível descritivo de probabilidade do teste F da análise da variância para o efeito de período pós-parto de vacas leiteiras de alta produção _____	55
Tabela 4. Valores plasmáticos médios ajustados e erro padrão para os principais hormônios associados a homeostasia de vacas leiteiras de alta produção _____	63
Tabela 5. Coeficientes de correlação entre a porcentagem de sólidos totais do leite e entre os hormônios reguladores da síntese láctea em vacas de alta produção _____	65

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Modelo de Rede Neural _____	85
Figura 2.	Representação de valores reais e preditos usando 39 atributos e erro absoluto de predição para o total de observações, para sólidos totais (i, ii), lactose (iii, iv), gordura (v, vi) e proteína (vii, viii) _____	90
Figura 3.	Representação do erro absoluto para sólidos totais (i), lactose (ii), gordura (iii), proteína (iv) com número diferente de variáveis _____	91

## LISTA DE SIGLAS

ANN	Artificial neural networks
ARC	Animal Research Center, UK
AST	Aspartato amino transferase
BHB	$\beta$ -hidroxibutirato
BEN	Balance energético negativo
BUN	Blood ureic nitrogen
CAN	Confederação Nacional de Agricultura
CBCL	Confederação Brasileira de Cooperativas de Laticínios
CBQL	Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite
CBT	Contagem Bacteriana Total
CCS	Contagem de Células Somáticas
CCST	Contagem de Células Somáticas de tanque
CK	Creatina kinase
CMT	California Mastitis Test
CNCPS	Cornell Net Carbohydrate Protein System
CNPL	Comissão Nacional de Pecuária de Leite
FAO	Food and alimentation organization
GGT	Gama glutamil transferase
GLM	General linear model
GRF	Glicídios de rápida fermentação
HB	Hemoglobina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IN-51	Instrução Normativa, 51
IPG	Índice proteína gordura
MAPA	Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MS	Matéria seca
NAPDH	Nicotin adenin difosfonucleotideo reduzido
NEFA	Ácidos graxos não esterificados
NIRS	Near infrared spectroscopy
NRC	National Research Council
NUL	Nitrogênio uréico no leite
NUS	Nitrogênio uréico no sangue
OMS	Organização mundial da saúde
PNQL	Programa Nacional de Qualidade do Leite
RBQL	Rede Brasileira de Qualidade do Leite
RIA	Radioimunoanálise
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
SARLE	Serviço de Análise de Rebanhos Leiteiros
SAS	Statistical Analysis System
SNG	Sólidos não gordurosos
ST	Sólidos totais
TRAM	Tempo de redução do azul de metileno
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina

## 1. INTRODUÇÃO

A qualidade do leite como alimento e matéria prima para a indústria depende da sua composição nutritiva. Em países com pecuária leiteira desenvolvida o pagamento do leite se faz pela qualidade; assim, o monitoramento da composição do leite permite identificar eventuais disfunções metabólicas que estejam ocorrendo nas vacas em lactação e que possam afetar a qualidade da secreção láctea. As alterações metabólicas refletem diretamente a composição final do leite. Portanto, é necessário estudar os principais metabólitos de importância diagnóstica nos diferentes fluidos corporais com o propósito de gerar propostas alternativas de prevenção de doenças metabólicas que ocasionam perda na qualidade do leite ou alternativas de manejo para superar rapidamente os problemas nutricionais e/ou metabólicos, visando melhorar os indicadores de produção de leite para garantir que o produtor primário obtenha um produto competitivo no mercado, produzido em forma econômica e sustentável.

É conhecido que as transformações que ocorrem no rúmen, e que dependem da composição da dieta, são de grande importância na produção e composição do leite. Além disso, o processo de absorção no trato digestivo, o metabolismo no fígado, os processos de excreção e a mobilização das reservas corporais participam do fornecimento de nutrientes e de precursores, através do sangue, para a síntese do leite na glândula mamária. Contudo, ainda não há certeza das interações entre os metabólitos presentes nos diferentes fluidos corporais, nem entre eles e a qualidade do leite, fato que tem grande importância no esclarecimento de problemas sobre a qualidade do leite que ocasionam perda do valor e por sua vez, perda de competitividade do setor.

No contexto atual, o centro das grandes discussões em matéria de produção leiteira são as cadeias de produção, fato com profundas implicações na organização estratégica dos sistemas de produção. No mundo moderno, a globalização trouxe como norma a competitividade e, nesse campo, a cadeia do leite tem um espaço referencial em que a qualidade final do produto tem importância máxima.

O leite e seus derivados representam uma das principais fontes de proteína e minerais na dieta da população. Além disso, a atividade leiteira caracteriza-se por ser grande geradora de emprego e renda. No Brasil, o último censo agropecuário do

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) identificou no país 1,8 milhão de propriedades leiteiras, que geram 3,6 milhões de empregos diretos (Martins, 2005).

A pecuária leiteira foi o segmento da cadeia produtiva do agronegócio do leite, que sofreu mudanças mais profundas. A elevação da produção e da produtividade do rebanho brasileiro está diretamente ligada à especialização do pecuarista. O acréscimo da escala de produção compensou o declínio no número total de produtores, permitindo o aumento na captação da indústria. Esses avanços, somados à melhoria da qualidade do leite e à introdução de tecnologias adequadas à realidade do Brasil, privilegiando a utilização de forrageiras tropicais e o bom gerenciamento da propriedade, modificaram o perfil da produção leiteira. Apesar dos grandes avanços alcançados, o setor leiteiro ainda precisa progredir muito, em todos os campos (Brandão e Leite, 2002).

Segundo a FAO (2005), a produção mundial de leite no ano 2004 atingiu 625,6 milhões de toneladas, das quais a América Latina contribuiu com 34 milhões (5,43%). O Brasil participou com 23,9 milhões de toneladas, que corresponde a 71% do total do subcontinente, mas apenas 3,8% do total mundial. Segundo as previsões para o ano de 2005, se espera uma produção total de 643,1 milhões de toneladas (crescimento de 2,72%). No Brasil, a produção esperada é de 24,6 milhões de toneladas (crescimento de 2,84%).

De 1995 a 2001, a produção brasileira de leite cresceu 4% ao ano, enquanto que os demais países da América do Sul tiveram metade desta taxa de crescimento. No contexto mundial, o Brasil só foi superado apenas pela Oceânia (Nova Zelândia e Austrália), que cresceu 5,5% ao ano (Meireles e Rubenz, 2002).

Na última década, a produção de leite na América Latina cresceu, em média, 45%, enquanto que no Brasil o crescimento foi de 50,7%, o maior crescimento no subcontinente. Contudo, esse aumento de produção não permitiu o autoabastecimento na região que ainda é importadora de produtos lácteos. Situações macroeconômicas como a política cambial do Brasil geram altos riscos no crescimento, assim, por exemplo: entre janeiro e junho de 2005, o Brasil exportou o equivalente a 32,7 mil toneladas de lácteos, o que gerou receita de US\$ 50,7 milhões. No mesmo período, entretanto, as importações do segmento atingiram 40,6 mil toneladas, com gastos de

divisas na ordem de US\$ 68,5 milhões. O resultado final foi um déficit na balança comercial de lácteos de US\$ 17,9 milhões (CNA, 2005).

Com relação ao consumo per capita de leite, apenas 3 países da América Latina (Argentina, Uruguai e Costa Rica) alcançam o consumo mínimo recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) de 143 litros/ano. Os demais países têm em média 121 litros per capita. No Brasil não existe uma informação certa a este respeito. Segundo Meireles e Rubenz (2002), o consumo de leite per capita para o ano 2000 foi de 106,5 litros/ano, enquanto que para Martins (2005) foi de 138 litros/ano. Um aumento no consumo per capita de 5 litros/ano, geraria uma demanda de leite adicional de quase 1 bilhão de litros. Assim, para responder às necessidades básicas, o setor leiteiro teria que crescer a um ritmo superior a 3,5% por ano (Brandão e Leite, 2002).

O desempenho positivo alcançado pelo setor leiteiro nos últimos anos provém de uma série de fatores, como o melhoramento genético do rebanho, o surgimento de um trabalho empresarial, programas específicos de estímulo à produção e o advento do Mercosul. Ainda assim, com o aumento considerável do volume atingido, a qualidade do produto está sob suspeita, não somente em relação às exigências da inspeção sanitária, mas também às exigências dos laticínios por um produto com alta qualidade de industrialização, principalmente para a produção de queijos.

A qualidade do leite como alimento e matéria prima para a indústria de laticínios depende da sua composição química. Além de fatores relacionados com a alimentação da vaca, outros aspectos exercem efeito sobre a composição do leite, entre os quais podem ser mencionados o fator racial, o estágio da lactação, o clima, a estação do ano, a presença ou não de mastite, a contagem de células somáticas e o tipo de ordenha (Mühlbach, 2004).

Para conhecer esses fatores é urgente desenvolver métodos rápidos, seguros, econômicos e confiáveis para avaliar a qualidade do leite com relação ao metabolismo animal, o qual é a fonte das principais alterações do leite. Vários trabalhos têm sido feitos neste sentido (Cote e Hoff, 1991; Fredeen, 1996; Mottram, 1997; Kida, 2003) mas ainda não há respostas concludentes, especialmente quando se estuda o efeito do metabolismo sobre o conteúdo dos principais componentes sólidos do leite, que nas

atuais condições do mercado mundial do leite, são fatores determinantes no preço final do produto.

O trabalho é apresentado através de uma sequência de quatro artigos, dos quais os dois primeiros correspondem aos experimentos realizados na parametrização das variáveis necessárias a serem usadas nos modelos matemáticos. Os modelos são discutidos nos dois artigos finais.

O objetivo visado no presente trabalho foi determinar o valor diagnóstico de diferentes metabólitos presentes nos fluidos corporais do gado leiteiro (sangue, urina, suco ruminal e leite), como ferramenta para intervir nos processos alimentares e nutricionais que modificam a condição metabólica e a sua incidência sobre a qualidade do leite, através da modelagem da composição química do leite a partir dos indicadores endógenos do metabolismo e do controle endócrino em vacas leiteiras de alta produção na região sul do Brasil.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 O Setor Lácteo.**

Historicamente o leite tem sido conhecido como um grande alimento, com inúmeras possibilidades de transformação e conservação, visando sempre garantir um fator nutricional de alto potencial. Talvez por isso sejam explicáveis as imensas transformações feitas pelos processos zootécnicos nos bovinos produtores de leite. Hoje não interessa apenas o estudo da biologia da lactação, mas sim uma análise mais abrangente de todos os fatores comprometidos com o leite e a sua cadeia produtiva.

Internacionalmente, em razão da política de auto-suficiência observada na maioria dos países, de um total de 600 milhões de toneladas de leite de vaca produzidos por ano no mundo, pouco mais de 6%, o que equivale a aproximadamente 36 milhões de toneladas, são comercializados internacionalmente. No entanto, segundo a organização Mundial de Comércio (OMC), tal comércio representa 10% da produção de manteiga, 7% da produção de queijos, 30% da produção de leite em pó desnatado e 49% da produção de leite em pó integral. Todos esses produtos relacionam-se diretamente

com a composição do leite, em especial com a quantidade de sólidos totais (Espírito Santo e Netto, 2002).

Nas últimas três décadas, houve mudanças no padrão de crescimento da produção de leite no Brasil. Nos anos 1970, esse crescimento foi explicado pelo aumento do número de vacas; nos anos 1980, os ganhos de produtividade e o aumento do número de vacas ordenhadas explicam, por igual o crescimento da produção. Entretanto, nos anos 1990, o fator mais importante para o crescimento foi o aumento da produtividade (Gomes, 2002).

Os preços internacionais dos produtos lácteos refletem as práticas de subsídios e “dumping” utilizadas pelos países desenvolvidos, marcadamente a União Européia e os Estados Unidos. Essas práticas desleais de comércio desestabilizam os mercados, deprimem os preços internacionais e deslocam da produção eficientes fornecedores que não subsidiam, incluindo naqueles países em desenvolvimento, como o Brasil, que possuem atividade leiteira com importância social e econômica. Assim fica claro que os potenciais para as exportações brasileiras de laticínios dependem por sua vez, de duas situações: a primeira, uma articulação com os países que não subsidiam as atividades rurais, para alcançar êxito nas negociações internacionais, visando um cenário para a eliminação dos subsídios; e a segunda, a manutenção de uma alta qualidade do produto a fim de obter uma alta competitividade.

Mesmo que o Brasil implante uma grande política de consumo interno de leite, tem amplas possibilidades de ser exportador por causa de suas grandes taxas de crescimento, os menores custos de produção, a incorporação de novas áreas agrícolas, a possibilidade de dar valor agregado ao produto e a integração lavoura-pecuária, entre outras (Martins, 2005).

Segundo Espírito Santo e Netto (2002), em 1994, ano da implantação do Plano Real, a produção nacional anual de leite era de 15,78 bilhões de litros. A maior parte de essa produção era transportada em latões, sob temperatura ambiente, com grande perda de qualidade até a chegada na indústria. Para 2005, a situação segundo a Comissão Nacional de Pecuária de Leite (CNPL) da Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA) indicaram produção de leite de 24 bilhões de litros. A qualidade é

competitiva, devido em parte às implementações técnicas do Programa Nacional de Qualidade do Leite (PNQL) e à entrada em vigência da Instrução Normativa 51 (MAPA, 2002). A elevação da produção e da produtividade do rebanho brasileiro está diretamente ligada à especialização do pecuarista. O aumento da escala de produção compensou o declínio no número total de produtores, permitindo o aumento na captação da indústria. Segundo Noro (2004), o número de produtores no Rio Grande do Sul que entregaram leite aos laticínios passou de 141.439 em 1999, para 115.122 produtores em 2001 (diminuição de 18,6 %). Mas a quantidade de leite entregue foi maior. Assim, em 1999 foram entregues 5,63 bilhões de litros, enquanto que em 2001, foram recebidos 6,57 bilhões de litros de leite (aumento de 16,7 %). Os avanços, somados à introdução de tecnologias adequadas à realidade nacional, privilegiando a utilização de forrageiras tropicais e o bom gerenciamento da propriedade, como controle leiteiro entre outros, modificaram o perfil da atividade leiteira no Brasil.

As primeiras exportações relevantes de produtos lácteos ocorreram em 1996, alcançando o valor de 19,3 milhões de dólares. Em 1997, o Brasil realizou as primeiras exportações de leite condensado, menos de 576 toneladas. Hoje, esse é o principal produto da pauta de exportações de lácteos, atingindo 13,7 mil toneladas no 2002. As vendas externas de leite condensado agregam valor a três matérias-primas que o Brasil possui com baixos custos de produção: a embalagem de aço, o açúcar e o leite. Dentro das exportações, os queijos merecem destaque. Em 1996, foram exportadas 461 toneladas e em 2002 foram superiores a 2000 toneladas, evidenciando que o produto brasileiro possui qualidade, além de que entre os produtos lácteos o consumo de queijo é o que mais cresce no mundo (Espírito Santo e Netto, 2002).

O Brasil é o sexto maior produtor de leite do mundo. Apesar do aumento da produção de leite observado nos últimos dez anos, o país continua sendo um destacado importador. Há espaço para aumentar a produção, de modo a alcançar o consumo ideal recomendado pela OMS, que é de 0,45 litros/habitante/dia, além da possibilidade de se exportar leite e derivados. Para uma população estimada de 180 milhões de habitantes, a demanda atual seria superior a 29 bilhões de litros de leite/ano, sendo que atualmente é produzido em torno de 23,5 bilhões de litros/ano, o qual dá um déficit de 5,5 bilhões de litros. Além de maior produção, tem-se observado preocupação com a qualidade do

leite, o que pode ser facilmente verificado pela rápida adoção da refrigeração do leite nas fazendas e na coleta a granel em várias regiões.

O leite é um dos alimentos mais importantes para o homem e é um dos que experimentarão maior crescimento nos próximos 20 anos, tanto em termos de produção quanto em termos de consumo. Este avanço será impulsionado principalmente pelas mudanças que estão ocorrendo especialmente na Ásia e na América Latina. É esperado que seja intensificada cada vez mais a pressão sobre o agronegócio do leite para melhorar a sua qualidade, especialmente do ponto de vista da higiene e da segurança para o consumidor, como vem sendo sugerido por iniciativas como o Acordo para a Aplicação de Medidas Sanitárias, que visa regulamentar o comércio internacional de alimentos e resguardar a saúde humana, de animais e plantas.

Parâmetros de qualidade do leite são cada vez mais usados para detectar falhas nas práticas de manejo e servir como referência na valorização da matéria prima. Países que competem no mercado internacional de lácteos, priorizaram a implantação de programas de qualidade do leite cru resfriado para manter e ganhar mercados. Os principais parâmetros utilizados pela maioria dos programas de qualidade do leite, estão fundamentados na quantidade de gordura, proteína e lactose, na contagem de células somáticas e unidades formadoras de placa, na adulteração por água, resíduos e antibióticos, nas qualidades organolépticas (odor, sabor, aspecto) e na temperatura da matéria prima (Dürr, 2002).

Para atender demandas de qualidade, as indústrias têm procurado matéria prima de melhor qualidade, exigindo maior profissionalização dos produtores e aplicando programas de pagamento por qualidade a exemplo de países como Canadá, EUA, Austrália, Nova Zelândia, e países que participam do Mercado Comum Europeu. Estes também utilizam a Contagem de Células Somáticas de Leite de Tanque (CCST), como um dos parâmetros para avaliação da qualidade do leite (Ribas et al., 2002). Em nível regional, o Rio Grande do Sul é, conforme a Associação Brasileira de Produtores de Leite, o terceiro maior estado da Federação em produção do leite, sendo superado por Minas Gerais, e com escassa margem, por Goiás. Mas, o Rio Grande do Sul é o primeiro estado da Federação em produção individual, com 2,31 bilhões de litros em 2002, tendo aproximadamente 2.450.444 cabeças de gado leiteiro, sendo que destas,

1.281.907 eram vacas em produção, que atingiram uma produtividade média diária de 6,68 litros por dia, bem acima da média nacional que é de 4,89 litros por dia. A produção de leite gaúcha durante a última década teve um aumento, de aproximadamente 4,21 % ao ano (Noro, 2004).

## **2.2 Composição química do leite.**

O leite bovino é um fluido composto por nutrientes sintetizados pela glândula mamária, a partir de precursores derivados da alimentação e do metabolismo. Os principais componentes incluem: a água, os glicídios, a gordura, as proteínas, os minerais e as vitaminas. O leite é composto por mais de 100.000 tipos diferentes de moléculas, e cada uma apresenta função específica, proporcionando nutrientes ou proteção imunológica para o neonato. O leite constitui um dos alimentos mais completos que se conhece e oferece grandes possibilidades de processamento industrial para a obtenção de diversos produtos para a alimentação humana (Bachman, 1992; Collier, 1995).

A formação do leite demanda um enorme trabalho metabólico, requerendo a passagem de 450 litros de sangue pela glândula mamária para sintetizar um litro de leite. O leite é secretado como uma mistura desses componentes e suas propriedades são mais complexas que a soma de seus componentes individuais (González, 2001). O conteúdo de água no leite (87% na vaca) depende da síntese de lactose. A quantidade de água presente no leite é gerada por modificações no ponto de congelamento que podem ser determinadas através do ponto crioscópico.

A lactose é o principal glicídeo do leite. É um dissacarídeo composto pelos monossacarídeos D-glicose e D-galactose, ligados por ponte glicosídica  $\beta$ -1,4. A lactose tem importante papel na síntese do leite. É o principal fator osmótico no leite, responsável por 50% desta variável, e no processo de síntese do leite puxa água para as células epiteliais mamárias. Em função da estreita relação entre a síntese de lactose e a quantidade de água drenada para o leite, o conteúdo de lactose é o componente que tem menos variação. Outros glicídeos podem ser encontrados no leite, porém em concentrações baixas, tais como: galactose, amino-açúcares, açúcar-fosfatos, oligossacarídeos e açúcares nucleotídeos (González, 2001).

O componente lipídico do leite é formado por uma complexa mistura, sendo os triglicerídeos os lipídeos mais importantes (98%). Estes estão compostos de três ácidos graxos em ligação covalente a uma molécula de glicerol por pontes éster. A gordura do leite é secretada das células epiteliais mamárias na forma de glóbulos gordurosos, principalmente compostos de triglicerídeos rodeados de uma dupla camada lipídica similar à membrana apical das células epiteliais. Esta membrana ajuda a estabilizar o glóbulo de gordura formando uma emulsão dentro do ambiente aquoso do leite. Por estarem suspensos na água e por apresentarem uma densidade inferior a da água, os glóbulos de gordura irão concentrar-se na camada superior da massa de leite resfriado, sendo necessário homogeneizar em forma constante (Dürr, 2002).

A quantidade e a composição dos triglicerídeos do leite variam muito entre as espécies. Nos ruminantes, a proporção de ácidos graxos de cadeia curta e insaturados é bem maior que nos monogástricos. Os precursores dos ácidos graxos sintetizados no tecido mamário incluem glicose, acetato e  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB). Entretanto, alguns, ácidos graxos provenientes da dieta ou do metabolismo ruminal e intestinal são incorporados à glândula mamária a partir do sangue. Aproximadamente 25% dos ácidos graxos do leite são derivados da dieta e 50% do plasma sanguíneo. O resto é elaborado na glândula mamária a partir de precursores, principalmente de acetato. Os ruminantes sintetizam quantidades pequenas de ácidos graxos a partir de glicose, devido à falta de atividade da enzima citrato-liase. Os ácidos graxos de cadeia média (8-12 carbonos) são característicos do leite não sendo possível encontrá-los em outros tecidos. Os ácidos graxos de cadeia curta (menos de 12 carbonos) são sintetizados na glândula mamária, com participação do acetato e, provavelmente, do BHB. Os ácidos graxos de 18 átomos de carbono e alguns dos de 16 átomos de carbono derivam quase em sua totalidade do sangue, aparecendo livres apenas em quantidades muito baixas no leite. O acetil-CoA utilizado pela glândula mamária dos ruminantes para a síntese da gordura do leite se forma fundamentalmente a partir do acetato proveniente do sangue, que por sua vez, provém do acetato absorvido no rúmen (González, 2001).

A composição protéica total do leite reúne várias proteínas específicas. Dentro das proteínas do leite, a mais importante é a caseína (85% das proteínas lácteas). Existem vários tipos identificados de caseínas:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\kappa$ , todas similares na sua estrutura, mas com diferente importância na qualidade do leite. As caseínas se agregam

formando grânulos insolúveis chamados micelas. As demais proteínas do leite estão em forma solúvel. As proteínas do soro do leite variam com a espécie animal, o estágio de lactação e a presença de inflamações intramamárias. As principais proteínas do soro do leite de vaca são a  $\beta$ -lactoglobulina e a  $\alpha$ -lactoalbumina, esta última correspondendo a 2-5% do total de proteínas e funcionando como uma das subunidades da enzima lactose-sintetase.

Os principais minerais encontrados no leite são cálcio e fósforo. Eles estão basicamente associados com a estrutura das micelas de caseína. Assim, o soro do leite tem relativamente pouco cálcio e fósforo, comparado com o leite inteiro. O leite também contém pequenas quantidades dos demais minerais encontrados no organismo animal. O cálcio e o magnésio insolúveis se encontram física ou quimicamente combinados com caseinato, citrato ou fosfato, conseqüentemente, o leite tem um mecanismo que lhe permite acumular uma concentração alta de cálcio ao tempo em que mantém o equilíbrio osmótico com o sangue (González, 2001)

A glândula mamária não pode sintetizar vitaminas. Portanto, para sua secreção no leite depende do aporte sanguíneo. O leite contém todas as principais vitaminas.

O leite sempre contém leucócitos, e sua quantidade varia com a espécie e com o estado de saúde da glândula mamária. O leite contém enzimas como a peroxidase e a catalase, as quais aumentam nos processos inflamatórios.

### **2.3 Manipulação da composição do leite.**

Muitos fatores influenciam a qualidade microbiológica e a composição nutricional do leite. Aspectos tais como a raça, o estágio da lactação, a temperatura ambiental, as condições de estresse do animal, a perda excessiva de condição corporal, a estação do ano, a contagem de células somáticas, a mastite e a saúde geral da vaca, a manifestação do cio, a frequência e a técnica de ordenha e o volume de produção, exercem efeitos sobre a composição do leite. Os fatores relacionados à alimentação e à nutrição são os mais importantes e os que podem ser controlados e possivelmente conhecidos em prazos relativamente curtos, embora demandem um conhecimento mais aprofundado, já que afetam não somente a fermentação no rúmen como também o

metabolismo geral do animal e a secreção de leite no úbere (Fredeen, 1996; Mühlbach et al., 2000).

A produção de leite, em quantidade e qualidade, depende principalmente do aporte adequado de proteína e energia na dieta da vaca em lactação. A energia necessária para o metabolismo dos ruminantes provém basicamente dos ácidos graxos voláteis produzidos no rúmen pela fermentação dos diferentes alimentos e, dependendo da composição da dieta, ocorrerá uma variação entre a proporção dos ácidos graxos acético e butírico, que são os precursores de gordura do leite e o ácido propiônico que é o precursor de lactose do leite e responsável pelo volume de leite. Assim, os efeitos do aporte de energia na dieta podem ser variáveis, afetando o teor de gordura ou influenciando a quantidade do leite.

A síntese de leite desloca o metabolismo energético para ela. Geralmente, a subnutrição energético-protéica reduz a qualidade do leite (teor de gordura). Quando o animal produz grandes volumes de leite, devido ao mérito genético e não tem adequado fornecimento de energia para sustentar a alta produção o animal pode apresentar perda de peso, mobilizando reservas de gordura e proteína. Metabolicamente, os corpos cetônicos aumentam sua concentração no sangue, leite e urina (Heuer et al., 2001). Uma deficiência protéica na dieta pode ter efeito variável sobre o teor de gordura do leite. Se o teor de gordura anterior à deficiência protéica for normal (segundo o padrão da raça), tenderá a haver uma redução, especialmente se isso ocorrer nas primeiras semanas da lactação. Caso o teor de gordura já estiver inferior a 3%, a deficiência protéica não causará maior efeito depressivo (Kennelly et al., 1999; Mühlbach, et al., 2000).

