

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ – *CAMPUS* UMUARAMA
PROGRAMA DE MESTRADO EM PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL E SAÚDE
ANIMAL

ANA CAROLINE CANDIA PALHANO

DETERMINAÇÃO DE VALORES DE INTERVALOS DE REFERÊNCIA PARA AS
VARIÁVEIS CLORETOS, SÓDIO, POTÁSSIO E CÁLCIO IÔNICO NO SORO
LÁCTEO DE FÊMEAS BOVINAS DURANTE AS FASES DE LACTAÇÃO

UMUARAMA

Agosto - 2023

ANA CAROLINE CANDIA PALHANO

**DETERMINAÇÃO DE VALORES DE INTERVALOS DE REFERÊNCIA PARA AS
VARIÁVEIS CLORETOS, SÓDIO, POTÁSSIO E CÁLCIO IÔNICO NO SORO
LÁCTEO DE FÊMEAS BOVINAS DURANTE AS FASES DE LACTAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal do Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Veterinária.

Área de concentração: Saúde Animal.
Orientador: Prof. Dr. André Marcos Santana.

UMUARAMA

2023

ANA CAROLINE CANDIA PALHANO

**DETERMINAÇÃO DE VALORES DE INTERVALOS DE REFERÊNCIA PARA AS
VARIÁVEIS CLORETOS, SÓDIO, POTÁSSIO E CÁLCIO IÔNICO NO SORO
LÁCTEO DE FÊMEAS BOVINAS DURANTE AS FASES DE LACTAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal do Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá – *Campus* Umuarama, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Veterinária.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Prof. Dr. André Marcos Santana (orientador)

Prof. Dra. Daniela Gomes da Silva (membro externo)

Prof. Dr. Carlos Eduardo Pereira dos Santos (membro externo)

UMUARAMA, 23 de agosto de 2023.

Eu dedico este trabalho ao meu esposo
Entony , minha filha Mackenzie, meus
meus pais e meu irmão.

Meu esposo que durante o mestrado me
apoiou e me encorajou a continuar ,
acreditando na minha capacidade .

Minha filha, que nasceu durante o mestrado
e me fez perceber o tamanho da minha força
como mãe e como mestranda, sendo meu
maior motivo para seguir em frente. Te amo
filha !

E meus pais e irmão, que mesmo distantes,
não soltaram minha mão e me ajudaram a
passar pelos momentos mais difíceis.

*“Qualquer sonho que se planta com fé, a
vida floresce com graça”*

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus por não permitir que eu desistisse, por me dar forças de onde eu não tinha e me fazer chegar onde cheguei. Por minhas próprias forças eu jamais conseguiria.

Agradeço ao meu esposo, que segue a vida comigo a tantos anos e, apesar dos desafios, nunca me abandonou, segurou minha mão e me ajudou a acreditar no meu potencial.

Agradeço minha filha, que mesmo sem imaginar, foi a pessoa que mais me motivou a ser forte. Mesmo tão pequena segurou a barra da minha ausência quando necessário. Perdemos noites, finais de semana... mas tenho a certeza que serei exemplo para ela, e através da minha força ela vai seguir o caminho dela com coragem e determinação. Obrigada filha por ser tão incrível!

Agradeço a minha mãe e meu irmão, pelas vídeos chamadas, pelas ligações, pelas mensagens e por tudo que fizeram para me fazer enxergar a força que tenho. Me abraçaram de longe, me seguraram no colo e me ampararam todas as vezes que precisei. Tenham a certeza que, sem vocês eu não chegaria aqui.

Agradeço meu pai, que me ajudou em absolutamente todos os processos desse trabalho, me ajudou a realizar as coletas, me deu força e conselhos valiosos que levarei para o resto da minha vida. O senhor é meu exemplo, obrigada por não me deixar desistir.

Agradeço as minhas amigas Jéssica Ortega, Carla Magalhães, Leila Tolomeotti e todas as outras que passaram comigo por esse processo. Mulheres incríveis, mães guerreiras que me ajudaram a me enxergar além da maternidade e seguir firme com esse projeto, me ajudando a chegar onde cheguei.

Agradeço minha banca de qualificação, Prof. Dr. Rodrigo Fartura e Prof. Dr. Jefferson Gandra, que aceitaram com gentileza participar desse processo e trouxeram pontos de grande importância para a melhoria da qualidade desse projeto.

Agradeço a equipe que me ajudou nas coletas e análises das amostras, sempre empenhados e com muita dedicação. Obrigada Gabriely, Fabio, Leidiane, Maria Clara e Victória, todo sucesso do mundo para vocês.

E por fim, agradeço de todo coração o meu orientador Prof. Dr. André Marcos Santana, por toda paciência, por toda dedicação em me ensinar. Não foi um processo fácil, mas tive a sorte e a honra de ser orientada por você. Obrigada por acreditar e não desistir de mim, tenho certeza que eu não chegaria tão longe se não tivesse sua ajuda.

RESUMO

A pecuária leiteira é uma atividade tradicional e detém forte impacto econômico no país e no mundo. No estado do Paraná, principalmente na Região Noroeste, o nível de produção é caracterizado como familiar, de menor escala e, é formado por diversidades tanto de raças, como tipos de manejo e gestão. O leite é um alimento complexo, formado por milhares de compostos que torna os produtos lácteos um dos pilares da dieta em diversos países. Além disso, é escasso na literatura trabalhos que definam Intervalos de Referência (IRs) para esses eletrólitos no leite. Com esse intuito, esse trabalho teve como objetivo avaliar a interferência das fases de lactação nas variáveis sódio (Na), potássio (K), cálcio iônico (Cai) e cloretos (Cl), posteriormente, gerar valores de referência para esses eletrólitos, no soro lácteo, levando-se em consideração os trimestres de lactação. O estudo foi realizado com vacas da raça Girolando, criadas em sistema de Compost Barns, em uma propriedade localizada em Marilena, região Noroeste do Paraná. Para o estudo foram utilizadas fêmeas saudáveis, ou seja, Caneca Telada do Fundo Escuro (CTFE) negativo, California Mastitis Test (CMT) negativo, Contagem de Células Somáticas (CCS) <200.000 células/mL e exame microbiológico negativo, que foram divididas em três grupos: G1- fêmeas sadias do 1º trimestre de lactação (1º ao 3º mês); G2 – fêmeas sadias do 2º trimestre de lactação (4º ao 6º mês) e G3 – fêmeas sadias do 3º trimestre de lactação (7º ao 9º mês). Antes do início da coleta, foi realizado exame físico geral e específico da glândula mamária das fêmeas selecionadas, posteriormente, realizado os testes de CTFE e CMT. Posteriormente, foi efetuada a antissepsia do teto com álcool 70% e algodão e em seguida realizada a coleta de leite. As amostras foram enviadas ao laboratório, onde foi obtido o soro lácteo e o mesmo foi congelado até a realização das análises do perfil bioquímico do soro lácteo. Assim sendo, os IRs foram determinados de acordo com as diretrizes da Sociedade Americana de Patologia Clínica Veterinária (ASVCP). Através da realização da primeira etapa do projeto, verificou-se que as fases de lactação interferiram nas concentrações de Na, K, Cai e Cl, sendo que, em relação ao Na observou-se menores concentrações no segundo trimestre de lactação; para o K observou-se diferenças estatísticas entre o primeiro e segundo trimestre; o Cai apresentou concentrações estatisticamente maiores no primeiro trimestre de lactação em relação ao segundo e terceiro trimestres e para o Cl observou-se que as concentrações foram estatisticamente maiores no G1 em relação aos grupos G2 e G3, sendo que os grupos G2 e G3 não diferiram entre si. Assim sendo, na segunda etapa do projeto, foi possível gerar valores de referência para todas as variáveis estudadas em cada fase de lactação. Esses dados reforçam a necessidade de mais estudos relacionados a geração de IRs no leite, uma vez que, é necessário que se entenda o que é fisiológico, para que dessa forma se compreenda melhor sobre as alterações na composição do leite e seus derivados, decorrentes de patologias da glândula mamária, como a mastite.

Palavras-chave: Eletrólitos, Bovinocultura Leiteira, Fisiologia da Lactação, Compostos do Leite, Curva de Lactação, Glândula Mamária.