Na prática observa-se que, com o aumento no fornecimento de concentrado, aumenta a produção de leite, com queda no teor de gordura, em diferentes níveis segundo o tipo de produção. Às vezes, em animais de alta produção de leite, apesar da diminuição na percentagem de gordura, não há diminuição da produção total de gordura (litros de leite multiplicados pelo teor de gordura). Isto porque o maior volume de leite alcançado pelo fornecimento de concentrado, o qual produz maior quantidade de ácido propiônico precursor de lactose, compensa a queda na percentagem de gordura. Contudo, a quantidade de concentrado não pode estar acima do 50% na matéria seca

(MS), devido a que altas taxas de fermentação típicas dos concentrados, causam intensa queda no pH do rúmen, levando o animal a diminuir o consumo de alimento. É o que ocorre no caso da síndrome de acidose subclínica (SARA), em que o pH do rúmen está grande parte do tempo abaixo de 6,0, o que retarda a fermentação do alimento volumoso, prejudicando a biossíntese de proteína bacteriana (Enemark et al., 2004). A queda no teor de gordura do leite seria devida a duas condições no rúmen: uma fermentação anormal, com diminuição do pH e relação acético:propiónico inferior a 3, devido ao excesso de concentrado, e também como consequência da presença de gordura insaturada na dieta (Griinari et al., 1998).

A adição de quantidade controlada de óleo vegetal (gordura insaturada) pode baixar o teor de gordura em até uma unidade percentual, embora a produção de gordura total pode permanecer igual ou até aumentar (Bachman, 1992). Todavia, quantidade excessiva de óleo vegetal na dieta é tóxica às bactérias celulolíticas do rúmen, que produzem o ácido acético a partir da fermentação da fibra; assim, há redução da fermentação da fibra e, em consequência, queda no teor de gordura do leite (Delbecchi et al., 2001). As chamadas gorduras “bye-pass” (que não sofrem alterações fermentativas no rúmen), fornecidas na dieta de vacas em lactação, além de melhorar o equilíbrio energético-protéico do animal, podem aumentar a proporção de certos ácidos graxos de ligações duplas conjugadas na gordura do leite, como o ácido linoléico, com reconhecido potencial no mercado do leite (Mühlbach et al., 2000).

Os carboidratos não fibrosos (farelos, farinhas, grãos, resíduos amiláceos da indústria, silagem de grão úmido, etc.), também chamados glicídios de rápida fermentação (GRF) são importantes porque, ao serem fermentados, produzem rapidamente a energia necessária para os microrganismos do rúmen se multiplicarem. Essa liberação de energia permite a transformação da amônia em proteína microbiana, que é a principal fonte de aminoácidos para a produção da proteína do leite. Os GRF também fornecem parte da energia necessária para aumentar o volume de leite produzido. Em geral, o fornecimento de concentrado no limite máximo (50% da MS) tende a aumentar o teor de proteína no leite (Mühlbach et al., 2000).

Os ionóforos (aditivos antibióticos que modificam as taxas de fermentação) podem diminuir a proporção de ácido acético e aumentar a proporção de ácido

propiónico. Seu uso em vacas de alta produção pode diminuir o risco de cetose no início da lactação, o que pode aumentar a produção do leite, mas em recentes estudos demonstra-se que seu uso pode causar redução no teor de gordura do leite (Fredeen, 1996).

De forma geral, o teor de proteína bruta do leite é determinado a partir da análise do teor de nitrogênio multiplicado pelo fator 6,38. A caseína, que é a proteína de maior interesse na fabricação dos queijos, pode chegar até 79% da proteína bruta do leite, em quanto que 17% corresponde às proteínas do soro (lactoalbuminas) e 4% compõe o nitrogênio não protéico, do qual 48% é uréia (DePeters e Cant, 1992).

O teor de proteína no leite somente é afetado pelo teor de proteína na dieta quando esta estiver abaixo do mínimo recomendado. Com níveis acima de 15% na MS, praticamente não há resposta à suplementação protéica, em termos de aumento na proteína no leite. Os principais estudos na relação proteína na dieta e proteína do leite, têm a ver com o nível de degradabilidade, que se reflete nos níveis de Nitrogênio Uréico no Leite (NUL), excelente indicador da ingestão de proteína e de sua relação com os níveis de energia na dieta. O uso do NUL é uma boa ferramenta para monitorar a eficiência com que a proteína da dieta é aproveitada pelo animal. É recomendada uma proporção de 35-40% da proteína bruta total, como não degradável no rúmen, já que mudanças nas proporções afetam o teor de caseína do leite e assim o rendimento em queijo. O uso de proteína menos degradável no rúmen pode aumentar o teor de proteína do leite, a produção de leite, como também aumentar os níveis de nitrogênio não protéico, sempre às custas do teor de caseína (DePeters e Cant, 1992).

Há unanimidade na literatura em relação ao fato de que a lactose é o componente do leite menos afetado pela alimentação. Sob condições normais, o teor de lactose é um pouco menor no início e no fim da lactação, com mudanças que acompanham a curva de produção. A lactose é considerada o indicador do volume de produção “marca-passo”, ou seja, quanto mais ácido propiónico estiver disponível para a síntese de lactose no úbere, tanto mais leite é secretado (Mühlbach et al., 2000). A lactose e o potássio mantêm o equilíbrio osmótico entre o leite e o sangue, através da retirada de água dos fluidos extra e intracelulares. Assim, quanto mais lactose é secretada, tanto mais água é necessária para formar o leite, sendo que o leite tem 87,5% de água (Fredeen, 1996).

## **2.4 Indicadores do metabolismo.**

Marcadores bioquímicos são substâncias cuja determinação em amostras de tecidos ou fluidos animais, permitem estabelecer o grau de adequação metabólica ou de homeostase em um processo bioquímico do organismo de um animal ou grupo de animais (Wittwer, 2000).

A maioria dos transtornos metabólicos pode ser detectada mediante o uso de perfis bioquímicos no sangue e outros fluidos biológicos nas épocas em que os animais são mais suscetíveis, como na época do peri-parto. A aplicação dos perfis bioquímicos, levando em conta as características dos rebanhos, a localização geográfica e o estado fisiológico dos animais, oferece uma importante perspectiva para detectar em tempo alguns distúrbios metabólico-nutricionais, que afetam a saúde, a produção e a fertilidade dos rebanhos (Wittwer, 2000).

Na maioria dos transtornos ruminais e metabólicos, as alterações bioquímicas iniciais podem ser detectadas no líquido ruminal, na urina e no leite (Bouda et al., 2000).

Com base nos estudos de perfil metabólico, diferentes trabalhos estabeleceram relações entre componentes sanguíneos e componentes no leite que podem refletir desequilíbrios metabólico-nutricionais a partir de um fluido muito mais fácil de ser obtido, como é o caso do leite (Fredeen, 1996; Hamann e Krömker, 1997; Kida, 2003).

### **2.4.1 Indicadores no sangue.**

A composição bioquímica do sangue reflete de maneira confiável o equilíbrio entre o ingresso, o egresso e a metabolização dos nutrientes nos tecidos animais. O grau de equilíbrio chama-se homeostase, processo em que estão envolvidos complexos mecanismos metabólico-hormonais. A interpretação dos componentes químicos do sangue, conhecido como Perfil Metabólico, pode ser útil para diagnosticar diferentes desequilíbrios no animal (González, 1997).

Segundo Wittwer (1995), o perfil metabólico pode analisar inúmeros metabólitos, os quais podem ser agrupados para testar o metabolismo protéico (hemoglobina, uréia,

proteínas totais, albumina, globulinas), o metabolismo energético (glicose, corpos cetônicos,  $\beta$ -hidroxibutirato, ácidos graxos não esterificados, triglicerídeos, colesterol) o metabolismo mineral (cálcio, fósforo inorgânico, magnésio, sódio, potássio, cobre, zinco, selênio) e a função hepática (enzimas celulares: AST, FA, ALT, GGT).

Através do uso do perfil metabólico é possível estudar e corrigir doenças metabólico-nutricionais, monitorar a adaptação metabólica e diagnosticar desequilíbrios da homeostase de nutrientes (González, 2000).

Cote e Hoff (1991) propuseram a interpretação rotineira do perfil metabólico como uma importante ferramenta no estudo de problemas na produção leiteira. Agora, o uso do perfil é uma prática normal nos rebanhos leiteiros dos países desenvolvidos (Oetzel, 2001).

No Brasil, relativamente poucos trabalhos têm sido feitos em relação aos perfis metabólicos, embora atualmente com maior frequência encontram-se referências nessa área da patologia clínica (González, 2002; Lago et al., 2004).

#### **2.4.2 Indicadores na urina.**

A urina tem sido usada como um bom indicador que pode testar algumas desordens metabólicas (Ortolani, 2002; Oetzel, 2001).

A urina é um fluido formado nos rins como resultado da filtração do plasma, sendo suas principais funções: eliminação de substâncias produzidas pelo catabolismo corporal, e portanto potencialmente tóxicas ao organismo (uréia, creatinina, uratos), e eliminação do excesso de substâncias (íons sódio, potássio, cloreto e hidrogênio). A urina participa na manutenção da homeostasia normal do plasma, regula a perda de metabólitos orgânicos e garante a eliminação de substâncias hidrofílicas indesejáveis (Kantek, 1996).

A maior ou menor taxa de filtração, reabsorção e excreção de alguns nutrientes e catabólitos pelos rins permite com que a urina seja utilizada no diagnóstico de algumas situações metabólicas. Uma das grandes vantagens da urina é a sua fácil coleta. O ideal é que a urina coletada seja analisada o mais rapidamente possível, em especial quando se querem determinar substâncias voláteis como os corpos cetônicos, que têm certa instabilidade química. Quando não for possível sua pronta análise, recomenda-se conservação sob refrigeração a 4 °C até por 12 horas (Ortolani, 2002).

O pH urinário está influenciado pelo balanço de íons  $H^+$  e bicarbonato na urina. Quanto maior  $H^+$ , menor bicarbonato e vice-versa. Em muitos casos o pH urinário reflete o estado de acidose ou alcalose do organismo com um todo, porém em outras situações esta variável não é boa indicadora do que acontece no sangue devido a mecanismos compensatórios de eliminação do íon oposto. A excreção de íons  $H^+$  está fortemente atrelada à eliminação de amônia pelos rins. Uma molécula de amônia excretada no túbulo contorcido proximal se associará a um íon  $H^+$  dentro da luz deste segmento. Partes dos íons  $H^+$  excretados na urina podem também estar associados à eliminação de moléculas de fosfato e lactato. Já o bicarbonato provém na sua maioria da própria passagem de bicarbonato sangüíneo pelo glomérulo renal. Quanto maior a concentração sangüínea de bicarbonato, maior a filtração desta molécula pelo glomérulo (Kaneko et al., 1997). O pH normal urinário dos ruminantes varia de 6,5 a 8,0; normalmente os bovinos sob pastejo têm um pH urinário bastante alcalino, enquanto que animais recebendo dietas ricas em carboidratos solúveis apresentarão um pH mais ácido. Os valores de pH urinário variam no decorrer do dia, sendo mais ácidos logo após à alimentação devido à menor filtração glomerular. Também, o pH urinário pode se alterar pelas bactérias contaminantes da urina, as quais podem degradar a uréia em amônia, principalmente se o pH original da urina for maior que 7,3, alcalinizando sensivelmente o pH urinário (Ortolani, 2002).

Os corpos cetônicos são compostos primários formados no metabolismo das gorduras e do butirato, estando representados pelo  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB), o acetoacetato e a acetona. O acetoacetato é quimicamente instável e pode ser transformado em acetona e dióxido de carbono. Tanto o acetoacetato como o BHB são

compostos ácidos, com pKs baixos, ou seja, que no sangue cerca do 99% estarão na forma ionizada, e se estiverem em grande quantidade poderão provocar acidose metabólica. Normalmente os corpos cetônicos são formados em pequena quantidade no organismo, não se acumulando. A detecção de acetona e de acetoacetato na urina é feita por meio da prova de Rothera, que utiliza o nitroprussiato de sódio como reativo. Esta prova é rápida e pode ser realizada com uso de fitas ou tabletes comerciais (Kaneko et al., 1997; Geishauser et al., 1997).

Normalmente as proteínas deverão estar ausentes embora em algumas circunstâncias podem aparecer em quantidades muito baixas. Só é possível achar níveis altos de proteínas urinárias associadas a processos inflamatórios genito-urinários ou a nefrose. A proteinúria é fisiológica em terneiros nas primeiras horas após o parto (Bouda et al., 2000).

A glicose, quando em quantidade normal no sangue, encontra-se ausente na urina devido ao fato dela ser totalmente reabsorvida nos túbulos proximais renais. O aparecimento de glicosúria ocorre quando a quantidade de glicose no filtrado glomerular é superior à capacidade de reabsorção do túbulo, ou quando a reabsorção tubular é insuficiente. A presença de glicosúria deve ser relacionada com os níveis de glicose no sangue (Kantek, 1996).

O urobilinogênio provém do metabolismo da bilirrubina e sua determinação na urina tem interesse porque normalmente é possível detectar alterações antes que no sangue (Kaneko et al., 1997).

### **2.4.3 Indicadores no suco ruminal.**

Os ruminantes ocupam uma grande posição estratégica com relação a outros animais. Eles podem obter seus nutrientes a partir de fibra e fontes não protéicas; por sua vez, o complexo mecanismo fermentativo otimiza a utilização de diferentes produtos no sistema digestivo. Nas cadeias alimentares, os ruminantes desenvolvem um

importante papel na transformação do carbono fixado nos tecidos vegetais através da fotossíntese, em substâncias orgânicas, entre elas o leite (Van Soest, 1994).

Nos ruminantes, especialmente nos bovinos, os transtornos digestivos que ocorrem no rúmen e as doenças metabólicas são fenômenos que se apresentam frequentemente. A maioria das alterações ocorre sem forma evidente (subclínica), embora, durante as doenças metabólicas os animais podem diminuir sua produção em 10 a 30% (Bouda et al., 2000).

Conhece-se que animais sob pastejo apresentam diferentes formas dos processos fermentativos, os quais na maioria das vezes têm profunda relação com o tipo de forragem fornecido como alimento para os ruminantes. Além de o animal apresentar mudanças nos processos digestivos, muda também a composição do leite, como reflexo direto das mudanças alimentares (Soriano et al., 2000).

Vários trabalhos têm testado de forma específica o efeito da composição da dieta ou de seu tipo de degradação sobre a composição do leite e a forma ideal de seu monitoramento. Este fato mostra a grande importância dos estudos da fermentação ruminal e sua relação com a qualidade do leite (Sutton, 1989; Fredeen, 1996; Mühlbach et al., 2000).

A detecção de transtornos ruminais e metabólicos tem de seguir uma metodologia que possa garantir uma amostragem homogênea entre os animais suspeitos das doenças. Sugere-se monitorar vacas no início da lactação principalmente (Bouda et al., 2000).

Inúmeras pesquisas têm sido feitas no mundo para manipular o ecossistema ruminal, visando melhorar as taxas de eficiência na fermentação. Nos últimos anos têm sido pesquisados os efeitos de antimicrobianos (especialmente ionóforos), o efeito da adição ou supressão de componentes da dieta, a produção de gás, a produção de

hidrogênio e a utilização de energia dentro do rúmen, entre outros aspectos estudados (Van Soest, 1994; Martin, 1998).

Diferentes modelos experimentais têm sido analisados, procurando obter aproximações matemáticas para o comportamento dos fluídos biológicos indicadores da química sanguínea e a sua relação com os processos digestivos no rúmen (Brown et al., 2000).

Entre as disfunções digestivas encontra-se a alcalose ruminal, originada por desequilíbrio na dieta, determinando um aumento na concentração de radicais  $\text{NH}_3$  no rúmen, aumento do pH ruminal e uma alcalose sistêmica. As principais causas podem ser: alto conteúdo de substâncias nitrogenadas na dieta, presença de nitratos ou nitritos em algum componente da dieta, uso de substâncias alcalinizantes e intoxicação por amônia pelo uso de uréia (Ortolani, 2002).

Na metade da década dos 1990, a acidose ruminal subaguda (SARA, da sigla do inglês “Subacute Ruminal Acidosis”), cobrou grande importância no manejo dos ruminantes, especialmente quando os animais são alimentados com grãos. A Sara é um grave problema metabólico com severas repercussões na saúde das vacas e na quantidade e qualidade do leite (Brown et al., 2000; Enemark et al., 2004).

O melhor método para o diagnóstico de SARA é a medição do pH ruminal. O suco ruminal pode ser coletado mediante sonda ruminal ou através de rumenocentese (Bouda et al., 2000; Enemark et al., 2004).

Ainda sendo a medição do pH, a prova definitiva para diagnosticar a SARA, existem alguns fatores que precisam ser controlados a fim de evitar erros na medição, tais como: técnica de medição, calibração dos aparelhos, hora de medição, tipo de amostra coletada e volume da amostra (Oetzel, 2001).

No suco ruminal também é possível determinar alguns outros indicadores da atividade do rúmen: a determinação da atividade redutiva bacteriana pode avaliar o estado de normalidade ou anormalidade da microflora ruminal; a avaliação de protozoários através da densidade da população e a intensidade dos movimentos destes microorganismos. Indicadores físicos como cor, consistência e sedimentação dão informações úteis (Bouda et al., 2000).

#### **2.4.4 Indicadores no leite.**

O monitoramento, em qualquer atividade, é a ferramenta que permite a identificação dos pontos limitantes e os resultados de suas eventuais correções. É preciso saber o que ocorre e posteriormente ter parâmetros ou objetivos que possam ser alcançados para que se possa atingir a eficiência. A nutrição, base fundamental da produção, pode ser monitorada de diversas formas. O acompanhamento da condição corporal dos animais e o perfil metabólico do rebanho, por exemplo, são indicadores da adequação nutricional. Existe, porém uma forma de monitoramento nutricional do rebanho ainda pouco explorada, qual seja a composição do leite (Collier, 1995).

Existe um equilíbrio isotônico entre o sangue e o leite, embora não exista o mesmo equilíbrio entre os componentes individuais nesses fluidos. A glândula mamária obtém do sangue 80% dos compostos primários para a síntese do leite. Dentro da dinâmica dos fluidos corporais, o leite apresenta um excelente meio para conhecer estados metabólico-nutricionais nas vacas, uma vez que se trata de uma secreção obtida por filtração sangüínea. Muitos metabólitos são secretados no leite e outros utilizam esta via como rota de excreção, de forma que sua medição pode indicar o grau de trabalho metabólico feito (González e Campos, 2003).

Atuais estudos no Brasil, fazem medições em diferentes fluidos corporais, procurando informação útil nos processos necessários para garantir a qualidade do leite. O fato constitui um novo tipo de estudo em áreas diferentes, cujas particularidades possam dar respostas adequadas aos problemas que afetam a qualidade do leite tal como se faz nos países desenvolvidos (González, 2001).

## 2.5 A modelagem como ferramenta de análise

Segundo Lovatto e Sauvart (2002) o desenvolvimento de sistemas de modelos pressupõe sistematização do conhecimento e atenção a critérios específicos. O uso de modelos nos sistemas agrícolas permite a integração dos aspectos sociais, econômicos, vegetal e animal. A modelagem aplicada à agricultura pode ser utilizada como uma ferramenta para melhor compreender e otimizar a performance e/ou a veracidade dos sistemas. A simulação pode também ser usada para verificar as áreas onde o conhecimento é escasso ou mesmo inexistente.

Cada pessoa usa implicitamente modelos dentro de uma exploração permanente e às vezes automática do meio ambiente. Cada um de nós tem uma necessidade de lógica e de métodos dentro de suas relações com o mundo. A modelagem é, portanto, muito mais presente e real do que imaginamos no cotidiano. No entanto, a modelagem com objetivos acadêmicos e de pesquisa nas áreas agrárias é relativamente recente. Na verdade foram os estudos de Fischer na década de 1930 que indicaram a possibilidade de integrar num mesmo modelo analítico diferentes fatores de variação. A seqüência disso foi a integração da análise de variância na rotina experimental. Esta técnica matemática ajudou a esclarecer e a compreender as fontes de variação e conseguiu um grande avanço na qualidade da pesquisa agrícola. Porém, foram os modernos computadores e o desenvolvimento da informática que permitiram a multidisciplinaridade na concepção e no uso dos modelos.

A compreensão das relações entre os componentes bióticos, abióticos, econômicos e sociais requer um balanço entre o conhecimento desta complexidade e a sua integração através dos distintos níveis hierárquicos de organização do sistema. O desenvolvimento de modelos de simulação e sua implementação em programas para computador têm sido a maneira mais adequada de obter uma ferramenta útil para o estudo das relações entre os fatores associados a um campo específico do sistema em estudo (Cangiano et al., 2002).

O conceito de “sistema” carrega consigo as problemáticas inerentes aos sistemas, que tem como premissa cinco grandes áreas de estudo. A primeira, as relações com o meio ambiente. A segunda, a organização interna com suas hierarquias funcionais e estruturais e das características constitutivas ou somáticas. A terceira, é a

noção de conservação que implica no estado do sistema e de sua homeostasia. A quarta, é a necessidade de variação que por sua vez, é função da finalidade. A quinta área se relaciona com a evolução do sistema no tempo.

O desenvolvimento de um modelo segue etapas sucessivas e lógicas e incluem:

1. Formulação clara de objetivos para fixar e descrever os limites dentro dos quais se desenvolverá o trabalho. As qualidades do modelo e da simulação estão fortemente relacionadas à simplicidade dos objetivos.
2. escolha do sistema a qual leva implícita a hierarquização das informações e a relação do conhecimento com o seu nível de agregação ou de explicação.
3. Formulação de hipóteses quantitativas, passo que permite a interação no tempo e no espaço com o modelador. Usualmente nesta fase se elabora o chamado “diagrama de Forrester”, o qual é uma representação da anatomia do modelo, onde as relações e hierarquias entre os componentes ficam representadas graficamente.
4. A formulação de hipóteses qualitativas que representam a maneira como são definidas as relações matemáticas dentro do modelo. Geralmente os modelos biológicos são feitos a partir do conceito de compartimento e a regra básica neles é que a variação da massa de uma variável de estado durante um determinado tempo seja a diferença entre o fluxo de entrada e o fluxo de saída. O desenvolvimento das hipóteses quantitativas precisa da ajuda das equações diferenciais, isto é uma construção matemática dos processos.
5. A determinação dos parâmetros ou fase de parametrização. Um parâmetro pode ser definido dentro da modelagem, como um elemento numérico que, multiplicado pela variável de estado, produz um fluxo de troca. Os parâmetros são obtidos a partir de três métodos fundamentais: experimentação, pesquisa de opinião ou análise bibliográfica, esta última de especial importância pela revisão e conhecimento do estado da arte na área de estudo. A fase final corresponde à avaliação do modelo, que poderá ser interna ou externa. A avaliação interna testa a coerência interna do modelo, isto é, se os princípios levados em conta na escolha das hipóteses qualitativas e quantitativas se expressa na forma esperada no momento da simulação. A avaliação externa tenta estabelecer se o modelo reproduz em forma coerente situações diferentes (Lovatto e Sauvart, 2002).

### 2.5.1 Tipos de modelos

Segundo Fialho (1999) os modelos podem ser classificados em três grupos: físicos, conceituais ou teóricos, e matemáticos. Os modelos físicos são uma representação geralmente em menor escala da realidade, como por exemplo as maquetas de edifícios ou de usinas. Os modelos teóricos ou conceituais descrevem o sistema ou seu comportamento através de teorias ou gráficos. Os modelos matemáticos descrevem o sistema mediante equações matemáticas para o qual são necessários dados como entrada e saída do modelo.

Os modelos matemáticos por sua vez podem ser classificados como modelos “lineares” ou “não lineares” de acordo ao tipo de equações que eles constituem. Também podem ser classificados em “empíricos” ou em “mecanicistas”, segundo o grau de explicação dos fenômenos que eles descrevem ou estimam. Igualmente os modelos matemáticos podem ser classificados como “estáticos” ou como “dinâmicos”, de acordo a como eles trabalham com relação ao tempo. Finalmente os modelos matemáticos podem ser “estocásticos” ou “determinísticos”, de acordo com o tratamento probabilístico dado a suas variáveis e seus parâmetros (Sainz e Baldwin, 2002)

Os modelos lineares têm natureza normativa e são utilizados em situações que permitem a linealização do problema. Para que um sistema possa ser considerado linear, deve respeitar algumas considerações, algumas delas básicas a todos os procedimentos do delineamento experimental (Danfaer, 1991). Entre estas condições estão: simplicidade, alto grau de precisão, ausência de erro sistêmico, amplo intervalo de validade das conclusões e levar implícito o cálculo do grau de incerteza. Outras condições, pelo contrário, são inerentes à própria técnica de análise matemática da regressão linear, tais como: o objetivo do problema deve ser único e visa otimizar (maximizar ou minimizar) a solução deste; a função objetivo deve ser especificada e conter todas as alternativas disponíveis, chamadas variáveis de decisão; todas as variáveis devem estar sujeitas a restrições e limites, devem possuir expoente 1 e contribuição proporcional e aditiva na função objetivo.

Os sistemas lineares permitem a simplificação da estrutura matemática, reduzindo a necessidade de recursos computacionais de alto porte (software e hardware)

para a sua resolução. Infelizmente, vários componentes e fenômenos que ocorrem no interior dos sistemas agropecuários, não têm comportamento linear. Nas funções ou sistemas não lineares pelo menos uma das variáveis apresenta expoente diferente de 1, e que não permite a linearidade e/ou a aditividade das contribuições na função objetivo (Ragsdale, 1997).

Os modelos dinâmicos têm dentro de suas bases conceituais a variação de um fator em função do tempo, quase sempre registrado como  $\Delta x \Delta t^{-1}$  onde,  $\Delta x$  = variação da atividade do fator em estudo e  $\Delta t$  = tempo no qual o fator acontece. Na prática matemática, isto é conhecido e estudado dentro das equações diferenciais (na situação apresentada é de primeiro caso). A definição mais simples de equação diferencial, é uma equação que contem derivadas e são de grande utilidade nos estudos de fluidos, dissipação de calor, mudança de peso e aumento ou diminuição de populações, entre outras. As equações diferenciais podem ser simples ou com uma única variável, e equações parciais, onde entram mais de duas variáveis independentes. As soluções das equações diferenciais não são únicas, levando como solução um conjunto matemático conhecido como sistema de equações. Atualmente, existem pacotes computacionais que, através de algoritmos especiais (Euler, Runge-Kutta), fazem a solução destas equações um processo relativamente amigável, quase sempre mediante o uso das integrais matemáticas (Sainz e Baldwin, 2002).