ABSTRACT

Dairy farming is a traditional activity and has a strong economic impact on the country and the world. In the state of Paraná, mainly in the Northwest Region, the level of production is characterized as family, on a smaller scale and is made up of diversities in both breeds and types of handling and management. Milk is a complex food, made up of thousands of compounds that make dairy products one of the pillars of the diet in many countries. Furthermore, there is little work in the literature that defines Reference Intervals (RIs) for these electrolytes in milk. With this aim, this work aimed to evaluate the interference of the lactation phases on the variables sodium (Na), potassium (K), ionic calcium (Cai) and chlorides (Cl), subsequently generating reference values for these electrolytes, in the whey, taking into account the trimesters of lactation. The study was carried out with Girolando cows, raised in the Compost Barns system, on a property located in Marilena, Northwest region of Paraná. For the study, healthy females were used, that is, Negative Caneca Telada do Fundo Escuro (CTFE), negative California Mastitis Test (CMT), Somatic Cell Count (SCC) <200,000 cells/mL and negative microbiological examination, which were divided into three groups: G1- healthy females in the 1st trimester of lactation (1st to 3rd month); G2 – healthy females from the 2nd trimester of lactation (4th to 6th month) and G3 – healthy females from the 3rd trimester of lactation (7th to 9th month). Before collection began, a general and specific physical examination of the mammary glands of the selected females was carried out, followed by CTFE and CMT tests. Subsequently, the teat was antiseptised with 70% alcohol and cotton and then milk was collected. The samples were sent to the laboratory, where the whey was obtained and frozen until analyzes of the biochemical profile of the whey were carried out. Therefore, IRs were determined according to the American Society of Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) guidelines. By carrying out the first stage of the project, it was found that the lactation phases interfered with the concentrations of Na, K, Cai and Cl, and in relation to Na, lower concentrations were observed in the second trimester of lactation; for K, statistical differences were observed between the first and second trimester; Cai presented statistically higher concentrations in the first trimester of lactation in relation to the second and third trimesters and for Cl it was observed that the concentrations were statistically higher in G1 in relation to the G2 and G3 groups, with the G2 and G3 groups not differing each other. Therefore, in the second stage of the project, it was possible to generate reference values for all variables studied in each lactation phase. These data reinforce the need for more studies related to the generation of IRs in milk, since it is necessary to understand what is physiological, so that we can better understand the changes in the composition of milk and its derivatives, resulting from mammary gland pathologies, such as mastitis.

Keywords: Electrolytes, Dairy Cattle, Lactation Physiology, Milk Compounds, Lactation Curve, Mammary Gland.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
2 OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVO GERAL.....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3 HIPÓTESES DA PESQUISA	10
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
4.1 IMPORTÂNCIA DA BOVINOCULTURA LEITEIRA NACIONAL E PARANAENSE.....	11
4.2 O LEITE	12
4.3 ANATOMIA E FISILOGIA DA GLÂNDULA MAMÁRIA.....	13
4.4 FISILOGIA DA LACTAÇÃO	15
4.5 CURVA DE LACTAÇÃO	17
4.6 COMPOSTOS DO LEITE	17
4.7 ALTERAÇÕES NOS COMPOSTOS DO LEITE POR AFECÇÃO PATOLÓGICA DA GLÂNDULA MAMÁRIA (MASTITE)	19
4.8 IMPORTÂNCIA DE SE DETERMINAR VALORES DE REFERÊNCIA.....	20
5 MATERIAL E MÉTODOS	23
5.1 PRIMEIRA ETAPA: AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS FASES DE LACTAÇÃO, NO SORO LÁCTEO, NAS CONCENTRAÇÕES DE SÓDIO, POTÁSSIO, CÁLCIO IÔNICO E CLORETOS	23
5.1.1 Critérios de Inclusão dos Animais, Seleção da Propriedade de Coleta e Distribuição dos Grupos Experimentais.....	23
5.1.2 Coleta das Amostras de Leite	24
5.1.3 Transporte e Armazenamento das Amostras	26
5.1.4 Análises Laboratoriais	26
5.1.4.1 Cultivo bacteriológico do leite e identificação de bactérias	26
5.1.4.2 Análise do perfil bioquímico do soro lácteo.....	27
5.1.4.2.1 <i>Obtenção das amostras de soro lácteo</i>	27
5.1.4.2.2 <i>Análise do perfil bioquímico do soro lácteo: concentração de Na, K, Cai eCl</i>	27