Os modelos que incluem dentro de seu objetivo de estudo variáveis aleatórias são definidos como modelos estocásticos. Até faz pouco tempo, estes modelos foram estudados a partir dos tradicionais ajustes alcançados mediante a teoria dos mínimos quadrados (mais conhecida como método frequentista). Estes métodos não conseguiram um alto grau de aproximação para o controle das incertezas, colocando-os como pouco capazes de prever com segurança. Nos últimos anos, apareceu um novo enfoque sobre a abordagem probabilística, surgida a partir da possibilidade computacional para a aplicação do teorema de Bayes. Os atuais modelos que usam o método bayesiano têm tido grande sucesso devido a que todos os parâmetros podem ser usados dentro do modelo como variáveis aleatórias, o qual requer um menor número de dados pois os conceitos probabilísticos envolvidos diminuem a dependência do ajuste do modelo em relação ao número de dados utilizados (Silva et al., 2005).

O método bayesiano de probabilidade permite a obtenção imediata de intervalos de credibilidade, levando em conta a incerteza existente nos parâmetros simultaneamente, sendo portanto, a estimação por intervalo geralmente mais precisa em relação àquela apresentada no método frequentista de ajuste. O método bayesiano é útil em estudos epidemiológicos, no estudo de curvas de lactação, de estudos dose-resposta já que possui informações *a priori* a respeito dos parâmetros de uma função de verossimilhança dos dados, e do cálculo de distribuição de probabilidade *a posteriori*. Normalmente são usadas ferramentas como simulação de Monte Carlo ou algoritmos interativos tipo “Gibbs Sampler”, através dos quais melhora a informação externa ao estudo e os próprios parâmetros do modelo observado, estimando uma distribuição de probabilidade para a magnitude do fenômeno pesquisado (Silva et al., 2005).

## 2.6 Metabolismo e modelagem

Os organismos animais são sistemas biológicos cujas características são a alta complexidade e o alto grau de controle interno. Trata-se de sistemas operativos constituídos por compartimentos hierárquicos e vias conexas que agem sobre o transporte de substâncias ou sobre os processos metabólicos. Também existem os sistemas reguladores principalmente compostos pelo sistema endócrino (Baldwin e Donovan, 2000).

O avanço no estudo dos sistemas tem sido muito maior sobre os sistemas operativos que sobre os sistemas reguladores, embora seja necessário mais trabalho de pesquisa nesta área, principalmente porque o metabolismo dos animais superiores tem processos aditivos, porém independentes entre eles, mediante os quais é garantida a sobrevivência (regulação na procura da homeostasia) ou para a perpetuação da espécie (homeorhesia) (Sauvant, 1994). No estado atual do conhecimento, só é possível o uso de modelos matemáticos empíricos, muitos deles obtidos mediante regressão linear. A complexidade das reações enzimáticas, o alto grau de controle necessário, a cinética enzimática e as interações entre órgãos e tecidos fazem difícil o uso de modelos não lineares. Os modelos empíricos também são chamados de “caixa preta”, porque não fazem interações entre os sistemas e o seu grau de agregação é mínimo, procurando estimar a resposta (saída) em função dos dados de entrada, sem explicar como se dá o funcionamento do sistema (Lovatto e Sauvant, 2001). Nesses modelos, os parâmetros das equações são determinados através de análise de regressão linear quando possível, e

não linear quando necessário, como é o caso dos modelos matemáticos das curvas de produção (Medeiros, 2003).

Sem dúvida, seria muito melhor modelar os sistemas biológicos desde a ótica dos modelos mecanicistas já que eles integram relações de causa efeito e mais de um nível de organização. Desse modo, permitem estimar e explicar as mudanças ocorridas no sistema em resposta a alterações nas variáveis, das equações e as relações de troca entre os componentes do modelo (Woodward, 1997). Contudo, seria melhor usar modelos dinâmicos devido a que através do uso destes é possível simular com maior segurança as mudanças no sistema decorrentes da variável tempo, toda vez que os seres vivos mudam seu comportamento no tempo, assim pode-se usar modelos dinâmicos para analisar, por exemplo, o efeito da lactação no comportamento de alguma variável de interesse. Para os sistemas de produção do leite no Brasil, uma primeira aproximação ao uso deste tipo de modelo foi o trabalho de Assis e France (1983)

Selecionar um modelo útil nos sistemas biológicos não é uma tarefa simples. Muitas vezes seria desejável o uso de um determinado modelo pelas vantagens teóricas que possa oferecer. No entanto, nem sempre isto pode ser feito, por causa do tipo de informações (dados) com que se conta no momento de fazer o modelo. O uso atual dos modelos na pesquisa agropecuária não é uma grande área de trabalho, mas num futuro com certeza o será, levando em conta as freqüentes restrições no uso de animais em experimentação invasiva, as polêmicas críticas dos ambientalistas, o alto custo das pesquisas e a marcada redução nas fontes de financiamento. A seguir serão apresentados alguns benefícios do uso dos modelos.

## **2.7 Principais usos de modelos em animais**

Desde a metade do século XIX foram conhecidos os estudos de Gompertz sobre o crescimento, os quais foram a base conceitual de todos os estudos sobre o crescimento que levaram à formulação das equações exponencial, logística e de Richards, todas elas baseadas no peso como avaliador da taxa de crescimento. A maioria de equações que representam a dinâmica fisiológica de crescimento dos organismos superiores, tem um formato sigmóide com um ponto de máximo crescimento e um ponto de inflexão que pode variar em relação às taxas de aceleração positiva ou negativa que se apresentem. O ponto de inflexão geralmente corresponde a 30% do peso maduro. Aos conceitos

iniciais sobre o crescimento foram-se agregando inúmeras condições que descreviam melhor este processo, assim surgindo o conceito de proteína e maturidade que deu origem à aplicação dentro dos modelos dos estados nutricionais. Os modelos de crescimento têm premissas similares a todas as espécies, mas os parâmetros são individuais, já que cada espécie tem um potencial específico de assimilação de proteína e de expressão de seus fatores de crescimento. Assim, por exemplo, um modelo de crescimento para aves, requer parâmetros diferentes para broilers ou para perus (Sainz e Baldwin, 2002).

A incorporação de variáveis nutricionais para a análise do crescimento levaram a estudos sobre requerimentos, efetividade de resposta, cálculos de quantidades ótimas de alimento, que mudaram completamente a nutrição moderna, onde o objetivo principal é maximizar o uso dos nutrientes (energia, proteína). Desta forma foram gerados modelos para nutrição nos quais cada dia incorporam-se maior número de parâmetros, e fazem destes modelos verdadeiros sistemas de integração biológica e econômica, devido a que muitos dos pacotes, além de otimizar o valor biológico de uma ração, trabalham procurando o custo mínimo, pelas pressões de competitividade. Exemplos especiais de modelos para sistemas de nutrição são o CNCPS (Cornell Net Carbohydrate Protein System) que otimiza o uso de energia metabolizável em relação a diferentes condições fisiológicas e do ecossistema de produção. Os sistemas do NRC (National Research Council, EUA) para gado de leite ou corte ou o sistema ARC (Animal Research Center, UK) de nutrição, geralmente são baseados em cálculos feitos baseados nos nutrientes digestíveis totais, mas ajustam fatores como densidade energética do alimento, raça, sexo, atividade física, temperatura, estado nutricional prévio, etc. Estes sistemas através de sofisticadas equações empíricas geram modelos estáticos e fatoriais que implicam um grande número de parâmetros de entrada e produzem saídas de alto valor teórico e de manejo. Mediante o uso de modelos de este tipo, foi padronizado o peso metabólico dos animais como sendo a potência 0,75 do peso do animal ( $W^{0,75}$ ), fator este de máxima importância nos estudos farmacológicos, de nutrição e de bioenergética.

O avanço atual da nutrição de ruminantes é devido, em grande parte, aos estudos feitos sobre modelos biodinâmicos do ambiente ruminal. O conhecimento de taxas de fermentação, taxas de passagem, liberação de amônia, metano, dióxido de carbono e gases voláteis foi produto da pesquisa feita com modelos matemáticos de simulação.

Muitos desses conceitos foram usados na geração de técnicas, hoje de uso rotineiro, tais como FDN, FDA e digestão *in vitro*, entre outras (Van Soest, 1994).

Uma visão moderna sobre o crescimento é formulada a partir dos conceitos moleculares e histológicos, para os quais, foi preciso desenvolver modelos mecanicistas, levando em conta as condições particulares dos diferentes órgãos e sua situação endócrina. Produto final do anterior conceito são os atuais estudos sobre composição da carcaça, crescimento diferencial, adaptações de tecidos de reserva, adaptação, proliferação celular e apoptose. Estes estudos levam em consideração as determinantes genéticas de cada espécie (quantidade de DNA), expressão genética em cada um dos tecidos e atividade enzimática responsável por essa expressão (Sainz e Baldwin, 2002).

Outra grande área de abrangência dos modelos para ruminantes são as curvas de lactação. Para o pessoal envolvido nos sistemas de produção leiteira, o conhecimento da curva de lactação é fundamental para o desenvolvimento de programas de nutrição, alimentação, seleção genética, estimação de produção, manejo reprodutivo e delineamento da estrutura populacional do rebanho, entre outras atividades. A curva de lactação típica foi proposta por Wood em 1967, na qual foram definidos como os principais parâmetros a taxa de produção do leite e três tempos fixos: pico de produção, início do declínio da produção e semanas totais de lactação. Com estes poucos parâmetros, podem se estimar outros parâmetros derivados como persistência, tempo para atingir o pico de produção e produção total do leite em cada fase da lactação.

Diferentes modelos têm sido propostos visando o melhoramento das estimativas sobre a curva de lactação. Assim, os modelos propostos por Morant e Gnanasakthy e por Jenkins e Ferrell podem ser mais precisos, mas em contra está que eles precisam de um número maior de parâmetros, informação nem sempre disponível (Sainz e Baldwin, 2002). Os novos modelos de curvas de lactação procuram ser dinâmicos e mecanicistas, trocando os modelos empíricos, estáticos e fatoriais antigamente usados. A partir dos trabalhos de Baldwin nos finais da década de 1980, crescentes e sofisticados modelos de estimação têm sido propostos. Muitos destes modelos trabalham a compartimentação dos nutrientes, o custo energético da síntese e secreção do leite, os requerimentos específicos de acordo com a composição química do leite, a dinâmica celular da glândula mamária, a influência de fatores ambientais e não ambientais sobre a curva de

lactação, a raça e o número da lactação (Pollott, 2004; Balwin e Donovan, 2000). Uma grande limitante ainda não resolvida é o tipo de equações necessárias para identificar os processos de síntese e secreção dos diferentes compostos no alvéolo mamário já que nem sempre todos seguem a clássica equação de Michaelis-Menten com seu tipo exponencial com plateau. De muitos compostos secretados ou sintetizados ainda não se conhece a velocidade máxima da reação.

Existem áreas de alta complexidade nos sistemas agrícolas e, dentro destes, a área de produção de leite é uma das mais complexas. Diversos trabalhos sobre a lactação têm sido desenvolvidos através de modelos abrangentes como a proposta de Baldwin sobre o metabolismo da lactação (Boston et al., 2000; Knight et al., 1994; Beever et al., 1991; Baldwin et al., 1987). Para estes trabalhos ainda existe ausência de parâmetros metabólicos para serem associados aos modelos metabólicos. Nesta fase do desenvolvimento, diferentes pesquisadores aportam informação sobre indicadores metabólicos, efeitos diretos de ambiente ruminal sobre o metabolismo (por exemplo o aumento da amônia circulante e sua relação com os custos energéticos da lactação), e informações sobre os mecanismos de controle endócrino e sobre a transformação endógena de nutrientes. Os modelos mecanicistas sobre a lactação têm permitido um grande desenvolvimento no conhecimento do metabolismo intermediário e dos processos bioquímicos que ocorrem na síntese do leite.

### **2.7.1 Perspectivas dos modelos em produção animal**

Lovatto e Souvant (2002) recolhem os principais argumentos para o uso da modelagem aplicada. Assim, esses autores citam, entre outros benefícios, que a modelagem é uma ferramenta de alta performance e baixo custo. Os modelos são representações da realidade e constituem apoio para inúmeras áreas do ensino, da pesquisa e da extensão. A modelagem pode ser utilizada como ferramenta para melhor compreender e otimizar a performance e a veracidade dos sistemas. A simulação através de modelos pode ser usada para verificar as áreas da ciência onde o conhecimento é escasso ou inexistente. A simulação é a execução do modelo, representada por um programa computacional que dá informação sobre o sistema que está sendo investigado. A simulação é, portanto, um método de pesquisa oposto ao método analítico, que é meramente teórico. A simulação é mais flexível. Finalmente, o desenvolvimento e uso de sistemas de modelagem e simulação exige trabalho multidisciplinar, permite a

formação de equipes de trabalho conformados por pessoal de áreas diferentes que se juntam para o um objetivo comum, discutem e geram óticas de análise desde a perspectiva da multidisciplinariedade e da construção de coletivos.

A finais da década de 1990, surgiram ajudas computacionais ainda não usadas em forma adequada. As últimas gerações de computadores, permitem o trabalho com grandes bancos de dados. Assim, é possível processar arquivos com milhões de dados, em forma rápida, o que permitiu o surgimento de novas técnicas na geração de modelos como Data Mining, cuja melhor tradução poderia ser agrupamento e comparação de dados sem lógica aparente. Através desta ferramenta é possível procurar relações entre os componentes biológicos e não biológicos que nunca foram sequer consideradas. Outra ferramenta de uso crescente são as redes neurais computacionais, conhecidas como ANN (Artificial Neural Network). Estas redes são baseadas em inteligência artificial e mediante estruturas derivadas das sinapses neurais conseguem desenvolver complexas equações de relacionamento respeitando bases estatísticas. Até hoje esta é a melhor ferramenta para solucionar o problema das equações não lineares, ainda não resolvido convenientemente e cuja importância no trabalho biológico é máxima (Heald et al., 2000)

### **3. Indicadores do metabolismo energético no pós-parto de vacas leiteiras de alta produção e sua relação com a composição do leite**

(Submetido a: Ciência Agropecuária Brasileira, ISSN 1518-2797)

#### **3.1. Resumo**

A síntese do leite representa um desafio para o metabolismo energético, devido a que a lactação exige precursores gliconeogênicos para a síntese da lactose e porque na primeira fase da lactação os animais diminuem a ingestão de matéria seca. Nestas situações desencadeia-se um balanço energético negativo (BEN) caracterizado pela mobilização de reservas corporais. O objetivo do presente trabalho foi monitorar os indicadores bioquímicos do metabolismo energético durante o pós-parto em vacas leiteiras de alta produção e avaliar a possível incidência destes sobre a composição do leite. O estudo foi feito em 110 vacas da raça Holandesa, múltiparas, alimentadas em forma controlada com forragens, feno, silagem, concentrado e suplemento mineral. O período pós-parto avaliado correspondeu às semanas 2, 5, 8 e 11. Em cada período foram coletadas amostras de sangue e de leite, em sete animais, de cinco rebanhos diferentes. Mediante técnicas espectrofotométricas foram analisados ácidos graxos livres (NEFA), beta-hidroxibutirato (BHB), glicose, triglicerídeos, fructosamina e colesterol. A determinação da composição do leite foi feita mediante análise de proteína, lactose e gordura mediante a espectrometria do infravermelho próximo (NIRS). As análises estatísticas incluíram provas de correlação, análise de variância e provas de comparação de médias. Não foi achada relação significativa entre a composição do leite e os metabólitos energéticos.

#### **3.2 Summary**

Milk synthesis is a challenge for energy metabolism, because the lactation process requires gluconeogenic precursors for lactose synthesis and in early lactation period dairy cows reduce dry matter ingestion. These situations may lead to a negative energy balance (BEN) which is characterized by lipid reserves mobilization. The main objective of this work was to monitor biochemical energy indicators during postpartum period in high-yielding dairy cows and to evaluate possible relations of those metabolites with milk composition. The study was done with 110 multiparous Holstein Friesian dairy cows. The feed was forage, hay, silage, concentrate and mineral supplement. Balancing of the diet was made through a commercial software. The

postpartum period evaluated corresponded to 2, 5, 8 and 11 weeks of lactation. In the each period blood and milk samples were collected from seven animals group in five different herds. Through spectrophotometric techniques, the following metabolites were analyzed: non-esterified fatty acids (NEFA), betahydroxybutyrate (BHB), glucose, triglycerides and cholesterol were determined by spectrophotometric method. Milk composition was determined by near infrared spectrophotometry (NIRS). Statistical analyses included correlation test, analysis of variance and Tukey's means test. No statistical association between milk composition and energetic indicators was found.

### **3.3 Introdução**

Nas últimas décadas houve um considerável aumento na média de produção de leite por lactação (Ingvarlsen et al., 2003). Simultaneamente com a elevação da produção relataram-se em forma crescente transtornos metabólicos, algumas vezes descritos como doenças metabólicas (Herdt, 2000; Kida, 2003). No período pós-parto, em especial nas primeiras semanas de lactação, a ingestão de alimento é insuficiente para preencher os requerimentos basais e de produção. Neste período, as vacas leiteiras apresentam uma alta mobilização de reservas lipídicas, cuja intensidade está associada ao balanço energético negativo (BEN) (Reist et al. 2002). O grau de BEN nas primeiras semanas do pós-parto pode ocasionar doenças metabólicas e perdas na produção (Ingvarlsen et al., 2003).

É conhecido que insuficientes aportes de energia resultam em pobres comportamentos reprodutivos, baixas taxas de concepção, maior incidência de mastite e predisposição dos animais a situações clínicas de desequilíbrio metabólico (Geishauser et al., 1997) as quais ocasionam perdas econômicas cujo valor ainda não tem sido determinado com exatidão (Ingvarlsen et al., 2003).

A estimação do adequado balanço energético apresenta dificuldades ao ajustar a predição teórica da dieta e na avaliação do consumo, isto é, existe um desequilíbrio entre a formulação teórica da dieta e o verdadeiro estado nutricional. Isto acontece principalmente devido a fatores associados com a determinação do consumo efetivo, o conhecimento do conteúdo nutricional do alimento, a variação nas condições climáticas e outros fatores inerentes ao manejo do alimento, sua conservação e fornecimento. As

principais alterações na composição do leite são derivadas de manipulações nutricionais (Sutton, 1989; Freeden, 1996).

As vacas de alta produção podem ser definidas como sistemas biológicos caracterizados pela alta demanda de energia e pela complexa regulação homeostática, sob controle endócrino (Sauvant, 1994; Aeberhard et al., 2001; Reist et al., 2002). A lactação, da mesma forma que o crescimento e a reprodução, fazem parte dos processos da homeorrese que têm como objetivo garantir a sobrevivência das diferentes espécies de mamíferos. O termo “homeorrese” foi proposto por Bauman e Currie (1980) e se refere à regulação dos processos metabólicos relacionados com a síntese de energia e proteína.

Diversos indicadores do estado metabólico têm sido pesquisados nas vacas de alta produção. Os principais metabólitos associados ao balanço energético são ácidos graxos não esterificados (NEFA),  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB), glicose, colesterol e triglicerídeos (Aeberhard et al., 2001; Kida, 2003; Lago et al., 2004). Com menor intensidade tem sido estudada a fructosamina, proteína glicosilada útil na determinação do estado energético nas semanas anteriores da situação que se pretende avaliar (Enemark et al., 2004).

O objetivo do presente trabalho foi monitorar os metabólitos indicadores do metabolismo energético em vacas leiteiras de alta produção e determinar a possível relação destes sobre a composição do leite.

### **3.4 Material e Métodos**

Um total de 140 vacas multíparas de raça Holandesa, com produções superiores a 25 kg/dia foram avaliadas no presente estudo. Após o exame clínico e a verificação das condições exigidas para a pesquisa, foram considerados 110 animais. A alimentação consistiu em silagem de milho, sorgo, forragem verde Tifton (*Cynodon nlemfluensis*), concentrado e suplemento mineral. Para o cálculo do valor nutricional do alimento foram observadas as recomendações do NRC (National Research Council, 2001). Para o cálculo da ração foi usado o programa Spartan Ration Evaluator (Michigan State University).

O ecossistema geográfico de localização dos rebanhos correspondeu ao Planalto Médio do Estado de Rio Grande do Sul (Brasil). Os animais provinham de núcleos comerciais com práticas controladas de alimentação e manejo de sistemas semi-confinados. Foram avaliados dois períodos climáticos considerados extremos para a zona temperada, inverno (dois rebanhos) e verão (três rebanhos). Os animais foram divididos para as coletas em quatro grupos, correspondentes às semanas 2, 5, 8, e 11 da lactação. Em cada rebanho foram coletadas amostras de sangue e de leite de sete animais.

Um exame clínico prévio a cada coleta de sangue foi efetuado para descartar animais com sinais evidentes de enfermidade (problemas podais, gastrintestinais ou endometrite). Após a verificação dos registros, foi constatado o período de pós-parto. Foi registrada a produção do leite nos dias prévios e no dia da coleta. As amostras de sangue foram coletadas mediante venipunção coccígea em tubos com vácuo, sem anticoagulante e com heparina sódica. As amostras foram mantidas sob refrigeração e transportadas até o laboratório para sua centrifugação (3000 rpm por 15 minutos) para a obtenção de soro e plasma, os quais foram divididos em frações, identificados e congelados a -20 °C até o momento das correspondentes determinações. A amostra do leite foi coletada em forma individual mediante colectores especiais.

Todas as coletas foram efetuadas na ordenha da tarde. As amostras de leite foram conservadas em recipientes adicionados de bronopol (2-bromo,2-nitro-1,3 propanediol) como conservante e enviadas antes de 24 horas para o Serviço de Análises de Rebanhos Leiteiros (SARLE) da Universidade de Passo Fundo (RS), onde através de citometria de fluxo foi determinada a contagem de células somáticas (CCS) (Somacount, Bentley Instruments Inc, EUA) e por espectrometria do infravermelho próximo (NIRS) (Bentley 2000, Bentley Instruments Inc, EUA) , determinada a percentagem de gordura, proteína, lactose e sólidos totais.

Os ácidos graxos não esterificados (NEFA),  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB), glicose, colesterol, triglicerídeos e fructosamina foram analisados através de provas enzimáticas colorimétricas, utilizando equipamento semi-automático (Metrolab 1600, Argentina) e reagentes comerciais (Randox, , Reino Unido, para os dois primeiros e Labtest, Brasil; para os quatro finais).

As análises estatísticas incluíram análise de variância para conhecer o efeito do período, provas de T para amostras não pareadas para estudar o efeito da época e análise de correlação de Pearson para analisar o grau de relação entre os indicadores do metabolismo energético e os componentes do leite. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do pacote SAS (2001).

### **3.5 Resultados e Discussão**

#### Composição do leite.

A Tabela 1 apresenta informações correspondentes à composição do leite. Em nenhum dos parâmetros se encontrou efeito estatístico do período pós-parto sobre as variáveis estudadas. A variável época (inverno ou verão) apresentou efeito significativo sobre os parâmetros produção do leite, sólidos totais e sólidos não gordurosos. Os valores encontrados correspondem ao informado pela literatura para a raça Holandesa sob condições controladas de produção (Wastra e Jenness, 1986; Aeberhard, et al., 2001). Os resultados mostram que os rebanhos selecionados dentro do chamado “sistema especializado de produção”, atingem um produto similar e dentro dos padrões exigidos por normativas estatais (IN 51, MAPA, Brasil) exceto para o indicador sólidos não gordurosos (SNG) cuja exigência mínima de 8,4% não foi atingida em nenhum dos períodos analisados.

Os valores encontrados para os principais componentes do leite comprovam que sob condições controladas de nutrição e manejo, a composição do leite não varia significativamente, sendo esta uma das características exigidas dentro do comércio internacional do leite (Ibarra, 2004). Diversos fatores têm sido associados a mudanças na composição láctea (Sutton, 1989; Freedon, 1996). Nos últimos anos em função da seleção genética, a produção individual das vacas leiteiras ultrapassou os 9000 quilos por lactação, o que tem motivado a pesquisa sobre as possíveis variações individuais associadas aos distúrbios metabólicos (Kida, 2003). Um dos fatores responsáveis, tanto pela produção em si, como pela homeostase do animal tem sido o aporte de energia na ração (Bauman e Grinari, 2003). Portanto, os desequilíbrios energéticos são responsáveis em grande parte pelas chamadas “enfermidades da produção” (Enjalbert et al., 2001; Edwards e Tozer, 2004), as quais afetam a qualidade do leite.

Tabela 1 Média, erro padrão e nível descritivo de probabilidade do teste F(p) da análise de variância para o efeito de período sobre a composição do leite e os principais indicadores de qualidade do leite em vacas de alta produção.