5.1.4.3 Realização da Contagem de Células Somáticas (CCS).....	27
5.1.5 Análises Estatísticas	27
5.2 SEGUNDA ETAPA: CONSTITUIÇÃO DE VALORES DE REFERÊNCIA, NO SORO LÁCTEO, PARA CONCENTRAÇÕES DE SÓDIO, POTÁSSIO, CÁLCIO IÔNICO E CLORETOS, CONSIDERANDO AS FASES DE LACTAÇÃO	28
6 RESULTADOS	29
6.1 PRIMEIRA ETAPA: AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS FASES DE LACTAÇÃO, NO SORO LÁCTEO, PARA CONCENTRAÇÕES DE SÓDIO, POTÁSSIO, CÁLCIO IÔNICO E CLORETOS, CONSIDERANDO AS FASES DE LACTAÇÃO	29
6.1.1 Influência das Fases de Lactação nas Concentrações de Sódio (Na)	29
6.1.2 Influência das Fases de Lactação nas Concentrações de Potássio (K).....	30
6.1.3 Influência das Fases de Lactação nas Concentrações de Cálcio Iônico (Cai).....	31
6.1.4 Influência das Fases de Lactação nas Concentrações de Cloretos (Cl).....	32
6.2 SEGUNDA ETAPA: DETERMINAÇÃO DE VALORES DE REFERÊNCIA, NO SORO LÁCTEO, PARA CONCENTRAÇÕES DE SÓDIO, POTÁSSIO, CÁLCIO IÔNICO E CLORETOS, CONSIDERANDO AS FASES DE LACTAÇÃO	33
6.2.1 Intervalo de Referência para as Concentrações de Sódio (Na)	34
6.2.2 Intervalo de Referência para as Concentrações de Potássio (K)	36
6.2.3 Intervalo de Referência para as Concentrações de Cálcio Iônico (Cai)	36
6.2.4 Intervalo de Referência para as Concentrações de Cloretos (Cl)	37
7 DISCUSSÃO	38
7.1 CONCENTRAÇÕES DE SÓDIO (Na).....	39
7.1 CONCENTRAÇÕES DE POTÁSSIO (K)	40
7.3 CONCENTRAÇÕES DE CÁLCIO IÔNICO (Cai)	41
7.4 CONCENTRAÇÕES DE CLORETOS (Cl).....	41
8 CONCLUSÃO	44
9 REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a pecuária leiteira é uma atividade tradicional e detém forte impacto econômico, uma vez que, é meio de subsistência e fonte de fluxo de caixa durante todo o ano (GDP, 2017; SORIO, 2018; ROCHA *et al.*, 2020). Atualmente o país ocupa o 3º lugar no ranking mundial de produtores de leite, gerando uma renda superior a 68 milhões por ano (FAO, 2021; IBGE, 2021). O Paraná é o segundo estado brasileiro em produção, ficando atrás apenas de Minas Gerais. Os municípios paranaenses Castro e Carambeí são os maiores produtores nacionais (IBGE, 2021).

Uma característica do Paraná, em se tratando de produção, é sua heterogeneidade dentro das mesorregiões, marcada pelas diferenças em escala de produção (volume de leite), gestão, tamanho das propriedades e número de animais em produção, assim como as raças utilizadas. Essa característica faz com que dentro do mesmo estado se encontre regiões com produção média de 7,1 L de leite/vaca/dia e outras com 18,5 L de leite/vaca/dia. No geral, as mesorregiões Centro Leste, Oeste e Sudeste do estado são caracterizadas por produções em alta escala, enquanto que a região Noroeste e as demais restantes são caracterizadas por produções familiares, em menor escala (IPARDES, 2009).

O leite é um produto nutritivo e de grande complexidade. Possui milhares de compostos que podem ser avaliados tanto no leite total (integral) quanto no soro do leite (porção aquosa), proveniente da retirada principalmente de caseína durante o processo de dessora do leite (FONTANELI, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2013; GDP, 2017). Esses compostos sofrem diversas interferências e, dependendo de fatores como raça, localidade, tipo de manejo, alimentação, mastite e fases da lactação, eles podem se alterar.

Embora se tenha uma ciência geral dos constituintes presentes no soro lácteo, a dinâmica deles, levando em consideração principalmente as fases da lactação, ainda não é totalmente compreendida. Além disso, fatores como a mastite, são responsáveis por alterar a dinâmica fisiológica desses compostos, principalmente por causar danos em nível de glândula mamária, provocando um aumento de permeabilidade capilar e, conseqüentemente, extravasamento de compostos do leite para o sangue e vice-versa.