Componente	Semana de Lactação				p
	2	5	8	11	
<b>Gordura (%)</b>	3,62 ± 0,10	3,77 ± 0,12	3,59 ± 0,09	3,55 ± 0,09	0,4445
<b>Proteína (%)</b>	2,95 ± 0,04	2,84 ± 0,04	2,86 ± 0,05	2,91 ± 0,04	0,2892
<b>Lactose (%)</b>	4,56 ± 0,03	4,56 ± 0,04	4,58 ± 0,05	4,65 ± 0,03	0,2745
<b>STOTAL<sup>1</sup> (%)</b>	11,66 ± 0,13	11,57 ± 0,14	11,47 ± 0,12	11,58 ± 0,12	0,8049
<b>SNG<sup>2</sup> (%)</b>	8,03 ± 0,10	7,79 ± 0,11	7,88 ± 0,10	8,03 ± 0,11	0,2940
<b>IPG<sup>3</sup></b>	0,84 ± 0,02	0,78 ± 0,03	0,82 ± 0,03	0,80 ± 0,02	0,3492
<b>NUL<sup>4</sup></b>	3,49 ± 0,28	3,74 ± 0,30	3,26 ± 0,34	3,42 ± 0,39	0,7923
<b>Produção<sup>5</sup></b>	32,6 ± 1,3	34,8 ± 2,11	34,13 ± 1,65	29,85 ± 1,58	0,1808
<b>CCS<sup>6</sup></b>	296 ± 70,18	521 ± 139,7	271 ± 90,34	411 ± 114,0	0,3223

<sup>1</sup> STOTAL= Sólidos Totais, <sup>2</sup> SNG= Sólidos Não Gordurosos, <sup>3</sup> IPG= Índice Proteína Gordura, <sup>4</sup> NUL= Nitrogênio Uréico no Leite, em mmol/l, <sup>5</sup> Produção= Média individual diária (L). <sup>6</sup> CCS=Contagem de Células Somáticas (10<sup>3</sup> células/mL).

Os sólidos totais refletem os principais aspectos da síntese do leite. De um lado, a lactose é considerada o “marca-passo” da produção láctea (Wastra e Jenness, 1986) e, por outro lado, a proteína e a gordura são fundamentais para as características nutricionais da secreção e, além disso, constituem um determinante crítico nas políticas de pagamento do produto (Ibarra, 2004).

Diferentes autores têm investigado a composição do leite e sua relação com indicadores metabólicos ou de saúde do animal (Motram, 1997; Aeberhard et al., 2001). Em geral, todos concordam em que a associação direta entre os indicadores da nutrição, os parâmetros metabólicos (balanço energético) e a composição do leite não são fatores simples de associar. Na literatura existem exemplos de esforços para criar modelos que relacionem a síntese e a secreção do leite com os metabólitos sanguíneos (Sauvant, 1994; McNamara e Baldwin, 2000). Nestes e em outros trabalhos de modelagem se apresentam associações matemáticas que nem sempre conseguem ser explicadas com sentido biológico. Talvez, esta seja a mais complexa tarefa dos modelos futuros, nos

quais numa ótica mecanicista possa ser explicada a interação biológica entre os metabólitos, os componentes fracionados da nutrição e a composição do leite.

No presente trabalho, se apresentam os valores da relação matemática entre os componentes do leite e os indicadores do metabolismo energético (Tabela 2). As informações permitem observar que, isoladamente, os indicadores metabólicos não apresentariam relação com a composição do leite devido aos baixos coeficientes de correlação. A dinâmica própria das células da glândula mamaria para a síntese e secreção dos componentes do leite impedem uma relação única e linear entre cada metabólito e a soma dos sólidos, já que cada um dos componentes segue um padrão particular. Por esta razão, atualmente podem ser encontrados modelos únicos que estudam a composição de gordura, de proteína ou a síntese de lactose (Heuer et al., 2000; Kida, 2003). No presente trabalho, se apresentam relações básicas, com o intuito de encontrar o indicador do metabolismo energético mais confiável para predizer a composição do leite. De acordo com os resultados obtidos não seria possível indicar um metabólito a partir do qual se possa estimar os diferentes componentes, com exceção dos triglicerídeos e sua relação com os sólidos totais do leite. Fracas correlações de Pearson foram observadas entre glicose e fructosamina com a proteína do leite, igualmente entre gordura do leite e NEFA e entre colesterol com proteína e lactose do leite (Tabela 2).

Tabela 2. Coeficientes de correlação entre gordura, proteína, lactose e sólidos totais do leite e os indicadores sanguíneos do metabolismo energético em vacas de alta produção.

	NEFA <sup>1</sup>	Colesterol	BHB <sup>2</sup>	TGD <sup>3</sup>	FTA <sup>4</sup>	Glicose
<b>Gordura</b>	0,24298*	0,08621 <sup>ns</sup>	-0,05847 <sup>ns</sup>	-0,11622 <sup>ns</sup>	0,03466 <sup>ns</sup>	-0,13750 <sup>ns</sup>
<b>Proteína</b>	-0,07982 <sup>ns</sup>	-0,19197*	-0,015381 <sup>ns</sup>	-0,15242 <sup>ns</sup>	0,19012*	-0,29346*
<b>Lactose</b>	-0,02608 <sup>ns</sup>	0,19902*	-0,07177 <sup>ns</sup>	0,09547 <sup>ns</sup>	0,01334 <sup>ns</sup>	0,17189 <sup>ns</sup>
<b>S. Totais</b>	0,06724 <sup>ns</sup>	-0,10983 <sup>ns</sup>	-0,01972 <sup>ns</sup>	0,44182 <sup>**</sup>	0,15094 <sup>ns</sup>	0,16369 <sup>ns</sup>

ns= p>0,05; \* p<0,05. \*\* p< 0,01. <sup>1</sup>Ácidos graxos não esterificados, <sup>2</sup>Beta-hidroxi-butarato, <sup>3</sup>Triglicerídeos, <sup>4</sup>Fructosamina.

### Indicadores do metabolismo energético.

A procura de indicadores da bioquímica sanguínea para avaliar o estado nutricional de vacas de alta produção, tem sido uma constante (Motram, 1997; Herdt, 2000; Aeberhard et al., 2001; Kida, 2003; Lago et al., 2004). Parece existir um consenso de que a glicose não é o melhor indicador do metabolismo energético, toda vez que ela está sob um rigoroso controle endócrino. Herdt (2000) considera que os metabólitos mais úteis nas avaliações metabólicas seriam aqueles que apresentam maiores intervalos de valores, já que a dispersão do valor fisiológico poderia dever-se a alterações nutricionais ou homeostáticas. Em ruminantes é comum usar BHB e NEFA como indicadores metabólicos (Aeberhard et al., 2001; Kida, 2003). A fructosamina tem sido pouco utilizada em ruminantes, pois suas características químicas não oferecem vantagens para uso rotineiro em estudos de metabolismo, sendo mais adequado seu uso em estudos de patologias do metabolismo dos carboidratos, como na diabetes mellitus em animais de estimação. Os triglicerídeos e principalmente o colesterol têm sido usados em estudos do metabolismo de lipídios (Aeberhard et al., 2001; Reist et al., 2002).

No presente experimento, foram quantificados seis metabólitos considerados como os indicadores básicos do metabolismo energético. As alterações sobre este metabolismo definem o BEN, fator que por sua vez gera desequilíbrios que incidem sobre a saúde produtiva e a composição do leite. Os valores encontrados nos diferentes períodos analisados (Tabela 3) são similares aos apresentados por outros investigadores (Aeberhard et al., 2001; Kida, 2003).

Tabela 3. Valores médios ajustados (mmol/L) e erro padrão para os indicadores do metabolismo energético e nível descritivo de probabilidade do teste F da análise da variância para o efeito de período pós-parto de vacas leiteiras de alta produção.

Indicador bioquímico	Semanas Pós-parto				p
	2	5	8	11	
<b>NEFA</b>	0,39 <sup>b</sup> ±0,05	0,29 <sup>b</sup> ±0,03	0,24 <sup>a</sup> ±0,03	0,22 <sup>a</sup> ±0,02	0,0016
<b>BHB</b>	0,58 <sup>a</sup> ±0,04	0,74 <sup>a,b</sup> ±0,07	0,78 <sup>b</sup> ±0,06	0,69 <sup>a,b</sup> ±0,06	0,0620
<b>Fructosamina</b>	1,69 <sup>a</sup> ±0,05	1,69 <sup>a</sup> ±0,07	1,66 <sup>a</sup> ±0,06	1,77 <sup>a</sup> ±0,05	0,6396
<b>Colesterol</b>	3,18 <sup>a</sup> ±0,16	4,45 <sup>b</sup> ±0,25	4,79 <sup>c</sup> ±0,35	5,62 <sup>c</sup> ±0,41	<0,001
<b>Glicose</b>	2,19 <sup>a</sup> ±0,15	2,27 <sup>a,b</sup> ±0,19	2,79 <sup>a,c</sup> ±0,24	2,98 <sup>c</sup> ±0,21	0,0081
<b>Triglicerídeos</b>	0,25 <sup>a</sup> ±0,02	0,23 <sup>a</sup> ±0,02	0,26 <sup>a</sup> ±0,03	0,28 <sup>a</sup> ±0,02	0,8006

Médias seguidas por letras diferentes nas linhas diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os valores de glicose encontrados, estão no limite inferior dos valores relatados por Kaneko et al. (1997) e Kida (2003) e guardam relação com outras observações realizadas no Brasil (Rossato et al., 1999; Lago et al., 2004). O menor valor observado correspondeu à 2ª semana de lactação, correspondendo com o início da demanda de glicose para a síntese de lactose e o BEN, concordando com Aeberhard et al. (2001), Busato et al. (2002) e Holtenius et al. (2004). A relação entre glicose e triglicerídeos mostrou ser moderada e significativa ( $r=0,487$ ;  $p < 0,01$ ). Esta relação é útil em futuros trabalhos, já que os triglicerídeos foram os únicos metabólitos a apresentar associação com os sólidos totais do leite. A concentração sérica de NEFA depende do grau de mobilização do tecido adiposo em resposta ao BEN. Os NEFA são usados como fonte de energia pelo fígado e por outros tecidos e sua oxidação celular faz parte dos sinais fisiológicas de saciedade (Van Saun, 2000). Grummer (2002) reconhece aos NEFA como bons indicadores do metabolismo energético. O maior valor de NEFA se apresentou na 2ª semana de lactação, posteriormente seus valores caíram na medida em que o BEN foi compensado (Tabela 3). Os valores obtidos no presente trabalho são similares aos referidos por outros investigadores (Van Saun, 2000; Aeberhard et al.,

2001; Busato et al., 2002; Kida, 2003; Lago et al., 2004). Quando foram comparados os valores de glicose e de NEFA no mesmo período, se observou uma relação inversa entre os metabólitos, isto é, a menor nível de glicose, maior nível de NEFA, como era de esperar. Todavia, nas análises de correlação não se encontrou significância estatística. Situação similar se apresentou entre os NEFA e outros indicadores do balanço energético como colesterol ( $r = -0,019$ ,  $p > 0,05$ ), BHB ( $r = 0,043$ ,  $p > 0,05$ ) e triglicérides ( $r = -0,123$ ,  $p > 0,05$ ). Foi observada uma baixa correlação entre os NEFA e a fructosamina ( $r = -0,207$ ;  $p < 0,05$ ).

O beta hidroxibutirato (BHB) é importante em ruminantes como indicador de cetose subclínica, patologia derivada da mobilização de gordura como resposta ao BEN (Enjalbert et al., 2001). Fisiologicamente, no rúmen se produz BHB sendo um dos chamados “corpos cetônicos”. No entanto, sob condições de completo balanço energético, seus valores no soro são baixos. No presente experimento, o BHB mostrou menor significância entre períodos, como era de esperar ( $p = 0,062$ ). Os valores séricos de BHB tiveram o comportamento esperado com elevação crescente nas primeiras semanas de lactação e declínio ao final do período em estudo, concordando com outras observações (Aerberhard et al., 2001; Busato et al., 2002). Os maiores valores de BHB aconteceram na 8ª semana da lactação (0,78 mmol/L), similar aos resultados de Enjalbert et al. (2001). Os valores encontrados no presente trabalho são mais elevados que os informados por Lago et al. (2004). O uso de BHB como indicador único do balanço energético tem sido questionado devido a que a síntese normal de corpos cetônicos, que depende do tipo de alimento ingerido pelo animal (em especial aqueles que induzem fermentação butírica), podem alterar os valores (Van Saun, 2000; Oetzel, 2001). Sob estas condições é provável que o melhor uso do BHB seja como indicador de cetose e não como parâmetro metabólico no balanço energético.

A fructosamina é uma proteína glicosilada de recente uso em patologia clínica veterinária, usada no diagnóstico de problemas de hiperglicemia e de insuficiência renal em animais de estimação. Recentemente foram informados valores de fructosamina em bovinos (Enemark, 2004). Os resultados encontrados para fructosamina no presente estudo, não mostraram variação durante os períodos analisados (Tabela 3). Os valores apresentam um estreito intervalo, o que, segundo Herdt (2000), o tornaria um indicador pouco sensível e de escassa utilidade. Foi observada correlação fraca e negativa entre a

fructosamina e o colesterol ( $r=-0,207$ ;  $p<0,05$ ). Esta relação inversa entre a fructosamina e outros indicadores do balanço energético poderia dever-se ao fato de que a fructosamina reflete estados de glicemia pelo menos de três semanas anteriores ao momento da sua determinação. Nesse contexto os valores de fructosamina das semanas 5 e 8, que refletem o estado energético das semanas com maior BEN (2 e 5, respectivamente), não foram diferentes aos de outros períodos, pelo qual, não foi comprovada a hipótese de que em bovinos leiteiros a fructosamina possa ser um indicador para avaliar retrospectivas do balanço energético.

O colesterol mostrou ampla variação nos períodos analisados ( $p < 0,001$ ), sendo que o maior valor foi na semana 11 e o menor na 2ª semana de lactação. Os valores se encontram dentro dos valores aceitos como referência (Kaneko et al, 1997). Similares observações realizaram Aeberhard et al. (2001) e Busato et al. (2002), quem discutem que o aumento nos níveis de colesterol sérico durante o pós-parto está associado à acumulação de tecido adiposo. O aumento crescente do colesterol durante o pós-parto está relacionado com a necessidade de precursores para a síntese de hormônios esteroides os quais aumentam com o restabelecimento da atividade reprodutiva (Holtenius et al., 2003).

Os triglicerídeos são uma fonte importante de ácidos graxos para a síntese da gordura no leite (Aeberhard et al., 2001). Teoricamente, durante a lactação, os níveis de triglicerídeos variam de acordo com o BEN. No presente estudo, isto não foi observado, provavelmente porque a densidade energética da ração impediu um BEN mais severo, coincidindo com outros trabalhos nos quais o objetivo específico foi determinar variações nos triglicerídeos de acordo com o aporte de energia na dieta (Reist et al., 2002). Os valores de triglicerídeos encontrados correspondem aos observados por outros investigadores. Encontrou-se uma correlação moderada e significativa entre triglicerídeos e glicose ( $r=0,487$ ;  $p<0,01$ ) que poderia estar relacionada com a maior síntese de precursores energéticos no fígado durante o BEN. Como esperado, se encontrou relação inversa entre triglicerídeos e o colesterol ( $r=-0,223$ ,  $p<0,05$ ) e com NEFA ( $r =-0,123$ ,  $p>0,05$ ). Sugere-se que a determinação de triglicerídeos poderia ser uma alternativa na avaliação rápida da lipidose hepática, enfermidade metabólica de grandes perdas na produção leiteira. Neste mesmo sentido, Oetzel (2001) encontra oportuno nesse diagnóstico a determinação de triglicerídeos e NEFA.

### **3.6 Conclusões**

A relação matemática estudada entre os indicadores do metabolismo energético e os componentes do leite (lactose, gordura, proteína e sólidos totais); não permitem inferir que exista um indicador único que possa relacionar os parâmetros analisados. Se determinaram correlações importantes entre os sólidos totais e metabólitos foram estabelecidas. Através dos NEFA e do BHB é possível monitorar as flutuações nos precursores energéticos na primeira fase da lactação.

#### **4. Indicadores do controle endócrino em vacas leiteiras de alta produção e sua relação com a composição do leite**

(Publicado em: *Acta Scientiae Veterinariae* 33 (2): 147-153, 2005)

##### **4.1 Resumo**

A produção de leite é um desafio para o metabolismo energético. O controle endócrino regula a síntese e a secreção do leite, e a homeostasia da vaca leiteira. Os principais hormônios da lactação são cortisol, insulina, triiodotironina (T3), tiroxina (T4) e leptina. A mobilização de reservas lipídicas e gliconeogênicas garante a síntese do leite. O objetivo do presente trabalho foi monitorar o controle endócrino pós-parto em vacas leiteiras de alta produção e avaliar a sua relação com a composição do leite. O estudo foi realizado em 110 vacas multíparas da raça Holandesa. O cálculo da dieta foi feito mediante software comercial, para conhecer o balanço energético em cada rebanho. O período pós-parto avaliado correspondeu às semanas: 2, 5, 8 e 11. Em cada período foram coletadas amostras de sangue e de leite de sete animais em cinco rebanhos diferentes. Os hormônios foram dosados mediante radioimunoanálise de fase sólida. A composição do leite foi determinada mediante espectrofotometria de infravermelho próximo (NIRS). As análises estatísticas incluíram provas de correlação, análises de variância e comparação de médias. Não foi encontrada correlação entre os hormônios e os sólidos totais do leite.

##### **4.2 Summary**

Milk production is a challenge for energy metabolism. Endocrine control regulates milk synthesis and secretion, and the homeostatic status in the dairy cow. The main hormones in lactation process includes cortisol, insulin, triiodothyronine (T3), thyroxine (T4) and leptin. Mobilization of lipidic and gluconeogenic reserves are necessary for milk synthesis. The main objective of the present work was to monitor the endocrine postpartum control in high-yielding dairy cows and to evaluate the possible incidence of such control on milk composition. The study was done with 110 multiparous Holstein-Friesian dairy cows. The ration balance was done through a commercial software to know the individual herd energy status. The evaluated periods were 2, 5, 8 and 11 postpartum weeks. In each period blood and milk samples of seven cows per herd were collected. The hormones were determined by solid phase

radioimmunoassay. Milk composition was analyzed by near infra-red spectrophotometry (NIRS). Statistical analysis included correlation test, analysis of variance and means comparison tests. No significant relationships were obtained among hormones and total solids in milk.

### **4.3 Introdução**

Nos últimos anos aumentou a produção individual de leite por lactação (Ingvarstsen e Andersen, 2000). Além do incremento da produção, relatam-se transtornos metabólicos nas vacas leiteiras (Griinari et al., 1998; Kida, 2003). As situações que alteram a homeostasia ou a homeorrese podem afetar a produção de leite (Aeberhard et al., 2001a; Reist et al., 2002; Sauvant, 1994). As vacas de alta produção podem ser definidas como sistemas biológicos caracterizados pela alta demanda de energia e a complexa regulação endócrina (Aeberhard et al., 2001a; Reist et al., 2003b; Sauvant, 1994). Diversos trabalhos têm demonstrado a participação da insulina na regulação energética de vacas leiteiras (Reist et al., 2002). Recentemente foram postulados modelos de integração do balanço energético descrevendo o papel da insulina na sua regulação (Reist et al., 2003b). O cortisol tem sido investigado por seu papel gliconeogênico no peri-parto. Níveis séricos de cortisol têm sido relacionados com o metabolismo materno durante o pós-parto, fazendo parte de trabalhos sobre estresse e doenças metabólicas (Griinari et al., 1998; Moberg, 1991).

A leptina é possivelmente o hormônio de mais recente descobrimento e seu papel ainda não foi completamente elucidado. Participa no controle da mobilização das reservas adiposas e protéicas para compensar o balanço energético negativo (BEN) (Soliman et al., 2002). Em ruminantes, não existem evidências definitivas sobre a função da leptina (Soliman et al., 2002). Os hormônios triiodotironina (T3) e tiroxina (T4), têm sido indicados como responsáveis por processos endógenos de regulação energética, por sua ação sobre o consumo de oxigênio (Aeberhard et al., 2001b; Roche et al., 2005).

O objetivo do presente trabalho foi monitorar a dinâmica endócrina em vacas leiteiras de alta produção e determinar a possível influência hormonal sobre a composição do leite.

#### 4.4 Material e Métodos

Neste trabalho foram selecionadas 140 vacas multíparas da raça Holandesa com produções superiores a 25 kg/dia pertencentes a rebanhos considerados como sistemas intensivos de produção para as condições do Sul do Brasil. Após exame clínico e de verificação das condições exigidas para o estudo, foram considerados 110 animais. A alimentação consistiu em silagem de milho e sorgo, forragem verde de Tifton (*Cynodon nlemfluensis*), concentrado e suplementação mineral. Para o cálculo do valor nutricional do alimento foram seguidas as recomendações do NRC (2001). A ração foi balanceada mediante o programa *Spartan Ration Evaluator* (Michigan State University).

O ecossistema de localização dos rebanhos correspondeu ao Planalto Médio do Estado do Rio Grande do Sul. Os animais provinham de núcleos comerciais com práticas controladas de alimentação e manejo em sistemas semiconfinados. Foram avaliados os períodos climáticos extremos para a zona temperada (inverno e verão). Os animais foram divididos em quatro grupos correspondentes às semanas 2, 5, 8 e 11 de lactação. Em cada rebanho e para cada semana considerada, foram coletadas amostras de sangue e leite de sete animais. A coleta das amostras para todos os animais foi realizada no mesmo dia em cada rebanho.

Antes da coleta de sangue, foi realizado exame clínico para descartar animais com sinais de doença (problemas podais, gastrintestinais ou endometrite). Mediante análise dos registros foi verificado o período de pós-parto do animal e a produção de leite dos dias anteriores e a do dia da coleta. As amostras de sangue foram coletadas mediante venipunção coccígea em tubos com vácuo com heparina sódica, conservadas em refrigeração e centrifugadas (3000 rpm por 15 minutos) para a obtenção de plasma, o qual foi dividido em frações, identificado e congelado a -20 °C até as determinações hormonais. As amostras de leite foram coletadas mediante sistema acionado do tanque individual, na ordenha da tarde, em recipientes com preservante bronopol (2-bromo,2-nitro-1,3 propanediol) e enviadas antes de 24 horas para o Serviço de Análises de Rebanhos Leiteiros (SARLE) da Universidade de Passo Fundo, onde mediante citometria de fluxo foi determinada a contagem de células somáticas (CCS) e por

espectrofotometria de infra-vermelho próximo (NIRS), foi determinada a composição de gordura, proteína, lactose e sólidos totais.

A dosagem de cortisol, insulina, T3, T4 (ICN Pharmaceutical, EUA, e leptina (Linco Research, EUA) foi realizada usando kits comerciais mediante radioimunoanálise (RIA) de fase sólida. Foi usado um contador gama automático para a quantificação radiativa. Para o cálculo da concentração foi usado o programa RIACALC® (Universidade de Guelph, Ontario, Canada). A análise estatística incluiu análises de variância (GLM) para conhecer o efeito das variáveis semana do pós-parto e rebanho, e prova de t para amostras independentes para o efeito época. Foi realizada prova de correlação de Pearson, para avaliar a associação entre os hormônios e entre os componentes do leite. Para as análises estatísticas se utilizou o programa SAS (SAS, 2001).

#### **4.5 Resultados e Discussão**

Na Tabela 1 (Pág. 49) foram apresentadas as informações sobre a composição do leite nos núcleos de produção do estudo. Em nenhum caso houve efeito significativo do período pós-parto sobre as variáveis estudadas. A variável época (inverno, verão) apresentou efeito significativo sobre os parâmetros produção de leite, sólidos totais e sólidos não gordurosos no leite. Foi observado efeito significativo do rebanho sobre os sólidos totais, sólidos não gordurosos e proteína. Os sólidos totais do leite refletem os principais aspectos da síntese do leite. Por uma parte, a lactose é considerada o “marca-passo” da produção láctea (Mühlbach et al, 2000). Por outra parte, a proteína e a gordura são a base fundamental das características nutricionais da secreção e constituem os determinantes nas políticas de preços do produto (Houseknecht et al., 1998). Pelos critérios expostos, adotou-se a avaliação dos sólidos totais como a base para estudar a possível relação entre as variáveis endócrinas e metabólicas analisadas no presente trabalho.

Na Tabela 4 apresentam-se os valores plasmáticos dos principais hormônios associados ao controle endócrino da lactação em vacas leiteiras de alta produção para cada uma das semanas do estudo.

Tabela 4. Valores plasmáticos médios ajustados e erro padrão para os principais hormônios associados a homeostasia de vacas leiteiras de alta produção.

Semana da lactação	Hormônios				
	Cortisol (nmol/L)	T3 (nmol/L)	T4 (nmol/L)	Insulina (pmol/L)	Leptina (µg/L)
2	41,11 <sup>c</sup> ± 5,8	1,78 <sup>a</sup> ± 0,06	31,20 <sup>a</sup> ± 1,09	2,52 <sup>a,b</sup> ± 1,24	4,37 <sup>a</sup> ± 0,16
5	25,11 <sup>b,c</sup> ± 3,6	2,03 <sup>a,b</sup> ± 0,10	36,10 <sup>a,b</sup> ± 1,79	2,26 <sup>a</sup> ± 0,97	4,41 <sup>a</sup> ± 0,24
8	13,52 <sup>a,b</sup> ± 3,3	1,89 <sup>a,b</sup> ± 0,12	39,42 <sup>b</sup> ± 2,06	2,29 <sup>a,b</sup> ± 0,88	4,09 <sup>a</sup> ± 0,22
11	7,72 <sup>a</sup> ± 2,2	2,22 <sup>b</sup> ± 0,10	41,32 <sup>b</sup> ± 1,51	2,87 <sup>b</sup> ± 1,36	4,76 <sup>a</sup> ± 0,27
p	< 0,001	0,0010	< 0,001	0,0263	0,2070

Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem significativamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os valores encontrados dos principais componentes do leite correspondem ao informado pela literatura para a raça Holandesa sob condições controladas de produção (Aeberhard et al., 2001a; Wastra e Jennesss, 1986). Os resultados mostram que os rebanhos selecionados dentro do chamado “sistema especializado” de produção de leite, alcançam um produto similar e dentro dos padrões exigidos pela Instrução Normativa 51 (MAPA, 2002) exceto para o indicador sólidos livres de gordura cuja exigência é de 8,4%, valor que não foi atingido em nenhum período. A composição do leite não variou significativamente, sendo uma das características exigidas no comércio internacional de lácteos (Houseknecht et al., 1998). Diversos fatores têm sido associados a mudanças na composição láctea (Kennelly et al., 2000; Mühlbach et al., 2000). Entretanto, nos últimos anos, quando devido à seleção genética a produção individual atingiu 9000 kg/lactação, possíveis variações individuais ligadas a mudanças metabólicas têm sido pesquisadas (Reist et al., 2003b). Um dos fatores responsáveis tanto pela produção de leite, como pela homeostasia do animal tem sido o aporte de energia na ração (Arcaro et al., 2003; Mühlbach et al., 2000). Da mesma forma, os desequilíbrios energéticos são responsáveis, em grande medida, pelas chamadas “doenças da produção”, as quais afetam a qualidade do leite (Delavaud et al., 2000; Griinari et al., 1998).

Diferentes autores têm investigado a composição do leite em relação a indicadores metabólicos (Aeberhard et al., 2001b; Mottram, 1997; Reist et al., 2003b). Em geral, todos concordam em que a relação direta entre os indicadores de nutrição, os parâmetros metabólicos, o controle endócrino e a composição do leite não são fáceis de associar através de modelos (McNamara e Baldwin, 2000; Sauvant, 1994). Nesses modelos se apresentam associações matemáticas que nem sempre conseguem ser explicadas com sentido biológico. Talvez essa seja a mais árdua tarefa dos futuros modelos nos quais, sob uma óptica mecanicista, a interação biológica entre metabólitos e componentes da nutrição possa explicar variações na composição do leite. A dinâmica própria das células da glândula mamária para síntese e secreção dos componentes do leite impede uma relação única e linear entre cada metabólito e a soma dos sólidos, pois cada componente segue um padrão particular. Por esta razão, se encontram modelos únicos que estudam separadamente a composição de gordura, proteína ou lactose (Kida, 2003).

O controle da síntese, secreção e ejeção do leite reúnem um grande número de hormônios, entre os quais estão insulina, cortisol, tiroxina, triiodotironina e leptina (Reist et al., 2002; Reist et al., 2003b; Soliman et al., 2002). O cortisol tem sido considerado como um bom indicador de estresse e, embora não seja o indicador ideal, constitui um valioso recurso no estudo das alterações endócrinas do pós-parto em função de seu papel estimulador da gliconeogênese e manutenção da glicemia (Baumgard, 2003). Os valores de cortisol encontrados (Tabela 4) dão informação sobre os períodos de maior risco metabólico. A segunda semana de lactação apresentou os maiores valores de cortisol plasmático, enquanto que a semana 11 apresentou o menor valor. Esse comportamento é esperado e explica algumas patologias como a cetose e a laminite que têm relação direta com períodos de altos níveis de cortisol (Feurmann et al., 2004).

Na Tabela 5 apresentam-se os valores de correlação entre os sólidos totais no leite e os hormônios associados ao metabolismo energético. As informações em conjunto permitem inferir que os indicadores endócrinos não apresentam correlação linear com a característica selecionada para avaliar a composição do leite. As relações básicas entre sólidos totais do leite e hormônios constituem a base de modelos para

encontrar um indicador endócrino confiável para prever a composição do leite. Os indicadores exibiram correlação negativa ou próxima de zero.

Tabela 5. Coeficientes de correlação entre a porcentagem de sólidos totais do leite e entre os hormônios reguladores da síntese láctea em vacas de alta produção.

	<b>Cortisol</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>Insulina</b>	<b>Leptina</b>	<b>Sólidos totais</b>
<b>Cortisol</b>	1,00					
<b>T3</b>	-0,14211 <sup>ns</sup>	1,00				
<b>T4</b>	-0,17292 <sup>ns</sup>	0,69966**	1,00			
<b>Insulina</b>	0,19419*	-0,05601 <sup>ns</sup>	-0,0858 <sup>ns</sup>	1,00		
<b>Leptina</b>	-0,26646*	0,14817 <sup>ns</sup>	0,20525*	0,11928 <sup>ns</sup>	1,00	
<b>Sólidos totais</b>	-0,01357 <sup>ns</sup>	0,04833 <sup>ns</sup>	-0,0311 <sup>ns</sup>	-0,09418 <sup>ns</sup>	0,0321 <sup>ns</sup>	1,00

<sup>ns</sup> No significativo ( $p > 0,05$ ), \* Significativo a 5% ( $p \leq 0,05$ ),

\*\* Significativo a 1% ( $p \leq 0,01$ )

Um estudo ao redor do parto mostrou que os maiores valores de cortisol ocorreram no dia do parto e que muitas vacas mantiveram altos níveis ainda na terceira semana pós-parto (Nikolic et al., 2003). Alguns autores postulam a possível ação do CRH na depressão do consumo de alimento no pós-parto, o que poderia explicar em parte as variações do comportamento individual para enfrentar o balanço energético negativo (BEN) no início da lactação (Ingvarsen e Andersen, 2000). Considera-se que o cortisol varia em diferentes circunstâncias, razão pela qual poderia não ser a melhor forma de avaliar o estresse (Rushen, 2000).

A triiodotironina (T3) e a tiroxina (T4) têm sido monitoradas em diferentes trabalhos em vacas leiteiras (Aeberhard et al., 2001a; Reist et al., 2002). Os hormônios tireoidianos fazem parte de mecanismos homeostáticos responsáveis pela regulação térmica e o consumo de oxigênio nos diferentes tecidos. No presente trabalho, foi encontrada uma alta correlação entre T3 e T4 ( $r = 0,7$ ,  $p < 0,01$ ), concordando com outros trabalhos (Aeberhard et al., 2001a; Nikolic et al., 2003; Reist et al., 2002), o que permite sugerir que a análise de apenas um hormônio poderia ser usada. Entretanto, a prova de correlação mostrou que a T4 e a leptina tiveram uma maior relação positiva, pelo que

seria mais útil a determinação de T4, embora seja conhecido que a T3 é o hormônio ativo nos tecidos (Beerda et al., 2004). T3 e T4 alcançaram o menor valor na segunda semana pós-parto, como foi observado por Reist et al. (2003b), quem atribuem o menor valor a um possível efeito do BEN. Nas semanas seguintes do pós-parto os dois hormônios apresentaram resultados similares, sendo os maiores valores observados na semana 11 (Tabela 4). Os valores durante todo o período avaliado estiveram dentro de valores relatados por outros autores (Reist et al., 2003b), porém foram inferiores aos de outros trabalhos feitos no Brasil (Ingvarsen et al., 2003). Os resultados permitem sugerir que os processos metabólicos de alta exigência comprometem os níveis circulantes dos hormônios tireoidianos e que, na medida em que os processos fisiológicos são compensados e diminui a pressão metabólica para a síntese de leite, conseguem elevar sua concentração no sangue.

A insulina tem sido considerada como o principal hormônio regulador da glicemia em mamíferos, mesmo em ruminantes onde ocorre um fluxo constante de precursores gliconeogênicos a partir do rúmen (Herdt, 2000; Kelly et al., 1991). O interesse pela insulina durante o pós-parto está relacionado com a adequada síntese de lactose. Foi discutido que existe uma hipertrofia de alguns tecidos durante a lactação, entre estes o fígado. Esta hipertrofia é explicada pela necessidade de maior síntese de glicose. Da mesma forma, foi encontrado no mesmo trabalho, um aumento nos receptores celulares para insulina (Kelly et al., 1991). Um interesse adicional é sua possível participação na síndrome de depressão de gordura no leite (Arcaro et al, 2003). Na década de 1990 foi postulado que a insulina poderia estimular a síntese de tecido adiposo em órgãos diferentes à glândula mamária, diminuindo os precursores para a síntese de triglicérides no leite. Porém, outros trabalhos não confirmaram esta hipótese (Bauman e Griinari, 2003; Goff e Horst, 1998). No presente trabalho, não foi encontrada relação da insulina com os sólidos totais do leite nem com a gordura do leite. Similares resultados são apresentados por outros autores em condições de balanço energético controlado (Aeberhard et al., 2001b; Goff e Horst, 1998; Herdt, 2000; Nikolic et al., 2003; Reist et al., 2003b). Na semana 11 ocorreu um aumento significativo dos níveis circulantes de insulina, possivelmente associado à redução da produção e à estabilização do consumo de alimento, como foi observado em outros trabalhos (Aeberhard et al., 2001a). Houve uma relação positiva entre o cortisol e a

insulina ( $r = 0,194$ ;  $p < 0,05$ ), o que tem explicação fisiológica na medida em que o cortisol promove a gliconeogênese. Valores altos de cortisol foram observados na segunda semana de lactação, período correspondente à fase ascendente da produção de leite. A insulina esteve positivamente relacionada ao BEN concordando com outras observações (Aeberhard et al., 2001b; Reist et al., 2003b).

A leptina é atualmente o centro dos estudos em endocrinologia de animais de produção (Macajavá et al., 2004). Nos últimos anos, graças ao desenvolvimento de um teste de radioimunoanálise específico para leptina em ruminantes, ocorreram avanços no conhecimento deste hormônio (Cunningham, 1997). Os primeiros trabalhos associaram seus efeitos ao desempenho reprodutivo e à lipomobilização (Holtenius et al., 2003). Recentemente a pesquisa sobre leptina em gado de leite se concentrou na sua relação com BEN, variação na condição corporal e composição do leite (Enjalbert et al., 2001; Reist et al., 2003a). Alguns trabalhos informam valores de leptina durante a lactação (Soliman et al., 2002). O presente trabalho é o primeiro no Brasil a apresentar valores de leptina durante a lactação de vacas de alta produção (Tabela 4), sendo similares a outros trabalhos (Soliman et al., 2002). O teor de leptina parece não ter grandes variações em função de dietas com níveis diferentes de energia (Reist et al., 2003b). Postula-se que os efeitos da leptina seriam através do sistema nervoso central bloqueando a ação do neuropeptídeo Y, razão pela qual participaria mais na regulação homeorrésica que na homeostática, não apresentando sensíveis variações circulantes (Macajavá et al., 2004). Apesar da teoria que a insulina aumentaria a expressão da leptina, no presente trabalho não houve relação entre esses dois hormônios. Porém, houve relação entre cortisol e leptina ( $r = 0,266$ ;  $p < 0,01$ ) e entre leptina e T4 ( $r = 0,205$ ;  $p < 0,05$ ). Esta última relação poderia entender-se pela presença de substratos energéticos de alta capacidade oxidativa, mobilizados e utilizados em resposta ao BEN.

Não houve efeito significativo do rebanho sobre as variáveis endócrinas, exceto para a insulina ( $p < 0,001$ ). A maioria dos trabalhos menciona variações hormonais devidas ao balanço energético e por efeito de mastite (Nikolic et al., 2003; Reist et al., 2002). Os rebanhos do presente estudo foram selecionados por suas condições padronizadas de produção, sanidade e manejo, sendo esta a possível causa da falta de efeito do rebanho sobre os hormônios analisados.

#### **4.6 Conclusões**

A relação estudada entre os principais hormônios da lactação e os sólidos totais do leite não permitem inferir que exista um único hormônio relacionado com os parâmetros analisados. Foram determinadas importantes correlações de alguns hormônios entre si. Os resultados sugerem que os hormônios tireoidianos e a leptina são parte ativa da regulação energética da lactação. Os valores de leptina constituem os primeiros valores de referência para bovinos leiteiros no Brasil.

## **5. Modelagem da composição química do leite em vacas de alta produção**

(Submetido a: Acta Scientiarum ISSN 1415-6814)

### **5.1 Resumo**

Os sólidos do leite geram as características nutricionais e constituem a base do sistema de remuneração no mercado internacional de lácteos. Em vista da complexidade da lactogênese, a modelagem pode ser um meio de entender melhor seus mecanismos e inter-relações. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver modelos matemáticos para prever a composição química do leite em vacas de alta produção. Foi estimado o conteúdo de: lactose, proteína, gordura, sólidos totais e sólidos não gordurosos. As variáveis explicativas corresponderam ao metabolismo energético (6), protéico (5), mineral (3), dinâmica hemática (3), funcionamento hepático (3), controle endócrino (5), atividade ruminal (2), análises do leite (1), urina (2) e variáveis externas (3). Para a análise dos dados utilizou-se a regressão linear múltipla e o algoritmo stepwise. Os modelos encontrados predizem os componentes do leite com diferentes graus de significância e aportam informações para a construção de modelos integrais sobre a lactação.

### **5.2 Summary**

The milk solids are determining nutritional characteristics and making the payment system in milk international market. The knowledge of components synthesis is basic to improving milk quality. Once lactogenesis is a complex process, the modeling may be an important way for understanding its mechanisms and interrelationships. The objective of this work was to develop mathematical models for predicting the chemistry milk composition in high yielding dairy cows. Information was analyzed for predicting values of lactose, milk protein, milk fat, total solids and non-fat solids. The descriptive variables corresponded to: energy metabolism (6), protein metabolism (5), minerals (3), hematological dynamic (3), liver function (3), endocrine control (5) ruminal activity (2); milk analysis (1), urine (2) and external variables (3). For the statistical analysis were used multiple linear regression and stepwise algorithm.

The models found predicted milk composition with different degrees of significance. This information is valuable for the integral models construction of lactation.

### **5.3 Introdução**

O Brasil é o sexto maior produtor mundial de leite. As perspectivas de inserção no mercado internacional do leite dependerão principalmente das características qualitativas do produto. Existem exigências sobre os níveis de proteína, gordura e lactose. Alcançar os níveis exigidos vai implicar em mudanças importantes nos sistemas de produção. Atualmente não é possível prever as características padronizadas do leite (Mühlbach, 2004).

Conhecer e monitorar as condições do leite têm sido a estratégia brasileira para garantir a competitividade internacional. Como forma de padronização do produto seguindo as exigências do mercado mundial, foi instituída a partir de 2005 a Instrução Normativa 51 (IN-51) que regulamenta a qualidade do leite no mercado nacional (MAPA, 2002). Entretanto, existem dúvidas sobre as estratégias a serem utilizadas para alcançar essa qualidade. Uma delas é através da alimentação que é um dos principais fatores moduladores da composição do leite (Sutton, 1989, Fredeen 1996). Mas a qualidade da dieta, a sazonalidade, a diversidade dos sistemas de alimentação e fatores genéticos impedem uma ação simples sobre a produção do leite, especialmente em animais de alta produção (Bachman, 1992; Mühlbach, 2004).

As variáveis metabólicas constituem um importante foco da pesquisa sobre a síntese e a secreção do leite. Elas geram informações sobre os precursores da lactogênese e podem avaliar rotas bioquímicas relacionadas diretamente com a interface nutrição-produção do leite (Knight et al., 1994; Fredeen, 1996). Contudo, pela complexidade das rotas metabólicas, é difícil associá-las de forma simples à síntese dos componentes do leite. No entanto, é possível fazer essa associação através da modelagem (Baldwin e Donovan, 2000; Cant, 2001)

A modelagem é uma técnica que pode auxiliar o processo de tomada de decisão, uma vez que permite a simulação de diferentes cenários e estimar a repercussão de possíveis mudanças. A utilização de modelos permite compreender e descrever alguns dos processos que ocorrem no sistema e suas interações (Beever et al., 1991; Lovatto e Sauvant, 2002; Medeiros, 2003). Os modelos matemáticos utilizam equações para representar e/ou descrever o sistema estimando o seu comportamento em função dos dados de entrada (Medeiros, 2003). Os modelos podem ser classificados quanto ao tipo de equações que os constituem (lineares e não lineares), ao grau de explicação dos fenômenos que estimam ou descrevem (empíricos ou mecanicistas) à forma como tratam as mudanças ocorridas em relação ao tempo físico (dinâmicos ou estáticos) e ao tratamento de suas variáveis e dos seus parâmetros (estocásticos ou deterministas) (Sainz e Baldwin, 2002).

O objetivo do presente trabalho é desenvolver modelos lineares para prever a síntese de lactose, proteína, gordura, sólidos totais e sólidos não gordurosos a partir de indicadores metabólicos e não metabólicos associados à lactação de vacas leiteiras de alta produção.

#### **5.4 Material e Métodos**

Foram usadas 140 vacas multíparas da raça Holandesa com produção média de leite superior a 25 kg/dia, pertencentes a cinco rebanhos comerciais localizados na região do Planalto Médio do Rio Grande do Sul. Os sistemas de produção são classificados como sistema de produção semi-intensivo, onde parte da alimentação é ofertada em pastagens melhoradas. A alimentação foi composta por silagem de milho ou sorgo, forragem verde de Tifton (*Cynodon nlemfluensis*), concentrado e suplemento mineral. Para o cálculo do valor nutricional do alimento foram seguidas as recomendações do NRC (2001). A ração foi formulada através do programa Spartan Ration Evaluator, versão 2.02b (Michigan State University, 2002). Foram avaliados dois períodos climáticos extremos para a zona temperada (inverno e verão). Os animais foram divididos em quatro grupos, correspondentes às semanas 2, 5, 8 e 11 da lactação. Em cada rebanho e semana foram coletadas amostras de sangue, suco ruminal, urina e

leite das vacas selecionadas para cada semana de lactação. A coleta das amostras para todos os animais foi realizada no mesmo dia em cada rebanho.

As amostras de sangue num volume de 10 mL foram coletadas por venipunção coccígea em sistema de tubo a vácuo sem anticoagulante e com heparina ou EDTA-K como anticoagulante específico conforme a prova a fazer. O suco ruminal foi obtido através de sonda esofágica de dupla via e a urina foi coletada mediante indução da micção por massagem perineal. Todas as coletas foram realizadas após a ordenha entre as 7:00 e as 10:30. As amostras do leite foram coletadas de sistemas especiais acionados do tanque individual, durante a ordenha da tarde.

No soro sanguíneo foram determinados, através de provas enzimáticas colorimétricas, os seguintes metabólitos como indicadores do metabolismo energético: glicose, beta-hidroxibutirato (BHB), ácidos graxos não esterificados (NEFA), fructosamina, colesterol e triglicerídeos. Como indicadores do metabolismo protéico foram dosadas: proteínas totais, uréia no sangue, albumina, globulina e creatinina; relacionados ao metabolismo mineral: cálcio, fósforo inorgânico e magnésio. Como indicadores hematológicos foram avaliados hematócrito, hemoglobina e contagem total de leucócitos; na avaliação da função hepática foram analisadas em soro as enzimas: aspartato amino transferase (AST), creatina kinase (CK) e gama glutamil transferase (GGT). No plasma sanguíneo foram determinados por radioimunoanálise de fase sólida cortisol, insulina, leptina, triiodotironina (T3) e tiroxina (T4). No suco ruminal foram determinados o tempo de redução do azul de metileno (TRAM) e o pH. Na urina foram avaliados o pH e a densidade específica.

Para a determinação de lactose, gordura, proteína, sólidos totais e contagem de células somáticas (CCS) foram usados os métodos de absorção de luz no infravermelho próximo (NIRS) e citometria de fluxo em aparelhos automatizados (Bentley Instruments Inc, EUA). Os sólidos não gordurosos (SNG) foram estimados por diferença entre os sólidos totais e gordura. As amostras foram coletadas em recipientes contendo

conservante bronopol (2-bromo, 2-nitro-1,3 propanediol) e enviadas, até 24 h após a coleta, ao Serviço de Análise de Rebanhos Leiteiros (SARLE) da Universidade de Passo Fundo. Os dados obtidos foram armazenados numa base compatível com o pacote estatístico SAS (2001). As informações finais corresponderam a 107 animais. Foram desconsideradas informações não completas de 33 animais (23,6%). A distribuição de cada variável foi analisada através do procedimento univariate do SAS. As variáveis cortisol, leptina, NEFA, BHB, creatinina, CK e TRAM foram transformadas por logaritmo. Para desenvolver o modelo de predição de cada um dos componentes químicos do leite (lactose, proteína gordura, sólidos totais e sólidos não gordurosos) a partir de variáveis metabólicas e não metabólicas, foi realizada regressão linear múltipla através do procedimento REG do SAS, algoritmo STEPWISE. O efeito da semana foi controlado mediante um polinômio de terceiro grau, que explica o efeito da variável semana (4 níveis) sem assumir a linearidade ou não do efeito. Para o efeito propriedade foi calculado o contraste ortogonal. Como critério de aceitação do modelo foi considerado o valor de significância e como fator de bondade de ajuste foi usado o coeficiente de determinação ( $R^2$ ).

## 5.5 Resultados e Discussão

No presente trabalho 27 variáveis associadas às rotas metabólicas e três variáveis de outra origem (externas e CCS) foram usadas na regressão múltipla. Em geral, os coeficientes de determinação para cada composto individual do leite não foram altos. Isso se deve, provavelmente, as variáveis explicativas dos diferentes metabólitos que não estão diretamente relacionadas com a síntese ou secreção de um componente específico do leite. É o caso, por exemplo, dos triglicerídeos que não apresentam informações relevantes sobre a síntese de proteína, mas são úteis na predição da gordura. Outro exemplo é o pH ruminal que não é um bom indicador da síntese de lactose, mas é um bom estimador da proteína láctea. No entanto, o ideal é trabalhar com um conjunto de variáveis para desenvolver modelos matemáticos, pois as inter-relações bioquímicas e homeostásica acontecem de forma integrada (Baldwin e Donovan, 2000).

Existem mecanismos fisiológicos específicos nos processos da síntese ou secreção do leite. As pesquisas mais recentes de modelagem da composição láctea

incluem mecanismos celulares complexos e técnicas de avaliação do metabolismo intracelular (Pollott, 2004). Para cada componente têm sido desenvolvidos modelos para explicar os mecanismos físico-químicos específicos da lactogênese (McNamara e Baldwin, 2000; Jonker et al., 1999). Uma meta análise de trabalhos das últimas décadas sobre modelagem da composição do leite mostra que a fase da lactação é um dos fatores mais importantes (Martin e Sauvant, 2002).

A equação de regressão múltipla para estimação da lactose ( $n = 107$ ;  $R^2 = 0,27$ ) a partir do conjunto de variáveis metabólicas foi:

$$\text{Lactose} = 4,35645 - 0,00163 \text{ AST} + 0,11571 \text{ magnésio} + 0,00707 \text{ albumina} - 0,00000718 \text{ leucócitos totais} - 0,02873 \text{ log CCS} \quad \text{[Equação 1]}$$

O algoritmo stepwise selecionou cinco de 30 variáveis. Neste modelo (Equação 1) a presença de albumina é explicada pela associação entre lactoalbumina e síntese láctea (Collier, 1995). O magnésio é reconhecido como o principal co-fator enzimático e participa do crescimento da população microbiana através da regulação da síntese de NADPH (Spears, 2002). AST está relacionada com o funcionamento hepático e indica a importância do fígado nos processos de síntese de energia através da fosforilação da glicose (Heuer, 2000). A contagem de células somáticas no leite (CCS) e leucócitos totais no sangue, indicadores do estado de defesa da glândula mamária, entraram no modelo sugerindo a necessidade da sanidade do parênquima alveolar para garantir a síntese da lactose (Sordillo e Streicher, 2002).

Para a estimação de gordura ( $n = 107$ ;  $R^2 = 0,19$ ) a equação encontrada foi:

$$\text{Gordura} = 1,76506 + 0,40451 \text{ época} + 0,01325 \text{ triglicerídeos} + 0,81826 \text{ NEFA} - 0,07448 \text{ log cortisol} + 0,06184 \text{ hemoglobina.} \quad \text{[Equação 2].}$$

Na predição da gordura aparece a variável época, que pode refletir o ajuste metabólico ao estresse ambiental do verão (Umpfrey et al., 2001). A presença de variáveis como NEFA e triglicerídeos fariam sentido lógico toda vez que elas estão estreitamente relacionadas com a mobilização de tecido adiposo e a síntese de gordura (McNamara e Baldwin, 2000). É possível que o cortisol secretado em quantidades elevadas pelo estresse nas primeiras semanas da lactação modifique os níveis endógenos dos precursores de gordura láctea (Rushen, 2002). Os NEFA dão informação sobre a mobilização de tecido adiposo que acontece durante o balanço energético negativo como uma solução ativa de garantir a homeostase da glicemia (Heuer et al., 2000). A hemoglobina estaria associada com a dinâmica sangüínea cuja taxa de fluxo na glândula mamária permite o melhor intercâmbio de oxigênio nos tecidos para a síntese e secreção de gordura (Drackley et al., 2001).

Para a estimação de proteína ( $n = 107$ ;  $R^2 = 0,33$ ) foi obtida a equação:

**Proteína** =  $1,98633 - 0,00333 \text{ glicose} + 0,13916 \text{ BHB} - 0,00092089 \text{ colesterol} - 0,03197 \log \text{ cortisol} + 0,06334 \text{ fósforo inorgânico} - 0,02937 \text{ uréia no soro} + 0,03824 \text{ hemoglobina} + 0,12619 \text{ pH rumen} - 0,07 \log \text{ TRAM}$ . **[Equação 3]**.

A proteína foi o componente do leite que exigiu o maior número de variáveis (9) para sua predição. Entre eles estão o pH ruminal e o TRAM que são associadas com a estabilidade do ambiente ruminal necessária para a síntese de proteína bacteriana, base da síntese de proteína láctea (Kennelly et al., 1999). O balanço energético para síntese de proteína foi incluído no modelo de regressão através da presença dos metabólitos glicose, uréia no soro e fósforo inorgânico (Jonker et al., 1999). Na equação 3, participam o colesterol e o BHB, que junto com o cortisol fazem parte do metabolismo dos lipídeos diretamente relacionado com a síntese de gordura láctea na primeira fase da lactação. Existe relação entre os níveis de gordura e proteína no leite (Fredeen, 1996), pois a composição dos sólidos do leite é estável, sendo a lactose o composto de menor

variação. Assim, as maiores modificações se encontram na gordura ou na proteína do leite. Igualmente, as variações na composição dos sólidos totais e SNG comprometem os níveis de proteína e gordura. Isso porque a lactose é responsável por cerca de 50% dos sólidos totais e seu valor constante impede alterações em outros componentes (Tran e Jhonson, 1991).

Para os sólidos totais ( $n = 107$ ;  $R^2 = 0,29$ ) a equação de regressão foi:

**Sólidos totais** =  $9,96273 + 0,52795$  NEFA +  $0,02031$  triglicerídeos +  $0,23373$  fósforo inorgânico +  $0,12876$  hemoglobina –  $0,03577$  hematócrito. **[Equação 4]**

A predição dos sólidos totais não corresponde a um processo aditivo, embora a determinação dos sólidos seja feita pelo somatório dos compostos individuais mais uma estimativa dos minerais obtida pela adição de um valor constante. Nem todas as variáveis explicativas dos sólidos totais (Equação 4) estão presentes na predição de cada um dos componentes individuais (Equações 1, 2 e 3). É importante observar que na predição dos sólidos a regressão incluiu metabólitos relacionados com a mobilização de energia e a dinâmica hemática, fatores fisiológicos chaves para a lactogênese (Collier, 1995). A importância da geração de energia no nível molecular para os diferentes processos bioquímicos estaria indicada pela inclusão na equação do fósforo inorgânico (Heuer, 2000).