Apesar da importância, não foram encontrados trabalhos na literatura que definissem de forma melhor a composição do leite em decorrência das fases da lactação

bovina. Com isso, esse trabalho busca preencher essa lacuna na literatura, definindo valores de referência para os eletrólitos sódio (Na), potássio (K), Cálcio Iônico (Cai) e cloretos (Cl) em vacas mestiças girolando, localizadas no interior do Paraná, criadas em sistema de Compost Barn.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar valores de referência para os íons cloretos (Cl), sódio (Na), potássio (K) e cálcio iônico (Cai) no soro lácteo de vacas leiteiras da raça Girolando, híbridas, levando-se em consideração os trimestres de lactação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Avaliar a interferência das fases de lactação nas concentrações, no soro lácteo, destes íons;
- II. A partir dessas análises, instituir valores de referência para estes íons no leite em cada trimestre de lactação.

3 HIPÓTESES DA PESQUISA

H1: As fases da lactação interferem nas concentrações de íons cloretos (Cl), sódio (Na), potássio (K) e cálcio iônico (Cai) no soro lácteo de vacas leiteiras.

H2: A interferência das fases da lactação nas concentrações das variáveis estudadas pode ter como consequência uma interferência nos valores de referência de normalidade para cada variável, considerando os trimestres de lactação.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 IMPORTÂNCIA DA BOVINOCULTURA LEITERIA NACIONAL E PARANAENSE

A produção leiteira é uma das atividades mais importantes e tradicionais do Brasil. Teve início no século XVI, tendo maior notoriedade no final do século XX, quando passou de amparo às demais atividades econômicas para uma das principais (SORIO, 2018). O que torna a pecuária leiteira verdadeiramente relevante é sua capacidade de se transformar em meio de subsistência, sendo fonte de fluxo de caixa durante todo o ano, provendo as necessidades básicas das famílias (GDP, 2017). Devido ao fato de possuir um grande impacto econômico no país, a atividade leiteira no Brasil detém forte efeito na geração de emprego e renda, demonstrando a importância de um setor que vem passando por grande comutação ao longo das últimas duas décadas (ROCHA *et al.*, 2020).

Como fonte de nutrientes, os produtos lácteos são reconhecidos como um dos pilares básicos da dieta na maioria dos países (GDP, 2017). A proteína do leite é a mais eficiente entre as proteínas animais quando comparada com a produção por metro quadrado de proteína consumível por seres humanos. Possui quase o dobro da eficiência da carne de frango e rivaliza com a proteína do milho (IANNOTTI, 2018). Cerca de 1 bilhão de pessoas no mundo tem a produção de leite como meio de subsistência. Aproximadamente 10% da população mundial depende diretamente da pecuária leiteira. 816 milhões de toneladas de leite são produzidas anualmente pelo setor, sendo 44,44 litros a média do consumo por indivíduo mundialmente (GDP, 2017).

Atualmente, o Brasil ocupa o 3º lugar no ranking mundial de produtores de leite (FAO, 2021), ultrapassando uma produção de 35 bilhões de litros/ano, gerando uma movimentação financeira superior a 68 milhões de reais (IBGE, 2021). Minas Gerais, apesar da queda na produção, conforme o comparativo anual, continua na liderança em relação à produção de leite nacional, produzindo uma média de 9,6 bilhões de litros (27,2%), sendo o principal estado responsável pelo desempenho da região Sudeste. Os três subsequentes estados em produção de leite foram o Paraná, representando 12,5% da produção nacional, Rio Grande do Sul (12,4%) e Santa Catarina (9%). Em se falando em ranking municipal, dois municípios paranaenses lideraram esse ranking, sendo Castro em