A equação de predição para sólidos não gordurosos ( $n = 107$ ;  $R^2 = 0,67$ ) foi:

**SNG** =  $9,1468 - 0,51136$  época –  $0,237$  BHB +  $0,18405$  fósforo inorgânico +  $0,01517$  albumina –  $0,01506$  globulinas –  $0,00001166$  leucócitos totais. **[Equação 5]**

O coeficiente de determinação mais elevado encontrado para os diferentes componentes foi de 0,67, correspondente aos SNG (Equação 5). O coeficiente de determinação elevado indica que o componente gordura reconhecido pela sua alta variabilidade (entre 2,47 até 4,18) afeta sensivelmente a predição dos sólidos. Na equação foi incluída a variável época associada com o estresse climático (Umphrey et al., 2001). O BHB está associado tanto como a mobilização de tecido adiposo, quanto com a síntese de ácidos graxos no rúmen (Enjalbert et al, 2001). Os metabólitos que avaliam indiretamente a síntese de proteína láctea, tais como albumina e globulina são variáveis importantes na predição dos SNG, porque a proteína do leite constitui cerca do 40% dos SNG (Bachman, 1992). Assim, a predição de SNG seria mais útil que a determinação dos sólidos totais e teria concordância com a exigência da norma legal (IN-51).

Quando comparado o número de variáveis selecionadas na predição de sólidos totais (Equação 4) e SNG (Equação 5) unicamente o fósforo inorgânico apareceu nas duas predições. Isso mostra que o modelo matemático pondera as variáveis de forma independente para cada componente, não sendo útil a exclusão dos metabólitos associados com a síntese de gordura para a predição dos SNG.

Na lactação, as inter-relações fisiológicas e endócrinas são dinâmicas e complexas, o que dificulta a observação de fatores individuais como a síntese de compostos (Aeberhard et al., 2001). Isso foi observado no presente estudo para a predição dos sólidos do leite, que explicaria os baixos coeficientes de regressão obtidos. Entre os componentes principais do leite analisados a gordura apresentou o mais baixo coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,19$ ), enquanto que, a proteína mostrou o melhor coeficiente ( $R^2 = 0,33$ ). Não foi encontrado um metabólito preditor comum aos três componentes do leite. Todavia, o cortisol e a hemoglobina estão nos componentes principais de dois dos três modelos estudados, sendo os únicos metabólitos comuns na predição de proteína e gordura. Eles são, portanto, candidatos na predição dos componentes do leite.

As variáveis selecionadas em cada modelo para prever os sólidos são úteis e com sentido biológico para ajustes na parametrização de modelos metabólico-nutricionais no estudo da composição do leite, fator que precisa de informações sensíveis (Lovatto e Souvant, 2002). Metabolicamente os processos de síntese de componentes individuais do leite estão positivamente relacionados com o balanço da dieta (Bachman, 1992, Fredeen, 1996) e negativamente relacionados com a seleção genética (Baldwin e Donovan, 2000; Cant, 2001). O fato anterior aumenta a complexidade na determinação dos melhores indicadores metabólicos para predição dos sólidos.

O conjunto de variáveis analisadas a partir do leite (proteína, lactose, sólidos totais e SNG, índice proteína-gordura (IPG) e produção do leite), não foram consideradas no modelo para não incluir dentro das variáveis explicativas, variáveis estruturalmente ligadas com as variáveis resposta e que poderiam não implicar relação causa-efeito. Foi observado que estas variáveis predizem significativamente ( $p < 0,0001$ ) e com coeficientes de determinação ( $R^2$ ) elevados a maior parte dos componentes do leite assim: 0,35; 0,26; 1,00; 1,00 e 1,00 para predição de lactose, proteína láctea, gordura do leite, SNG e sólidos totais respectivamente. Teoricamente, as variáveis analisadas no leite não deveriam fazer parte dos modelos para explicar a composição química do próprio leite, já que o interesse dos estudos de lactogênese são informações causais que permitam avaliar o processo da sua síntese.

O fato que o conjunto de variáveis determinadas no leite possa prever em forma adequada os principais componentes do leite é de interesse econômico para os laticínios. Estas informações se podem obter através dos atuais sistemas de controle leiteiro nos quais é possível avaliar a composição química do leite a partir das informações geradas pelo sistema de controle mensal dos rebanhos monitorados através da rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL). O monitoramento da composição e as políticas de controle fazem parte do novo cenário da cadeia láctea brasileira (IN-51). Para o produtor é necessário prever a composição do

leite e a sua relação com o estado nutricional para gerar opções alternativas no manejo do rebanho.

As variáveis externas apresentaram coeficientes de determinação baixos (dados não apresentados). Contraditoriamente ao exposto por outros autores (Bachman, 1992; Mühlbach et al., 2000), no presente trabalho os modelos gerados unicamente com estas variáveis não foram úteis para as estimações, possivelmente porque a fase de lactação correspondeu a uma faixa estreita da lactação e porque as condições de manejo estiveram padronizadas para animais em semi-confinamento com dietas controladas, igualmente, o fato descrito da exclusão apresentada entre as variáveis época e rebanho. A determinação dos sólidos através de variáveis metabólicas é um evento pontual, pelo qual foram gerados polinômios e contrastes para diminuir o efeito semana e rebanho. Poucas mudanças nos compostos do leite são originadas por efeitos ambientais quando as condições nutricionais são manipuladas (Reist et al., 2002).

## **5.6 Conclusões**

A predição da síntese de lactose, proteína, gordura, sólidos totais e sólidos não gordurosos do leite, através de modelos lineares utilizando indicadores metabólicos ou de outro tipo é possível, muito embora os coeficientes de determinação obtidos foram relativamente baixos.

## **6. Predicting Milk Quality Using an Artificial Neural Network Based Model**

(Submitted to: Journal of Dairy Science, ISSN 0022-0302)

### **6.1 Summary**

Many economic, nutritional and industrial interests press for ways to modify solids in the milk composition. The limited and substantial capacity of the mammary gland to produce large amounts of proteins and fat molecules has been used in modern study techniques to model the solid production. There is a lack of models that can simulate and provide understanding of the biological process of milk composition. For this purpose, neural networks are a particularly attractive technique for complex problems when modeling is difficult or when model dynamics do not permit online process control. Artificial neural networks was successfully used in the milk quality prediction problem. This process makes it possible to model the milk composition problem and identifies the relative importance of each input variable with the desired output variable. It was created artificial neural network based models to predict total milk solids, lactose, milk fat and milk protein from 45 attributes with direct metabolism relation or adaptation factors.

### **6.2 Resumo**

Existe um grande interesse por parte da indústria de lácteos para obter um produto primário com alto conteúdo de sólidos. Por sua vez, a glândula mamaria possui uma limitada capacidade de síntese de gordura, proteína e lactose. Na predição da composição química do leite têm tido utilizadas modernas técnicas para fazer a modelagem da produção de sólidos. É conhecido, que os modelos podem simular e provir fontes de entendimento para esclarecer os processos biológicos da síntese e secreção dos componentes do leite. Neste intuito, as Redes Neurais são uma particular e atrativa técnica que ajuda na solução de problemas complexos ou de difícil modelagem, ou em situações nas quais os modelos dinâmicos não conseguem serem controlados em tempo real. No problema da qualidade do leite é possível usar inteligência artificial através das Redes Neurais. Uma primeira aproximação é apresentada na tentativa de gerar um modelo que identifique a importância relativa de diferentes variáveis metabólicas usadas como variáveis de entrada para predizer uma única variável de saída, a qual corresponderia a cada um dos sólidos do leite. Mediante a técnica de Redes Neurais, foi gerado um modelo para predizer a composição de lactose, gordura, proteína

e sólidos totais do leite a partir de 25 variáveis correspondentes ao metabolismo das vias endógenas.

### **6.3 Introduction**

Milk is a raw material used by major processing industries worldwide. The composition of milk prior to processing might be altered by managerial, nutritional and possible genetic alterations.

Relative amounts of nutrients present in milk vary from cow to cow. These variations allow dairy cattle breeders to select a mammary cell population that produces milk with the desired composition. However, these permanent changes take time. Relatively fast but temporary changes may occur in response to dietary management (Bachman, 1992).

Daily measuring of milk composition for each cow could be used to improve animal selection and monitor control (Tsenkova et al., 2000).

Understanding the cow's metabolic status and endogenous metabolites may permit the prediction of health, milk production and composition through model tool. Biochemical indicators in blood and tissue metabolite levels vary under nutritional and health conditions, rates of nutrient turnover and the oxidation is different. This fact requires a dynamic, deterministic, and mechanistic model for its compression, Baldwin and Donovan (2000).

The traditional milk study models derived from linear regression are not adequate for all biological processes. Better models may be developed through computational techniques.

The determination of totals solids is an important practice to evaluate the impact of feeding and kinetics on lactation. The variability of parameters for each kinetic across individual components should be investigated through mixed models (Martin and Sauvant 2002).

Today, complex methods are being used to study milk composition using processes such as cell differentiation, cell death and secretion rate per cell, through interactive, nonlinear, curvefitting procedures (Pollott, 2004).

Artificial Neural Networks (ANNs) are computer techniques used as universal approximators of continuous functions constituted of a class of nonlinear models that learn the

correlation between input and output variables of a process, without a priori knowledge of the relationships between them.

The ANNs are particularly attractive in case of complex problems when modeling is difficult or when model dynamics do not permit online process control. In food processes, neural networks have been successfully used to predict pH and acidity for the industrial cheese productions Paquet (2000). Also, ANNs have been used in models for metabolic predictions (Stefanon et al. (1991).

The main objectives of the study were to create ANN based models to predict total solids, lactose, milk fat and milk protein metabolites as well as to identify the most important metabolites for these different predictions, with an acceptable error rate.

## **6.4 Material and methods**

### **Data Collection**

Two hundred and ten high yielding Holstein Friesian dairy cows localized in the South of Brazil were used in the test. To study the factors involved in milk production we have analyzed different components of the endogenous metabolic system. These components are related to milk secreting or to homeostasis regulator systems.

Ruminal fluid was collected to analyze directly the rumen functioning state and indirectly the primary digestive process.

Urine was analyzed to determine the potential metabolite excretion related to cow energy regulation function, in particular testing the presence of ketone bodies. The pH was tested to evaluate the possibility to infer, through linear regression, the rumen pH which is more difficult to be collected.

The endocrine mechanisms of milk production and/or homeostasis, cortisol, T3, T4, leptin and insulin were analyzed through solid phase radioimmunoassay.

Blood biochemical metabolites were clustered to analyze energetic, proteic and mineral metabolism. Additionally, enzymes were analyzed to recognize the hepatic function status. The energetic cluster was composed of 6 metabolites: glucose, cholesterol, NEFA, BHB,

fructosamine, and triglycerides. The proteic cluster was composed of 5 metabolites: total proteins, albumin, globulin, creatinine, and BUN. The mineral cluster was composed of 3 metabolites: calcium, inorganic phosphorus (Pi) and magnesium. The enzymes cluster was composed of 3 attributes: AST, CK, and GGT.

Total leucocytes counting, hematocrit and hemoglobin determination was carried out to evaluate haematic status.

The solid milk composition was analyzed through NIRS to determine lactose, fat, protein and totals solids. Flux cytometry was used to count the somatic cells in milk.

Sampling for analysis was done on the same day; the cows were distributed over programmed weeks through lactation period in relation to parturition date. Twenty-eight cows were analyzed for each farm. Cows with incomplete data were removed of the analysis.

Samples were collected on 5 farms sharing, at least, the following characteristics: milk production (mean of 25 litres/day), production and nutrition records. The database collected consisted in 107 observations with 45 attributes. There was no incompleteness, being all attributes informed for each observation.

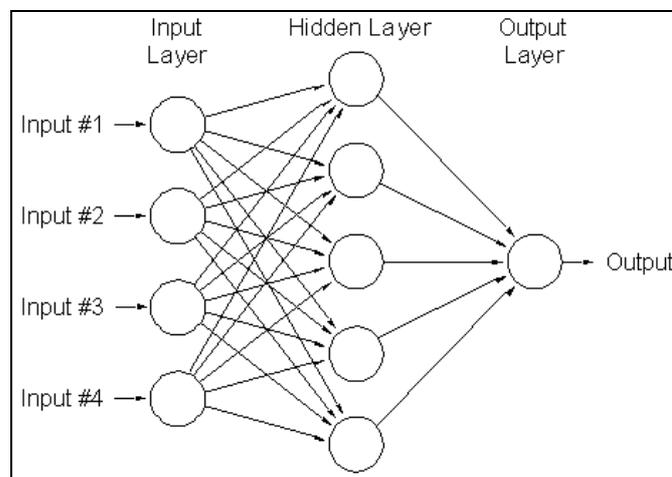
## **Machine Learning and Artificial Neural Networks**

Since computers were invented, we have tried to make them learn nearly as well as people do. In the Computer Science area, the field of Machine Learning is concerned with this wonder, creating computer programs to improve automatically with experience. Although computers learn unlike people, in recent years many theories and algorithms have been invented that are effective for certain types of learning tasks (Mitchell, 1997).

ANNs have become an important tool in the arsenal of machine learning techniques that can be applied to solve complex problems. This tool has been inspired in part by the observation that biological learning systems are built of very complex webs of interconnected neurons. In a rough analogy, ANNs are building out of a densely interconnected set of simple units, where each unit takes a number of real-valued inputs and produces a single real-valued output. These units, called neurons, are distributed in layers and connected by links called synapses, each of which is characterized by a weight of its own. There is also an activation function for limiting

the amplitude of the output of a neuron. Among the many interesting properties of an ANNs, the ability of the network to learn from its environment, and to improve its performance through learning has primary significance. ANNs learning methods provide a robust approach to approximating real-valued, discrete-valued, and vector valued target functions (Haykin, 1999).

An example of a network is presented in figure 1. The architecture is composed by 4 neurons in the input layer, a single hidden layer containing 5 neurons, and an output layer containing 1 neuron.



**Figure 1.** Fully connected feedforward network with one input layer, one hidden layer and one output layer.

### Artificial Neural Network Architecture

There are four different classes of network architectures: single-layer feedforward, multilayer feedforward, recurrent and lattice structures. In this work we have implemented a multilayer feedforward network with fully connected neurons. Typically, this network consists of a set of neurons divided in three layers: input, hidden and output. The input layer consists of one neuron for each network entry. The output layer consists of one neuron, which will compute the final result for prediction. The hidden layer, which enables the network to extract higher-order statistics from data, has different sizes for each experiment. The neurons in each layer of the network have as their inputs the output signals of the preceding layer only. In fully

connected networks, every neuron in each layer is connected to every other node in the adjacent forward layer.

There is not a perfect architecture to solve all problems. An important issue that has to be addressed is how to define the best architecture to solve each problem. Unfortunately, there are no well-defined rules for doing this. For each prediction we have done several experiments with different architectures and, based on prediction error, we have selected the best architecture.

### **Learning Process**

ANNs can learn the correlation from a subset of cases, called training set. The learning process consists in repeated presentations to the network of the training set and the corresponding desired output variable. During this iterative process the synaptic weights and biases are adjusted and, ideally, the network becomes more knowledgeable about its environment.

In the learning process of this work, we have used the error-correction rule and the paradigm of supervised learning. For each particular example presented to the network at a time  $n$  for a neuron  $k$ , there are some desired response  $d_k(n)$  and the actual response  $y_k(n)$ . Typically,  $y_k(n)$  is different from  $d_k(n)$  being defined an error signal  $e_k(n)$ . The purpose of error-correction learning is to minimize a cost function based on  $e_k(n)$  in a statistical sense. Supervised learning is done by a set of input-output examples. The synaptic weights are adjusted under the combined influence of the training vector and the error signal, which is defined as the difference between the actual response of the network and the desired response. For each interaction the error signal must be minimized using the error-correction learning rule of backpropagation algorithm.

Unfortunately, neural networks are susceptible to overfitting the learning examples at the cost of decreasing generalization accuracy over unseen examples. For small training sets this problem is most severe. One of the most successful methods for overcoming the overfitting problem is the leave-one-out cross-validation technique, in which the set of  $m$  training instances is repeatedly divided into a training set of size  $m-1$  and test set of size 1, in all possible ways.

After the learning process, the model is tested over the test set. A minimum error over the test set indicates the best model.

To perform the experiments the following characteristics as standardized in network architecture were used:

- 3 layers;
- Sum as the input/propagation function for hidden layer;
- Hyperbolic tangent sigmoid transfer function for hidden layer;
- 1 neuron in output layer;
- Sum as the input/propagation function for output layer;
- Hyperbolic tangent sigmoid transfer function for output layer;
- Synaptic weights randomly initiated in  $[-1,1]$  range;
- 10 initializations / retraining.

The following characteristics were variable at each experiment:

- Number of neurons in input layer,
- Number of neurons in hidden layer;
- Number of epochs;

## **6.5 Results and discussion**

Several experiments with different prediction targets were carried out. In the first set we used four different approaches to predict total milk solids from endogenous metabolites.

For each experiment an attribute to be predicted was selected summing up a total of 40 attributes, except for ketone and cow number. For each attribute we used several neural network architectures to perform the prediction and we will present the ones that achieved the best results in the leave-one-out cross validation process.

## Predicting total solids attribute

### Experiment 1

To predict the total milk solid attribute, the following network of variable characteristics was used:

- 39 neurons in input layer (one neuron for each input attribute);
- 1 neuron in hidden layer (a linear regression problem);
- 120 epochs (whether increasing or decreasing the number of epochs, the error increased).

Figure 2 presents the plots real and predicted values for total milk solids (i), lactose (iii), milk fat (v) and milk protein (vii) using 39 attributes, respectively, and the absolute prediction error for all observations for the same milk components (ii, iv, vi, viii), respectively.

Figure 3 presents the absolute prediction error for each of 107 observations for the main milk components. Mean prediction error was  $0.10504 \pm 0.09691$ . Mean value of total solids was 11.5773, with error of 0.90%.

Each of the 39 attributes used for prediction has an associated synapse connecting the input layer to hidden layer. Thus, we can determine the great correlation of non fat solids with total solids, and milk fat with total solids. The mean of all weights was  $0.05231 \pm 0.136$ . Non fat solids (0.6583) and milk fat (0.5940) were observed to be the most important attributes for predicting total milk solids.

We considered important all attributes with weights greater than weights mean + weights standard deviation. No included attributes showed weights lower than 0.0599.

The results of these experiments validate the model proposed which identified the main attributes for total solids prediction.

## Experiment 2

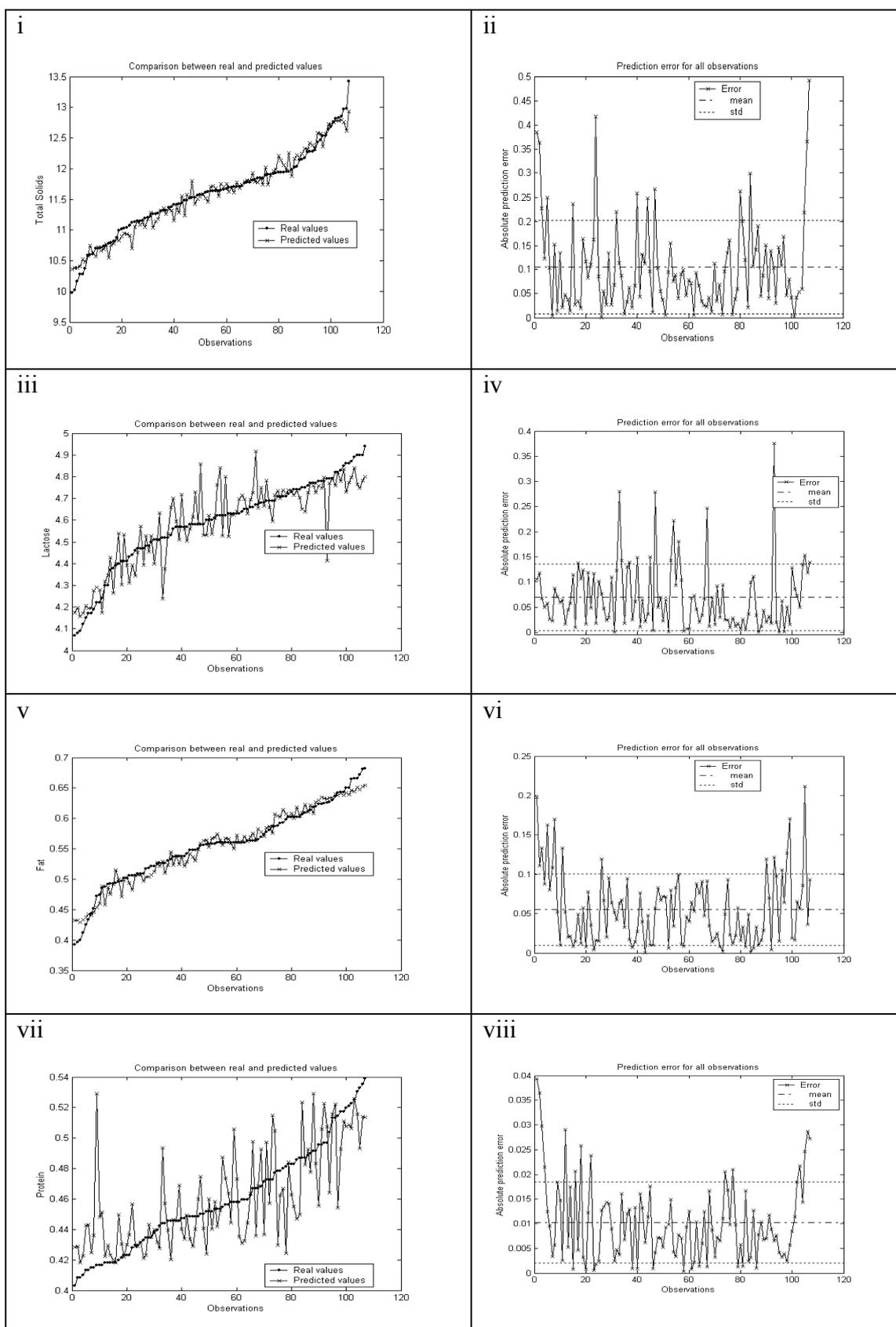
Based on the result obtained in experiment 1, the experiment was repeated using only the attributes non fat solids and fat.

The following network of variable characteristics to predict total solids was used:

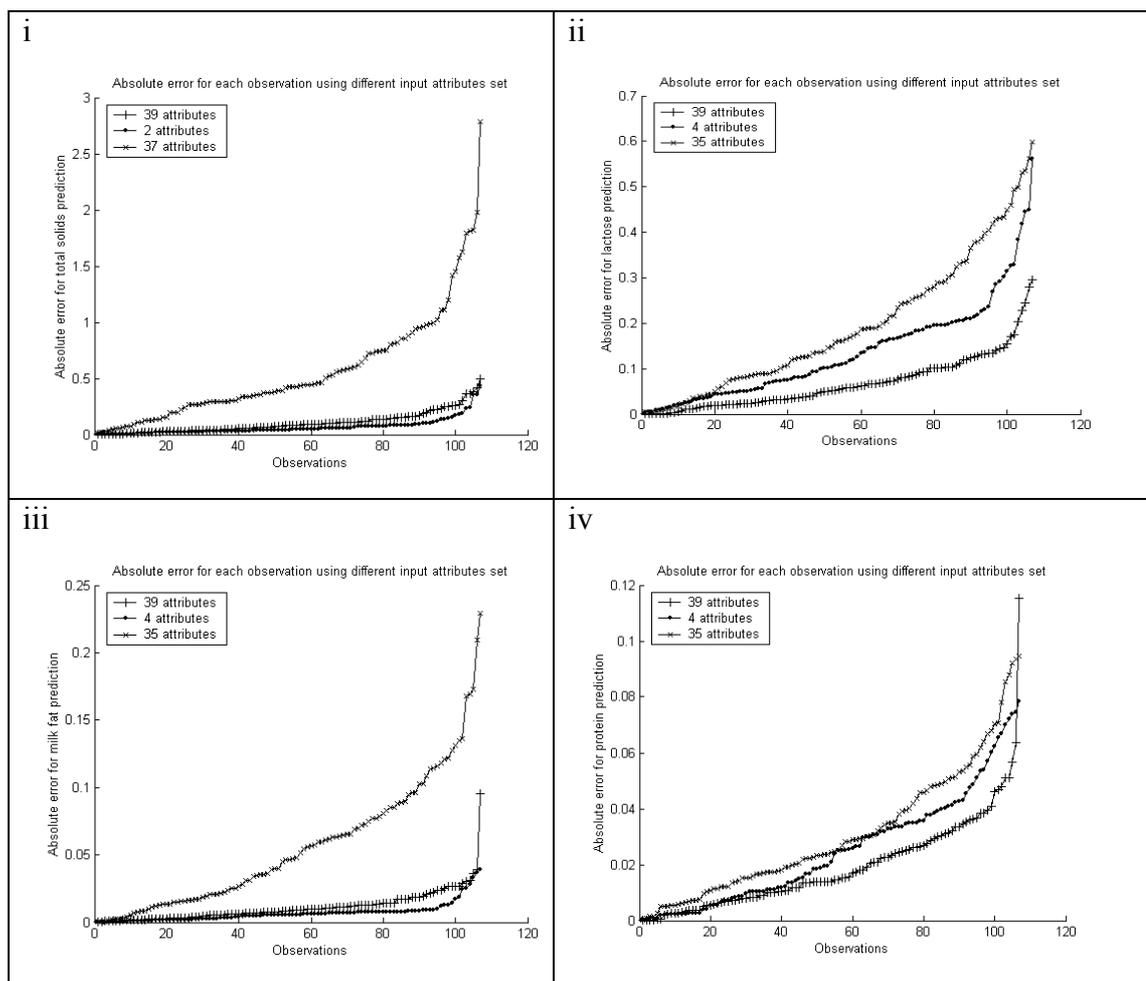
- 2 neurons in input layer;
- 1 neuron in output layer;
- 120 epochs;

Real and predicted values for each of the 107 observations using only the most important input attributes were compared.