1º lugar com 381,7 milhões de litros e Carambeí em 2º com 227,8 milhões de litros. Apesar disso, após os dois municípios paranaenses, sete dos dez principais municípios em produção de leite no Brasil são mineiros (IBGE, 2021). O Paraná possui uma heterogeneidade em seus sistemas de produção leiteira, marcada principalmente por variáveis de gestão de controle, escala de produção como volume de leite, número de animais e área de propriedade, tecnologia abrangendo desde a ordenha até resfriamento, assim como as raças utilizadas (BÁNKUTI; CALDAS, 2018). Em se tratando da alta heterogeneidade de escala de produção e produtividade, a produção entre as regiões do Paraná varia de 7,1 L de leite/vaca/dia a 18,5 L de leite/vaca/dia. Via de regra, os sistemas de produção leiteira mais modernos e com maior produtividade e qualidade do leite estão localizados ao sul do estado, nas mesorregiões Centro Leste, Oeste e Sudeste. A região noroeste, assim como as demais regiões restantes, são caracterizadas por uma produção mais familiar (IPARDES, 2009). São escassos os estudos que determinam as raças leiteiras de maior predominância no Paraná, em especial na Região Noroeste do estado, no entanto, nosso trabalho vai retratar sobre valores de referência em gado de raça Girolando, que é a de maior predominância na região.

4.2 O LEITE

Conforme o **art. 475 do Decreto 1.812 de 08 de fevereiro de 1996**, entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda (BRASIL, 1996). Em geral, o leite é composto por uma média de 100.000 tipos de moléculas diferentes, lhe conferindo um alto grau de complexidade (FONTANELI, 2001). Dessa forma, devido a sua diversidade de constituintes em meio aquoso, segundo Fontaneli (2001), o leite pode ser considerado: uma suspensão coloidal de partículas de caseína, ou seja, micelas de caseínas, ligadas ao cálcio e fósforo; emulsão de glóbulos de gordura e vitaminas lipossolúveis, encontradas em suspensão e, solução de lactose, proteínas solúveis em água, sais minerais e vitaminas. Quando se fala no soro lácteo, em relação ao leite total, a proporção dos componentes se altera devido ao processo de retirada dos compostos sólidos do leite, permanecendo apenas uma porcentagem dos compostos no soro lácteo

(ALMEIDA *et al.*, 2013).

De acordo com o **art. 5º da Instrução Normativa 76/77**, em vigor desde novembro de 2018, o leite cru refrigerado deve apresentar os seguintes parâmetros de composição: teor mínimo de gordura de 3,0g/100g; teor mínimo de proteína total de 2,9g/100g; teor mínimo de lactose anidra de 4,3g/100g; teor mínimo de sólidos não gordurosos de 8,4g/100g e teor mínimo de sólidos totais de 11,4g/100g (MAPA, 2018). Isso, considerando o leite total, no entanto, quando ocorre a obtenção do soro lácteo, essa constituição se altera, passando a ser 94,25% de água, 0,8% de proteínas do soro, 4,30% de lactose, 0,55% de minerais e 0,10% de gordura (OLIVEIRA 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Portanto, no soro lácteo é possível analisar minerais e íons tais como o cálcio total (Ca) e iônico (Cai), cloretos (Cl), ferro (Fe), magnésio (Mg), fósforo (P), sódio (Na) e potássio (K), além de enzimas (fosfatase alcalina – ALP; gamaglutamiltransferase - GGT), proteínas (proteínas de fase aguda e imunoglobulinas) e outros catabólitos, tais como a ureia.

4.3 ANATOMIA E FISIOLOGIA DA GLÂNDULA MAMÁRIA

A glândula mamária se origina do ectoderma embrionário (KLEIN, 2021) e o desenvolvimento reflete o crescimento corporal geral até a puberdade (DAHL, 2020). O estrogênio e a progesterona são os hormônios dominantes relacionados ao crescimento mamário, embora esteróides adrenais, somatotropina, prolactina e vários fatores de crescimento locais também desempenhem esses papéis (DAHL, 2020). O ectoderma é representado por espessamentos lineares paralelos na superfície ventral do abdome. A continuidade da crista formada é quebrada em um número propício de botões mamários, os quais darão origem as partes funcionais da glândula mamária (KLEIN, 2021).

As células secretoras de leite se desenvolvem via proliferação de células epiteliais, provenientes dos cordões mamários primários. Tais células epiteliais formam estruturas ocas, denominadas *alvéolos*, que são as unidades secretoras de leite fundamentais da glândula mamária. Ao mesmo tempo, uma grande área de epitélio se desenvolve na superfície, sendo essa a conexão externa para o sistema interno de secreção de leite, denominada de *teto* ou *mamilo*. Um sistema de ductos conecta os alvéolos ao mamilo, permitindo que dessa forma o leite saia da região de produção e armazenamento, para a

região de saída (região externa) (KLEIN, 2021).