Mean prediction error was  $0.06455 \pm 0.07155$ . Mean value of total solids was 11.5773, with error of 0.55%, 0.35% lower than experiment 1. Experiment 2 showed that, despite neural network capability to discover the main input attributes, the existence of other irrelevant attributes in the model may increase the prediction error. The use of only important attributes may increase model accuracy.



**Figure 2.** Plots of real and predicted values for total solids using 39 attributes (i) and the absolute prediction error for all observations (ii). Plots of real and predicted values for lactose using 39 attributes (iii) and the absolute prediction error for all observations (iv). Plots of real and predicted values for milk fat using 39 attributes (v) and the absolute prediction error for all observations (vi), and the real and predicted values for milk protein using 39 attributes (vii) and absolute prediction error for all observations (viii).



**Figure 3.** Plot of absolute error for total solids prediction with different variables number (i), plot of absolute error for lactose with different variables number (ii), plot of absolute error for milk fat (iii) plot of absolute error for milk protein with different variables number (iv).

The Most important attributes for the prediction of total milk solids with their weights were IPG (0.7054), milk protein (0.5677), BHB (0.5368), Pi (0.5229) and NEFA (0.4931).

### Experiment 3

The aim of this experiment was to discover the most important endogenous metabolites that interact to define milk total solids. All attributes were used except non fat solids and milk fat.

The following network of variable characteristics was used:

- 37 neurons in input layer;
- 10-5 neuron in hidden layer;
- 120 epochs;

The absolute prediction error for each of the 107 observations was  $0.5615 \pm 0.4897$ . The mean value of total solids was 11.5773, with error of 4.85%.

The total milk prediction showed a correlation of several metabolic variables (BHB, NEFA and Pi) indicating a complex biological process. The mean weights were  $0.3865 \pm 0.09419$ .

### **Metabolic importance of milk attributes for totals solids prediction**

The presence to IPG index in experiment 2 is the major evidence of the fat-protein relation in milk composition. Protein and fat are milk components with wide capacity to change the total solids. They compose 50% of the total solids (Bachman, 1992). The IPG is an important indicator of nutritional management on a farm.

In experiment 3, other main attributes for the prediction of total milk solids were metabolites important for lipid metabolism (BHB, NEFA). The latter is activated during BEN (Balance Energetic Negative) during early lactation (Reist et al., 2003). The fat mobilization may be a precursor for milk fat synthesis in the mammary gland, thus, increasing the milk fat percentage in total milk solids.

The Pi indicates the energy flux in milk synthesis during lactation (Knowlton and Herbein, 2002). The attributes selected in the ANN analysis are valid as main metabolites in the theoretical biology model construction.

For the predictions of lactose, milk fat and milk protein, the models proposed in the experiment 3 only were used, with metabolic variables in neuron input layers.

To predict lactose, milk fat and milk protein variables, the following processes were carried out:

### **Predicting lactose variable**

Each one of 39 attribute used for prediction has an associated synapse connecting the input layer to hidden layer. Figure 2 (iv) presents the absolute prediction error for each one of 39 synapses. The variables: non fat solids (2.1405), milk protein (0.9886), epoch season (0.8440) and total solids (0.6703) correlated greatly with lactose. Mean error was  $0.07010 \pm 0.06639$ . Other attributes showed weights less than 0.4583, mean error:  $0.1931 \pm 0.1486$  and weight error:  $0.8993 \pm 0.7122$ .

Metabolic attributes for lactose prediction were: cholesterol (2.3452), T3 (2.1076), CK (1.9873), globulins (1.9610) and Pi (1.7263).

### **Metabolic importance of attributes for lactose prediction**

Lactose is a metabolite with minor variation in the lacteal secretion (Bachman, 1992). However, in its synthesis the energy activities are very important. The model shows no evidence that metabolite indicators direct energy metabolism, differently from what was expected. The presence of T3 and phosphorus indicated the use for energy deriving from cell oxidation. On the other hand, in the lactose synthesis we need the best integral status of the mammary gland. This is the main reason why CCS appears inside the model for lactose prediction. In the total solid model, the main attributes for prediction was the season effect, possibly due to stress influence in the summer.

### **Predicting milk fat variable**

Figure 2 (v, vi) presents the real and predicted values and the prediction error for all observations using 39 attributes for fat estimation.

Each one of the 39 attributes used for prediction has one associated synapse connecting the input layer to the hidden layer. The variables showing a higher correlation with fat were: total solids (1.1115), non fat solids (1.3918) and mean error  $0.01025 \pm 0.008193$ . Synaptic mean weights were  $0.09134 \pm 0.2759$ . Other attributes showed weights lower than 0.0770.

The metabolic attributes for fat prediction with respective weights were: triglycerides (0.9719), globulins (0.7942), serum urea (0.7910), NEFA (0.6800).

### **Metabolic importance of attributes for milk fat prediction**

In the first experiment, most attributes for milk fat prediction were equal to total solids. This may be explained by the fact that in total solid predictions the main factors are non fat solids and total solids. The milk fat attribute is very sensitive and is a variable in both models. In practice, milk fat is a milk component with high oscillation. In the second experiment, total solids and not fat solids were removed and another set of attributes with six main metabolites was used. Under these conditions, triglycerides was the main attribute for milk fat prediction. Different authors have already recognized these metabolites in the milk synthesis process (Jensen, 2002); NEFA, globulins and serum urea are metabolites for practical use in fat milk composition prediction because of their influence on health status and protein diet evaluation. The six variables selected for ANN process represent the endogen metabolic process

### **Predicting milk protein variable**

Figure 2 (vii, viii) presents the real and predicted values for milk protein and predicted error graphic for all observations using all 39 attributes.

Each one of the 39 attributes used for prediction has one associated synapse connecting the input layer to the hidden layer. The weights for the main synapses were non fat solids (1.4737), total solids (0.7264), lactose (0.6699), and epoch season (0.5220). The mean error was  $0.01867 \pm 0.01662$ .

The metabolic attributes for milk protein prediction were pH Urine (3.1793), Pi (1.9468), BHB (1.9242), serum urea (1.5948) and total protein (1.5499).

### **Metabolic importance of attributes for milk protein prediction**

In the first experiment, the presence of non fat solids and total milk solids were the main attributes for the ANN model. Lactose was the third metabolite in importance for prediction. In this first phase of the experiment, the effect of season on prediction became evident. In the second phase, total milk solids and non fat solids were removed from the model, thus, a new set

of attributes appeared. In the new model, direct variables related to protein metabolism were detected: total protein, BUN and urinary pH. They constitute 60% of total metabolic indicators of the milk protein synthesis. The other metabolites were related to energy metabolism and were necessary as much in the rumen as in the mammary gland. The BHB denoted the activation of gluconeogenic route

## **6.6 Conclusions**

The present experiment demonstrated the possible use of ANN techniques to predict milk solid compounds using metabolic and homeostatic information for high-yielding dairy cows.

## 7. DISCUSSÃO

Os parâmetros metabólicos para vacas leiteiras de alta produção sob condições de produção intensiva são estáveis para a raça Holandesa (Reist et al, 2002, Kida, 2003). Este fato pode estar-se apresentando pelos modernos sistemas de alimentação, que empregam alimentos balanceados e com taxas de digestibilidade conhecidas em períodos fixos durante o dia (Mühlbach, 2004). Assim, o fluxo de nutrientes desde o rúmen para a circulação entero-hepática é constante e permite uma maior absorção de moléculas que podem ser convertidas ou ativadas no fígado, liberando para a circulação metabólitos em concentrações adequadas para a manutenção das condições básicas de homeostase e de produção do leite (Knigth et al., 1994; Lago et al., 2004). Esta condição foi observada no presente trabalho. Os valores obtidos se encontraram dentro dos valores de referência e o estado fisiológico do fígado avaliado a partir da determinação de enzimas associadas ao funcionamento hepático, não indicou sinais de alteração funcional.

As exigências nutricionais de vacas de alta produção só conseguem ser atendidas, mediante uma nutrição criteriosa (Mühlbach, 2004). As condições de competitividade e lucro mínimo da produção leiteira atual no Brasil (Martins, 2005), obrigam aos produtores a observar práticas de nutrição baseadas em rigorosas previsões e custo mínimo. Há muito tempo, a nutrição de bovinos leiteiros de alta produção procura evitar doenças metabólicas que levam a múltiplos estados de perda direta ou indireta de produção pela doença o por diminuição da habilidade produtiva esperada dos animais de alta seleção genética (Hamann e Krömker, 1997; Ingvarsten et al., 2003). Tais perdas podem se refletir em baixa produção de leite e mudanças na composição química do leite (Motram, 1997). No presente trabalho, as diferentes dietas analisadas para os sistemas de produção no transcurso da coleta de amostras nos diferentes períodos climáticos, apresentaram estabilidade na composição e todas elas foram calculadas para os animais conforme a fase de lactação, o número de lactação, o peso vivo do animal e a composição e volume de produção do leite. Sendo estável a oferta nutricional para os animais, o efeito metabólico da dieta foi expresso nos diferentes valores obtidos para os indicadores metabólicos nas semanas (2, 5, 8 e 11) da lactação. Estes valores não apresentaram oscilações significativas que pudessem ser originadas em alterações nutricionais,

tanto pelo efeito de controle sobre a formulação dos nutrientes requeridos, como pelo controle homeostásico que os animais desenvolvem. Todos os valores encontrados concordam com trabalhos realizados em bovinos leiteiros (Kaneko et al., 1997; Wittwer, 2000; Lago et al., 2004).

As vacas leiteiras de alta produção possuem elevados requerimentos energéticos para a lactação, em especial na sua primeira fase. No presente trabalho, o balanceamento da dieta permitiu garantir um aporte nutricional adequado, uma vez que a dieta foi formulada a partir do conhecimento das características bromatológicas dos alimentos. No entanto, o consumo individual não pôde ser determinado em forma precisa, devido a que parte da ração foi aportada pelo consumo de pastagens melhoradas consumidas *ad libitum* durante um período do dia. Adicionalmente, é conhecido que as vacas leiterias deprimem o consumo na primeira fase da lactação (Aeberhard et al., 2001a; Tran e Jhonson, 1991).

A composição do leite reflete a adequação energética da vaca na lactação (Kida, 2003). A lactose precisa para sua síntese altos níveis circulantes de glicose, e por sua vez, a lactose é responsável tanto pelo volume da secreção láctea como por uma alta porcentagem dos sólidos totais e sólidos não gordurosos (Fredeen, 1996; Bachman, 1992).

A depressão no consumo de matéria seca, junto com uma alta secreção do leite, levam à apresentação do balance energético negativo (BEN), o qual pode-se tornar um problema na produção leiteira (Hamann e Krönker, 1997; Ingvarsten e Andersen, 2000). A mobilização das reservas de tecido adiposo é a resposta fisiológica dos animais para garantir a homeostase energética (Doepel et al., 2002). No intuito de avaliar o grau de mobilização de reservas, no presente trabalho, foram determinados NEFA e BHB. Os níveis circulantes de NEFA mostraram valores que permitem comprovar que o balanceamento da ração foi adequado. Igualmente, pôde se avaliar que a mobilização não foi significativa, porque não foram detectados altos níveis de corpos cetônicos na urina avaliados através de fitas reagentes, como seria de esperar. Similares observações têm sido descritas (Enjalbert et al., 2001). O status energético encontrado, permite supor que os riscos sobre a saúde das vacas no estudo, não apresenta fatores que induzam doenças metabólicas ou redução

significativa da produção estimada. Diferentes autores têm observado estreita correlação estatística entre o status energético e a apresentação de quadros patológicos de origem metabólica (cetose, fígado gorduroso) de variada intensidade (Hamann e Krömker, 1997; Oetzel, 2001; Ingvarlsen et al., 2003; Bobe et al., 2004).

No rúmen é produzido BHB, um dos denominados corpos cetônicos. Sob condições de BEN, os valores séricos de BHB elevam-se. No presente trabalho, o BHB mostrou variação estatística significativa entre os rebanhos ( $p < 0,031$ ), mas não entre os períodos como era esperado. Este fato pode ter acontecido pela densidade energética da ração fornecida a qual impediria alta mobilização de tecido adiposo. Nas determinações de BHB, foram identificados animais com tendência individual a grandes mobilizações de reservas, mas não foi o comportamento do conjunto de animais dentro dos rebanhos. As variações entre os rebanhos seriam explicadas pela qualidade da ração e o nível de produção por lactação em cada um deles. Os valores de BHB tiveram um comportamento como esperado, com elevação nas primeiras semanas da lactação e declínio no período final de estudo, concordando com outros autores (Aerberhard et al., 2001; Busato et al., 2002). Os maiores valores de BHB foram observados na 8ª semana de lactação (0,78 mmol/L), similarmente aos resultados obtidos por Enjalbert et al., (2001).

Alguns autores (Delbecchi et al., 2001; Drackley et al., 2001) consideram que a mobilização de tecido adiposo de reserva, pode elevar o teor de gordura no leite. No presente estudo, esta observação foi apenas parcialmente observada. Os maiores valores de gordura apresentaram-se na 5ª semana da lactação (3,77%), mas não foram encontradas variações estatísticas entre os períodos.

A fructosamina tem sido descrita como um avaliador retrospectivo do status energético (Enemark et al., 2004). No presente trabalho, este fato não foi provado. Não foi encontrada diferença estatística entre os quatro períodos estudados, nem quando cada um destes (exceto na 2ª semana) foram comparados com os valores de produção determinados duas semanas antes do período analisado.

Metabólitos tais como triglicerídeos, colesterol e glicose não apresentaram vantagens na sua determinação quando o objetivo foi encontrar indicadores do

metabolismo energético. Para a glicose, isto pode ser explicado pelo alto controle homeostático que é exercido sobre ela (Khorasani e Kennelly, 2001). De outra parte, a complexa composição da gordura do leite, composta por ácidos graxos de cadeias curtas, medias e longas em diferentes proporções, ocasiona que os níveis séricos de triglicerídeos e colesterol não ofereçam informações pontuais que possam ser relacionadas diretamente com a composição do leite, devido a que o intervalo de seus valores pode ser muito amplo (colesterol) ou que na sua origem (triglicerídeos) seja apenas uma das fontes que contribuem com os ácidos graxos presentes na glândula mamária (Jensen, 2002; McNamara e Baldwin, 2000).

Fisiologicamente, a regulação da homeostase se deve a um complexo ajuste controlado pelo sistema nervoso central e regulado com precisão pelo sistema endócrino. A síntese, secreção e ejeção do leite, reúnem o maior número de hormônios entre as funções fisiológicas de animais de produção (Svennersten-Sjaunja e Olsson, 2005). Entre os hormônios que fazem parte do sistema regulador da lactação estão: insulina, cortisol, T3, T4 e leptina. A principal função destes é a adequação do metabolismo endógeno, sendo que o metabolismo bioquímico por sua vez é o responsável direto pelo fornecimento de precursores para a síntese do leite (Reist et al., 2002; Soliman et al., 2002)

O cortisol tem sido considerado como um bom indicador no estudo do estresse, constituindo um importante recurso no estudo das alterações endócrinas do pós-parto (Beerda et al., 2004). Os valores encontrados no presente trabalho, são uma fonte de informação sobre os períodos de maior risco metabólico e imunológico, pelos altos níveis circulantes de cortisol. Foi determinado, que na 2ª semana da lactação se apresenta o maior valor de cortisol plasmático, enquanto que, os menores valores corresponderam à 11ª semana, observações similares às realizadas por Reist e colaboradores (2003). Fisiologicamente, este comportamento é esperado e explica algumas das patologias metabólicas como cetose e laminite que usualmente ocorrem no período pós-parto em vacas de alta produção (Goff e Horst, 1998; Oetzel, 2001). No presente trabalho se encontrou uma relação estatisticamente significativa ( $r = 0,435$ ,  $p < 0,01$ ) entre o cortisol e os NEFA, evidência que permite indicar o papel dos NEFA como avaliador indireto do estresse nutricional, fator de maior interesse na produção.

A T3 e a T4 têm sido monitorados em diferentes trabalhos (Aeberhard et al., 2001; Reist et al., 2002). Os hormônios da tireóide fazem parte dos mecanismos de homeostase responsáveis pela regulação térmica e o consumo de oxigênio pelos diferentes tecidos. No presente trabalho, se encontrou uma alta e significativa relação estatística entre T3 e T4 ( $r = 0,7$ ;  $p < 0,01$ ) o que permite sugerir em forma prática a determinação de um só hormônio. Todavia, a prova de correlação mostrou que o T4 e a leptina tiveram uma maior relação, pelo que, seria mais útil a determinação de T4.

T3 e T4 atingiram o menor valor na 2ª semana pós-parto, similar ao observado por Reist et al. (2003), autores que atribuem o menor valor a um possível efeito do BEN. Os valores de T3 e T4 aqui apresentados foram inferiores a outros relatados no Brasil (Arcaro et al., 2003). A determinação de hormônios da tireóide permite sugerir que os processos metabólicos de alta exigência, comprometem os níveis circulantes destes hormônios, e só quando a demanda metabólica é reduzida (fase após do pico da lactação) os níveis circulantes de T3 e T4 começam a subir, tal como se encontrou no presente trabalho. Similares observações são descritas por Svennersten-Sjaunja e Olsson (2005).

A leptina é atualmente o centro dos estudos em endocrinologia de animais de produção (Macajavá et al., 2004). Existe um grande interesse por desvendar a relação entre o comportamento reprodutivo e produtivo com a mobilização de reservas adiposas (Houseknecht et al., 1998; Chilliard et al., 2005). Na última década, a investigação sobre a leptina em vacas leiteiras tem se concentrado na determinação do papel da leptina na regulação do BEN, incluindo efeitos sobre o escore de condição corporal, composição química do leite e eficiência reproductiva (Reist et al., 2002; Soliman et al., 2002; Feuermann et al., 2004; Chilliard et al., 2005). Estes autores informam de valores da leptina durante a lactação e fazem importantes observações sobre o papel deste hormônio sobre a regulação do metabolismo lipídico. O presente trabalho, é o primeiro no Brasil em apresentar valores de leptina nas primeiras semanas de lactação em vacas de alta produção e relacionar os valores encontrados com a composição do leite. Os valores encontrados não apresentaram diferenças estatísticas entre os períodos analisados.

Similar comportamento foi observado em outros trabalhos (Soliman et al., 2002; Macajvá et al., 2004). Reist et al., (2003) estudaram possíveis variações da leptina em curtos períodos de tempo após o fornecimento de dietas com diferentes níveis energéticos. Os autores não encontraram diferença significativa num período de oito horas. Atualmente, é discutido o mecanismo molecular de ação da leptina (Chilliard et al., 2005), o qual poderia ser gerando modificações nos sinais de transmissão nervosa no sistema nervoso central e bloqueando a ação do neuropeptídeo Y. Este tipo de ação estaria indicando que a leptina age principalmente sobre a regulação de tipo homeorrésico, do que sobre a regulação homeostática. Isto explicaria porque não são observadas mudanças sensíveis nos níveis circulantes do hormônio durante curtos períodos de tempo, em especial durante a lactação (Macajvá et al., 2004). Similares valores também foram observados no presente trabalho.

Quando comparados os valores obtidos de NEFA, glicose, triglicerídeos e colesterol com valores referenciados na literatura (Van Saun, 2000; Aeberhard et al., 2001; Busato et al., 2002; Kida, 2003; Lago et al., 2004) se verificou que os indicadores metabólicos apresentaram níveis similares. Na análise dos valores de glicose e NEFA nos períodos avaliados, se observou um comportamento inverso entre os dois metabólitos, isto é, menores níveis de glicose corresponderam com maiores níveis de NEFA, como esperado. No entanto, as análises de correlação não verificaram associação com significância estatística. Similar situação se apresentou entre os NEFA e outros indicadores do balance energético como colesterol ( $r=0,019$ ), BHB ( $r=0,043$ ) e triglicerídeos ( $r=-0,123$ ). Através de correlação fraca os NEFA foram associados com fructosamina ( $r=-0,207$ ,  $p<0,05$ ). As análises de correlação entre os NEFA e os hormônios analisados mostraram relações moderadas com cortisol ( $r=0,435$ ;  $p<0,01$ ), T3 ( $r=-0,303$ ;  $p<0,01$ ) y T4 ( $r=-0,333$ ;  $p<0,01$ ). Estas observações poderiam ser uma explicação da influência do cortisol nos processos gliconeogénicos, tais como mobilização de tecido adiposo como resposta ao BEN. Igualmente, a relação encontrada explica os altos valores de NEFA no dias próximos ao parto, quando os níveis de cortisol são maiores. As relações dos NEFA com os hormônios da tiróide estariam em conexão com os mecanismos de oxidação próprios da utilização dos NEFA, uma vez que uma das ações da T3 e da T4 é facilitar a lipólise e aumentar a taxa de oxidação nos tecidos.

Efetuada a parametrização fundamental (parâmetros do metabolismo energético e do controle endócrino) na construção de modelos (Sauvant, 1994), o presente trabalho procedeu a efetuar a construção de modelos lineares para estimar a composição individual dos sólidos do leite. Os modelos são representações da realidade (McNamara, 2004). Diferentes autores realizam esforços para elaborar modelos que representem as condições metabólicas na produção do leite. Baldwin e Donovan (2000) e McNamara (2004) apresentam importantes recopilações destes estudos. No Brasil, a maioria de trabalhos efetuados em modelagem da produção do leite têm sido direcionados para variáveis de tipo da nutrição, sistema de produção, ou indicadores socioeconômicos (Assis e France, 1988; Lovatto e Sauvant, 2002). Uma dificuldade na construção dos parâmetros é a obtenção de valores de comparação para o tipo de modelo em animais de alta produção. A literatura informa de valores de metabólitos que podem ser usados como referência (González, 1997; Wittwer, 2000; Lago et al., 2004). No entanto, muitos dos valores informados, foram obtidos em estudos que visaram objetivos diferentes, tais como avaliações de possíveis doenças metabólicas, ou respostas a desafios nutricionais. Os valores obtidos para gado leiteiro de alta produção em condições do sul do Brasil, foram comparados com valores internacionais de estudos de avaliação metabólica (Kida, 2003; Reist et al., 2003b; Reist et al., 2002) em especial o trabalho de Kida, que oferece valores altamente confiáveis, por serem obtidos sobre um grande volume de dados (8500 animais).

No presente trabalho, os processos de construção de modelos parciais, onde foram testados diferentes grupos de variáveis, por exemplo: indicadores do metabolismo energético, do metabolismo mineral, do metabolismo protéico, ou do controle endócrino, não ofereceram informação adequada para ser aceita dentro do modelo, basicamente devido aos níveis de significância. De outra parte, manipular um grande volume de variáveis, exige maiores recursos computacionais e aumenta a complexidade na compressão dos parâmetros selecionados (McNamara, 2004). No presente trabalho, através do algoritmo “stepwise” do pacote computacional SAS (SAS, 2001) para o procedimento de regressão múltipla, foram incluídas a totalidade de variáveis metabólicas e externas dentro de um único modelo matemático. As variáveis derivadas do metabolismo endógeno são as

correspondentes aos parâmetros de variação do modelo, cuja resposta fixa foram cada um dos componentes sólidos do leite. O presente estudo conseguiu prever os componentes do leite a partir dos indicadores bioquímicos analisados, embora, os coeficientes de determinação encontrados foram baixos. Na literatura são escassos os trabalhos que apresentem modelos de predição de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e sólidos não gordurosos a partir de indicadores bioquímicos do metabolismo endógeno. Uma aproximação importante foi apresentada por Beever et al. (1991), autores que revisaram modelos do comportamento da curva de lactação, tentando conhecer a compartimentação da energia metabolizável. Posteriormente, Baldwin e Donovan (2000), recopilaram estudos sobre modelos empíricos e mecanicistas para modelar a lactação em vacas de alta produção. Os modelos analisados aprofundaram os enfoques de Baldwin, quem em diferentes trabalhos, nas duas últimas décadas, introduziu a dinâmica bioquímica dentro dos parâmetros para a modelagem da lactação. Ainda que o trabalho de McNamara (2004), revela o estado atual da pesquisa e uso dos modelos de lactação, as informações apresentadas por ele não incluem os sistemas de controle endócrino, que no presente trabalho foram introduzidas para conhecer maiores inter-relações de controle homeostático da lactação.

O maior inconveniente encontrado na presente modelagem da lactação, não foram os baixos valores dos fatores de bondade de ajuste. O limitante continua sendo que os modelos propostos correspondem a modelos empíricos e estáticos com limitantes teóricas para uma completa explicação bioquímica do processo de síntese e secreção do leite. Os parâmetros obtidos no presente trabalho, revelam mudanças na primeira fase da lactação, na qual são mais severas as mudanças metabólicas devidas ao BEN e ao aumento da produção para atingir o pico da lactação. Neste sentido, no nível internacional, nos últimos anos têm se desenvolvido pesquisas que proporcionam valores de metabólitos ou informações que esclarecem os mecanismos fisiológicos da lactação (Aeberhard et al., 2001; Kida, 2003; Reist et al., 2003b). No Brasil, se encontram os trabalhos de Lago et al., (2004) e de Medeiros (2003) dentro dos estudos que apontam a geração de informações básicas para a introdução dos modelos como ferramenta de pesquisa em produção e bioquímica do leite.

Modernas técnicas de análise múltipla com complexos níveis de integração podem ser atualmente utilizados para análises avançadas ou de nível multivariado, as quais não são suscetíveis de ser modeladas em forma precisa através dos modelos matemáticos tradicionais de regressão linear ou não linear. A técnica desenvolvida no final da década do 1980, conhecida como “redes neurais” ou “redes de inteligência artificial”, identificadas pelas siglas do inglês ANN (Artificial Neural Networks) começam a ser usadas em pesquisa agropecuária (Haykin, 1999; Heald et al., 2000).

O uso da técnica de ANN no presente trabalho permitiu gerar modelos múltiplos de crescente complexidade, uma vez que as camadas (neurônios ou camadas da rede neural) correspondem cada um, a um grau crescente de complexidade. As funções de propagação, sinapse e transferência entre os neurônios, selecionam os parâmetros mais confiáveis na predição da variável resposta. Um passo prévio e importante, que se deve gerar para construção dos modelos é a criação de um conjunto de dados que serão usados pela máquina no seu processo de aprendizado, conhecido como “learnig” e que constitui a base de memória do conjunto de variáveis para a máquina (Heald et al., 2000). Mediante esta sofisticada técnica e software especializado, foi gerado neste trabalho um modelo para prever a composição do leite baseada na técnica de redes neurais. Stefanon et al. (2001) foram os primeiros em usar redes neurais na predição de fluxos biológicos em vacas leiteiras. O presente trabalho obteve excelentes coeficientes de predição (valores entre 0,56 e 0,98) com alta significância estatística.

A modelagem da composição do leite através desta técnica é referenciada no presente trabalho pela primeira vez na literatura, não sendo encontradas informações que possam servir de base de comparação desta técnica com outras. No entanto, a técnica de ANN se apresenta como uma ferramenta para integrar variáveis complexas e variadas, como as variáveis neste trabalho analisadas, as quais representam diversas rotas metabólicas (metabolismo energético, metabolismo protéico e nitrogenado, status mineral), estados funcionais e metabólicos (rúmen e fígado), sistemas de controle endócrino e variáveis externas (rebanho, período de lactação, clima).

A modelagem atualmente constitui uma abrangente área de estudo, em áreas como a nutrição e o metabolismo de nutrientes (McNamara, 2004). Importantes usos de modelos empíricos como o apresentado neste trabalho são as equações de predição de requerimentos e metabolismo, propostas pelo NRC para gado de leite e corte, os modelos de predição de Cornell (CNCPS) e a variação deste modelo para controle da lactação desenvolvida na Universidade da Pensilvânia (CPM) (Boston et al., 2000). Em 1987, Baldwin e colaboradores, acreditavam que os modelos apoiariam simulações de produção, melhorariam o conhecimento básico da compartimentação de nutrientes, ajudariam nas estimativas de contaminação do meio ambiente e serviriam de suporte na pesquisa aplicada e no ensino. No presente, McNamara (2004), assegura que não somente estes usos já foram desenvolvidos, mas que os modelos têm permitido maior integração quantitativa e dinâmica, têm reduzido as dificuldades de análises entre sistemas complexos e avaliam com maior certeza hipóteses alternativas identificando fatores críticos, poupando esforços e recursos financeiros, diante das cada vez mais restritas condições de experimentação e financiamento.

## 8. CONCLUSÕES

- A relação matemática estudada entre os indicadores do metabolismo energético e os valores dos principais hormônios no pós-parto e os componentes sólidos do leite, não permitem inferir que exista um indicador único que possa relacionar os três parâmetros analisados.
- Foram determinados dos tipos de modelos para prever a composição do leite a partir de indicadores endógenos.
- A predição da síntese de lactose, proteína, gordura, sólidos totais e sólidos não gordurosos do leite, através de modelos lineares utilizando indicadores metabólicos ou de outro tipo é possível, ainda que com baixos coeficientes de determinação.
- A técnica de redes neurais (ANN), como ferramenta na predição da composição química do leite abre uma importante área de pesquisa.
- Uma premissa fundamental para a construção de modelos radica na confiabilidade e validade dos parâmetros de entrada (variáveis).
- Os valores dos indicadores metabólicos e hormônios apresentados constituem valores de referência para vacas de alta produção sob condições do sul de Brasil.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBERHARD, K. et al. Milk yield composition, nutrition, body conformation traits, body condition scores, fertility and diseases in high-yielding dairy cows. Part 1. **Journal Veterinary Medicine, Series A.** v.48, n.2, p. 97-110, 2001.

AEBERHARD, K. et al. Metabolic, enzymatic and endocrine status in high-yielding dairy cows. Part 2. **Journal Veterinary Medicine, Series A.** v.48, n.2, p.111-127, 2001.

ARCARO, J.R. et al. Teores plasmáticos de hormônios, produção e composição do leite em sala de espera climatizada. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.7, n.2, p.350-354, 2003.

ASSIS, A.G.; FRANCE, J. Modelling dairy cattle feeding in the South-East region of Brazil. **Agricultural Systems**, v.12, n.3, p. 129-170, 1983.

BACHMAN, K.C. Managing milk composition. In: VAN HORN, H., WILCOX, C. (Eds.). **Large dairy herd management**. Champaign: Dairy Science Association, American, Dairy Science Association, 1992. p.336-346.

BALDWIN, R.L.; DONOVAN, K.C. Modelling the Lactating Dairy Cow. In: THEODOROU M.K.;FRANCE J. **Feeding systems and feed evaluation models**, Wallingford: CAB International. 2000. cap. 14, p 323-342.

BALDWIN, R.L. et al. Metabolism of the lactating cow I. Animal elements of a mechanistic model. **Journal Dairy Research**, v.54, n.1, p.77-87, 1987.

BAUMAN, D.E.; CURRIE, W.B. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorrhexis. **Journal of Dairy Science**, v.63, n.9, p.1514-1529. 1980.

BAUMAN, D.E.; GRIINARI, J.M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Review Nutrition**, v.23, n.7, p.203-227, 2003.

BAUMGARD, L.H. **Managed milk fat depression**. Tucson: University of Arizona, 2003. p.41-45.

BEERDA B. et al. Effects of milk production capacity and metabolic status on HPA function in early postpartum dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.7, p.2094-2102, 2004.

BEEVER, D.E. et al. A review of empirical and mechanistic models of lactational performance in the dairy cows. **Livestock Production Science**, v.29, n.2-3, p.115-130, 1991.

BOBE, G. et al. Invited review: Pathology, etiology, prevention and treated of fatty liver in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.10, p.3105-3124. 2004.

BOSTON, R.C. et al. The conversion of a scientific model describing dairy cow nutrition and production to an industry tool. In: McNAMARA, J.P.; FRANCE, J.; BEEVER, D.E. (Eds.). **The CPM dairy project modeling nutrient utilization in farm animals**. Wallingford, UK: CAB International, 2000. 377p.

BOUDA, J.G.; QUIROZ-ROCHA, G.F. Acidose ruminal crônica e diagnóstico diferencial de transtornos ruminais. In: GONZÁLEZ, F.D., BORGES, J.B., CECIM, M. (Eds). **Uso de provas de campo e laboratório em doenças metabólicas e ruminais de bovinos**. Porto Alegre, RS. 2000, p.31-34.

BRANDÃO, A.S.; LEITE, J.L. O desempenho e as perspectivas para o agronegócio do leite brasileiro no mercado internacional. In: DUARTE, V. et al.(Eds). **O agronegócio do leite e políticas públicas para o seu desenvolvimento sustentável**. Juiz de Fora: Embrapa, 2002. p. 105-149.

BROWN, M.S. et al. Evaluation of models of acute and subacute acidosis on dry matter intake, ruminal fermentation, blood chemistry, and endocrine profiles of beef steers. **Journal of Animal Science**, v.78, n.12, p.3155-3168, 2000.

BUSATO A. et al. Body condition scores in dairy cows: associations with metabolic and endocrine changes in healthy dairy cows. **Journal Veterinary Medicine Series A**, v.49, n.9, p.455-460. 2002.

CANGIANO, C.A. et al. Conpast 3.0: programa de computación para la estimación del consumo en bovinos en pastoreo. Una aplicación en sistemas lecheros. In: EVERLING, D.M. et al. (Eds). **Modelos para a tomada de decisões na produção de bovinos e ovinos**. Santa Maria: UFSM, 2002. p.69-91.

CANT, J. P. **Modeling milk composition**. University of Guelph, Department of Animal and Poultry Science, 2001. p.1-8.

CHILLIARD, Y. et al. Leptin expression in ruminants: nutritional and physiological regulation in relation with energy metabolism. **Domestic Animal Endocrinology**, v.29, n.1, p.3-22, 2005.

CNA. CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUARIA DO BRASIL. Informativo econômico do leite. Disponível em: <<http://www.cna.org.br/publicações>> Acesso em: 25 jul. 2005.

COLLIER, J.R. Nutritional, metabolic and environmental **aspects of lactation**. In: LARSON, B. **Lactation**. 2<sup>nd</sup>. ed. Urbana: The Iowa State University, 1995. chap.3, p. 80-127.

COTE, J. F.; HOFF, B. Interpretation of blood profiles in problem dairy herds. **The Bovine Practitioner**, v.26, n.1, p.7-11, 1991.

CUNNINGHAM J.G. **Tratado de fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. p.418-425.

DANFAER, A. Mathematical modelling of metabolic regulation and growth. **Livestock Production Science**, v.27. n.1, p.1-18, 1991.

DELAVAUD C. et al. Plasma leptin determination in ruminants: effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. **Journal of Endocrinology**, v.165, n.2, p.519-526, 2000.

DELBECCHI, L. et al. Milk fatty acid composition and mammary lipid metabolism in Holstein cows fed protected or unprotected canola seeds. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.6, p.1375-1381, 2001.

DEPETERS, E.J.; CANT, J. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: a review. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.8, p.2043-2070, 1992.

DOEPEL, L. et al. Peripartum performance and metabolism of dairy cows in response to prepartum energy and protein intake. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.9, p.2315-2334, 2002.

DRACKLEY, J.K. et al. Responses of milk fat composition to dietary fat or nonstructural carbohydrates in Holstein and Jersey cows. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.5, p. 1231-1237, 2001.

DÜRR, J.W. Segurança alimentar e qualidade do leite. In: DUARTE V. et al. (Eds.). **O agronegócio do leite e políticas públicas para o seu desenvolvimento sustentável**. Juiz de Fora: Embrapa, 2002. p.539-546.

EDWARDS, J.L.; TOZER, P.R. Using activity and milk yield as predictors of fresh cow disorders. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.2, p.524-531. 2004.

ENEMARK, J.M. et al. An evaluation of parameters for the detection of subclinical rumen acidosis in dairy herds. **Veterinary Research Communications**, v.28, n.8, p.687-709, 2004.

ENJALBERT, F. et al. Ketone bodies in milk and blood of dairy cows: relationship between concentrations and utilization for detection of subclinical ketosis. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.3, p. 583-589, 2001.

ESPÍRITO SANTO, B.R.; NETTO, V.N. Inserção do Brasil no mercado internacional de lácteos. In: DUARTE V. et al. (Eds.). **O Agronegócio do leite e políticas públicas para o seu desenvolvimento sustentável**. Juiz de Fora: Embrapa, 2002. p.95-204.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. The statistic division: dairy cattle in the world. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 25 jul. 2005.

FEUERMAN, Y. et al. Leptin affects prolactin action on milk protein and fat synthesis in the bovine mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.9, p.2941-2946, 2004.

FIALHO, F.B. Sistemas de apoio à decisão de produção de suínos e aves. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36, 1999, Porto Alegre. **Anais SBZ**. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1999. p.307-317.

FREDEEN, A.H. Considerations in the nutritional modification of milk composition. **Animal Feed Science and Technology**, v.59, n.1-3, p.185-197, 1996.

GOMES, A.T. Situação atual e tendências da competitividade de sistemas de produção. In: DUARTE, V. et al. (Eds). **O agronegócio do leite e políticas públicas para o seu desenvolvimento sustentável**. Juiz de Fora: Embrapa, 2002. p.67-81.

GARRET, E.F. et al. Diagnostic methods for the detection of subacute ruminal acidosis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.6, p.1170-1178, 1999.

GEISHAUSER, T. et al. An evaluation of milk ketone test for the prediction of left displaced abomasum in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.12, p.3188-3192. 1997.

GOFF, J.P.; HORST, R.L. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.5, p.1260-1268, 1998.

GONZÁLEZ, F.H.D. O perfil metabólico no estudo de doenças da produção em vacas leiteiras. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.25, n.2, 1997, p.13-33.

GONZÁLEZ, F.D. Uso do perfil metabólico para determinar o status nutricional em gado de corte. In: GONZÁLEZ, F.D. et al. (Eds). **Perfil metabólico em ruminantes**. Porto Alegre: Gráfica UFRGS, 2000. p.63-74.

GONZÁLEZ, F.D. Composição bioquímica do leite e hormônios da lactação. In: GONZÁLEZ, F.D.; DÜRR, J.W.; FONTANELI, R.S. (Eds). **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre, RS: Gráfica UFRGS, 2001. p.5-21.

GONZÁLEZ, F.H. D.; CAMPOS, R. O leite como indicador metabólico-nutricional em vacas. **A Hora Veterinária**, v.131, n.1, 2003, p.36-39.

GRIINARI, J.M. et al. Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.5, p.1251-1261, 1998.

GRIINARI, J.M. et al. Role of insulin in the regulation of milk fat synthesis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n.6, p.1076-1084. 1997.

GRUMMER, R.R. Monitoramento de desordens metabólicas periparto. In: **IV Curso Internacional de Atualização em Nutrição e Reprodução de Ruminantes**. Uberlândia, MG: UNESP-Botucatu, 2002. p.65-90.

HAMANN, J.; KRÖMKER, V. Potential of specific milk composition variables for cow health management. **Livestock Production Science**, v.48, n.3, p.201-208, 1997.

HAYKIN, S. **Neural networks: a comprehensive foundation**. 2<sup>nd</sup>. ed. River, N.J: Prentice Hall, Upper Saddle. 1999. 470 p.

HEALD, C.W. et al. Computerized mastitis decision aid using farm-based records: an artificial neural network approach. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.4, p.711-720, 2000.

HERDT, T.H. Variability characteristics and test selection in herd level nutritional and metabolic profile testing. **Veterinary clinics of North America: Food Animal Practice**, v.16, n.2, p.387-403, 2000.

HEUER, C. et al. Determination of Acetone in cow milk by fourier transform infrared spectroscopy for the detection of subclinical ketosis. **Journal of Dairy Science**, v.84, n. 3, p.575-582, 2001.

HEUER, C. et al. Prediction of energy balance in a high yielding dairy herd in early lactation: model development and precision. **Livestock Production Science**, v.65, n.1-2, p.91-105, 2000.

HOLTENIUS, K et al. Effect of feeding intensity during the dry period. 2: metabolic and hormonal responses. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.3, p.883-891, 2003.

HOUSEKNECHT K, L. et al. The biology of leptin: a review. **Journal of Animal Science**, v.76, n.5, p.1405-1420, 1998.

IBARRA, A. Sistema de pagamento do leite por qualidade. Visão global. In: **O Compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. DÜRR, J.W.; CARVALHO, M.; SANTOS, M.V. (Eds). Passo Fundo: Editora UPF, 2004. p.72-86

INGVARTSEN, K.L.; ANDERSEN, J.B. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.7, p.1573-1597, 2000.

INGVARTSEN, K.L. et al. On the relationship between lactational performance and health: is it yield or metabolic imbalance that cause production disease in dairy cattle: A position paper. **Livestock Production Science**, v.83, n.2-3, p.227-308. 2003.

JENSEN, R. G. The composition of bovine milk lipids: january 1995 to december 2000. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.2, p.295-350, 2002.

- JONKER, J. S. et al. Milk urea nitrogen target concentrations for lactating dairy cows fed according to national research council recommendations. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.6, p.1261-1273, 1999.
- KANEKO, J.J. et al. **Clinical biochemistry of domestic animals**. San Diego, CA: Academic Press, 932p. 1997
- KELLY, J.M. et al. Celular energy metabolism and regulation. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.2, p.678-694. 1991.
- KENNELLY, J.J. et al. **Milk composition in the cow**. University of Alberta., 2000. 20 p.
- KENNELLY, J. J. et al. Influence of carbohydrate source and buffer on rumen fermentation characteristics, milk yield, and milk composition in early-lactation Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.11, p.2486-2496, 1999.
- KANTEK G. CE, **Manual de urinálise veterinária**. São Paulo: Varela, 1996. 96 p.
- KHRORASANI, G.R.; KENNELLY, J.J. Influence of carbohydrate source and buffer on rumen fermentation characteristics, milk yield, and milk composition in late-lactation Holsteins cows. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.7, p.1707-1716, 2001.
- KIDA K. Relationships of metabolic profiles to milk production and feeding in dairy cows. **Journal Veterinary Medical Science**, v.65, n.6, p.671-677, 2003.
- KNIGHT, C.H. et al. Nutrient metabolism and utilization in the mammary gland. **Livestock Production Science**, v.39, n.1, p.29-137, 1994.
- KNOWLTON, K.F.; HERBEIN, J.H. Phosphorus partitioning during early lactation in dairy cow fed diets varying in phosphorus content. **Journal Dairy Science**, v.85, n.5, p.1227-1236. 2002.
- LAGO, E.P. et al. Parâmetros metabólicos em vacas leiteiras durante o período de transição pós-parto. **Brazilian Journal of Veterinary Science**, v.11, n.1-2, p.98-103, 2004.
- LOVATTO, P.A.; SAUVANT, D. Modelagem aplicada aos processos digestivos e metabólicos do suíno. **Ciência Rural**, v.31, n.4, p.663-670, 2001.
- LOVATTO, P.A.; SAUVANT, D. Premissas básicas para o desenvolvimento de modelos na agricultura. In: Everling, D.M. et al. **Modelos para a tomada de decisões na produção de bovinos e ovinos**. (Eds). Santa Maria: UFSM, 2002. p.9-33.
- MACAJAVÁ, M. et al. Role of leptin in farm animals: a review. **Journal Veterinary Medicine, Series A**. v.51, n.4, p.157-166, 2004.

MARTIN, S. A. Manipulation of ruminal fermentation with organic acids: a review. **Journal Animal Science** v.76, n.12, p.3123-3132, 1998.

MARTIN, O.; SAUVANT, D. Metaanalysis of input/output kinetics in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n.12, p.3363-3381, 2002.

MARTINS, P.C. Principais desafios e oportunidades para o desenvolvimento da pecuária leiteira no Brasil. In: ENCONTRO VALLÉE DE ATUALIZAÇÃO PARA A PECUÁRIA DE LEITE, 1., 2005, Belo Horizonte. Anais 1<sup>o</sup> Encontro EVAPEL Pecuaria de Leite: Vallée, 2005. p.1-10.

McNAMARA, J.P. e BALDWIN, R.L. Estimation of parameters describing lipids metabolism in lactation: Change of existing knowledge described in model of metabolism. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.1, p.128-143, 2000.

MEDEIROS, H.R. **Avaliação de modelos matemáticos desenvolvidos para auxiliar a tomada de decisão em sistemas de produção de ruminantes em pastagens**. 2003. 112p Tese (Doutorado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Faculdade de Agronomia, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

MEIRELES AJ, RUBENZ J, Setor Lácteo: história recente e construção de um novo tempo. In: DUARTE, V. et al. (Eds). **O agronegócio do leite e políticas públicas para o seu desenvolvimento sustentável**. Juiz de Fora: Embrapa, 2002. p.29-38.

MINISTÉRIO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, MAPA, Instrução Normativa No. 51. Brasília, 2002. 45p.

MITCHELL, T. M. **Machine learning**. Boston: MacGraw-Hill, 1997. 485p.

MOBERG, G. How behavioural stress disrupts the endocrine control of reproduction in domestic animals. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.1, p.304-311, 1991.

MOLA, F. et al. **Use and overuse of neural networks in statistics**. In: INTERNATIONAL MEETING OF MULTIDIMENSIONAL DATA ANALYSIS, 4., 1997, Bilbao. **Proceedings...** Bilbao: CISIA, 1997. p.57-68

MOTTRAM T, Automatic Monitoring of the health and metabolic status of dairy cows. **Livestock Production Science**, v.48, n.3, p.209-217, 1997.

MÜHLBACH, P. R. **Produção e manejo de bovinos de leite**. Porto Alegre: Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004. 225p.

MÜHLBACH, P. R. et al. Aspectos Nutricionais que interferem na qualidade do leite. In: PRATES, E. R et al. (Eds). **Novos desafios para a produção leiteira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Gráfica UFRGS, 2000. p.73-102.

NIKOLIC, J.A. et al. Periparturient endocrine and metabolic changes in healthy cows and in cows affected by mastitis. **Journal Veterinary Medicine, Series A**, v.50, n.1, p.22-29. 2003.

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

OETZEL, G. R. Herd-based biological testing for metabolic disorders. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF BOVINE PRACTITIONERS, 34., DAIRY HERD PROBLEMS INVESTIGATION SEMINAR, 2001, Vancouver. Proceedings... Vancouver: American Association of Bovine Practitioners, 2001. 12 p

ORTOLANI, E. Diagnóstico de doenças nutricionais e metabólicas por meio de exame de urina em ruminantes. In: GONZÁLEZ FD, (Ed). **Avaliação metabólico-nutricional de vacas leiteiras por meio de fluidos corporais**. Gramado: UFRGS, 2002. p. 18-26.

PAQUET, J. et al. Modeling of pH and acidity for industrial cheese production. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.11, p.2393-2409, 2000.

POLLOTT, G. E. Deconstructing milk yield and composition during lactation using biologically based lactation models. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.8, p.2375-2387, 2004.

RAGSDALE, C.T. **Spreadsheet modeling and decision analysis: a practical introduction to management science**. Cincinnati, OH: South Western College, 1997. 730p.

RIBAS, P.N. et al. Contagem e escore de células somáticas em amostras de leite de tanques. In: DUARTE V. et al. (Eds). **O agronegócio do leite e políticas públicas para o seu desenvolvimento sustentável**. Juiz de Fora: Embrapa, 2002. p. 535-538.

REIST, M. et al. Postpartum reproductive function: association with energy, metabolic and endocrine status in high yielding dairy cows. **Theriogenology**, v.59, n.8, p.1707-1723, 2003a.

REIST, M. et al. Concentrate feeding strategy in lactating dairy cows: metabolic and endocrine changes with emphasis on leptin. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.5, p.1690-1706, 2003b.

REIST, M. et al. Estimation of energy balance at the individual and herd level using blood and milk traits in high-yielding dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.12, p.3314-3327, 2002.

ROCHE, J.R. et al. Influence of precalving feed allowance on periparturient on metabolic and hormonal responses and milk production in grazing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.88, n.2, p.677-689, 2005.

ROSSATO, W.L. et al. Condição metabólica e desempenho reprodutivo no pós-parto em vacas leiteiras no sul do Brasil. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 23, n.3, p.155-156, 1999.

RUSHEN J. Some issues in the interpretation of behavioral responses to stress. In: Moberg GP; Mench JA, (Eds). **The biology of animal stress**. Wallingford, UK: CAB International, 2000: p.23-42.

SAINZ, R.D.; BALDWIN, R.L. Models of growth, lactation and digestion in cattle. In: **Modelos para a tomada de decisões na produção de bovinos e ovinos**. EVERLING, D.M. et al. (Eds) Santa Maria: UFSM, 2002. p.149-176.

SAUVANT, D. Modelling homeostatic and homeorhetic regulation in lactating animals. **Livestock Production Science**, v.39, n.1, p.105-113, 1994.

SILVA, F.F. et al. Abordagem Bayesiana da curva de lactação de cabras Saanen de primeira e segunda ordem de parto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.1, p.27-33, 2005.

SILVEIRA, V.C. A integração socio-bio-econômica através de modelos matemáticos: uma aplicação de estudo na região Sudoeste do Estado do Rio Grande do Sul. In: EVERLING, D.M. et al. (Eds). **Modelos para a tomada de decisões na produção de bovinos e ovinos**. Santa Maria: UFSM. 2002. p. 95-117

SOLIMAN, M. et al. Serum leptin levels during the periparturient period in cows. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.64, n.11, p.1053-1056, 2002.

SORIANO, F.D. et al. Milk production and composition, rumen fermentation parameters, and grazing behavior of dairy cows supplemented with different forms and amounts of Corn Grain. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.6, p.1520-1529, 2000.

SORDILLO, L. M.; STREICHER, K. L. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.7, n.2, p.135-146, 2002.

SPEARS, J. W. Mineral needs of dairy cattle. In: NORTH CAROLINE DAIRY NUTRITION MANAGEMENT CONFERENCE. Salisbury, NC: NCU Press, 2002. p. 75-80.

STEFANON, B. et al. Using artificial neural network to models the urinary excretion of total and purine derivative nitrogen fractions in cows. **Journal of Nutrition**, v.131, n.12, p.3307-3315, 2001.

SUTTON, J. D. Altering milk composition by feeding. **Journal of Dairy Science**, v.72, n.10, p.2801-2814, 1989.

SVENNERSTEN-SJAUNJA, K.; OLSSON, K. Endocrinology of milk production. **Domestic Animal Endocrinology**, v.29, n.2, p.241-258, 2005.

TRAN, C. L.; JOHNSON, C. L. Prediction of responses in milk constituents to changes in the nutrition of dairy cows. **Journal Dairy Research**, v.58, n.3, p.373-378, 1991.

TSENKOVA, R., et al. Near infrared spectroscopy for biomonitoring cow milk composition measurement in a spectral region from 1,100 to 2,400 nanometers. **Journal of Animal Science**, v.78, n.3, p.515-522, 2000.

UMPHREY, J.E. et al. Interrelationships in lactating Holsteins of rectal and skin temperatures, milk yield and composition, dry matter intake, body weight, and feed efficiency in summer in Alabama. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.11, p.2680-2685, 2000.

VAN SAUN, R.J. **Blood profiles as indicators of nutritional status**. Corvallis, Oregon: Department of Large Animal Clinical Sciences, 2000. 7 p.

VAN SOEST P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Salem, OR: O e B Books. 1994. 485p.

WASTRA, P.; JENNESS, R. **Química y física lactológica**. Zaragoza: Acribía, 1986. 423 p.

WITTWER, F. Empleo de los perfiles metabólicos en el diagnóstico de desbalances metabólicos nutricionales en el ganado. **Buiatria**, v.2, n.1, p.16-20, 1995.

WITTWER, F. Marcadores bioquímicos no controle de problemas metabólicos nutricionais em gado de leite. In: GONZÁLEZ, F.D. et al. (Eds). **Perfil metabólico em ruminantes**, Porto Alegre: UFRGS, 2000. p.53-62,

WOODWARD, S.J.R. Formulae for predicting animals' daily intake of pasture and grazing from bite weight and composition. **Livestock Production Science**, v.52, n.1, p.1-10, 1997.