As vacas apresentam uma região especializada para armazenamento do leite, denominada *cisterna*. As cisternas ficam localizadas na parte ventral da glândula mamária e é lá que desembocam todos os ductos principais. Essa estrutura permite que a vaca sintetize e armazene quantidades de leite. Apesar disso, é importante ressaltar que a maior parte do leite presente no momento da ordenha está armazenado no sistema de ductos da glândula mamária (KLEIN, 2021).

A glândula mamária da vaca possui quatro complexos mamários, cada um individualizado. Esses complexos se fundem em uma massa única, denominada úbere. O úbere se divide em quatro regiões denominadas quartos mamários, cada qual com sua abertura única. Um sulco intermamário mediano pronunciado delimita o úbere em metade direita e metade esquerda. O tecido conectivo entre os quartos mamários anteriores e posteriores de cada lado não é bem definido, no entanto, é extremamente importante que cada quarto mamário seja uma unidade separada, dessa forma, processos inflamatórios como a mastite ficam restritos por unidade, tendo uma menor tendência a se dissimular por todo úbere (KONIG; LIEBICH, 2021).

O úbere apresenta tamanho e aparência variada dependendo da raça, assim como da maturidade e do estágio funcional. No entanto, o tamanho não é parâmetro correto para determinação de escala de produção, apesar de que, certos aspectos de conformação têm importância no que diz respeito à ordenha. Forma, tamanho, posição dos tetos e formato da extremidade dos mamilos são fatores de especial importância, uma vez que, canais do teto abertos, por exemplo, predispõem a entrada de microrganismos e, conseqüentemente, infecções ascendentes. Em contrapartida, canais do teto estreitos podem acarretar em obstruções e/ou prejuízos no fluxo do leite. Para se alcançar a produtividade esperada para as vacas, é necessário que o úbere receba uma irrigação sanguínea significativa. Se estima que para a produção de 1 litro de leite secretado, seja necessários 600 litros de sangue (KONIG; LIEBICH, 2021).

Apesar do desenvolvimento da glândula mamária ter início prontamente com o começo da puberdade, ela permanece de forma subdesenvolvida até o momento da gestação (KLEIN, 2021). Com a gestação, o crescimento mamário acelera sob os efeitos sinérgicos de maiores concentrações circulantes de estrogênio e progesterona (DAHL, 2020). O desenvolvimento do úbere normalmente se torna evidente a partir da metade da

gestação e a secreção de leite geralmente se inicia durante o período final, onde ocorre um aumento na secreção da prolactina que resulta na formação do colostro. No momento final da gestação, a glândula mamária passa de uma estrutura composta principalmente de estroma (tecido conjuntivo) para uma estrutura repleta de células alveolares capazes de sintetizar e secretar o leite ativamente (KLEIN, 2021).

A inervação sensorial do teto e pele do teto é a parte que conduz informações do arco reflexo neuro-hormonal, responsável por iniciar e manter a lactação. A partir do momento que as glândulas mamárias são estimuladas pela sucção do teto ou pela massagem da pele, as fibras nervosas sensoriais carregam os impulsos até o sistema nervoso central. Esses impulsos provocam a produção de ocitocina no interior do hipotálamo e sua liberação na circulação sanguínea através da neuro-hipófise. A ocitocina provoca a contração de células mioepiteliais presentes nas paredes do conjunto de ductos inseridos nas glândulas mamárias, fazendo, dessa forma, com que o leite “desça”. Esse sistema pode ser antagonizado pela presença da adrenalina, hormônio secretado em condições de estresse (KONIG; LIEBICH, 2021).

4.4 FISIOLOGIA DA LACTAÇÃO

A lactação representa o processo que define os mamíferos como classe biológica. O desenvolvimento dos mamíferos após o nascimento depende, em grande parte, dos nutrientes e defesas fornecidos pela mãe através da secreção do colostro e do leite (imunoglobulinas). Dessa forma, assim que se conclui o desenvolvimento gestacional do feto, a glândula mamária passa a substituir, de certa forma, a função nutritiva e protetora da placenta durante a gestação (SILVA, 2020).

O processo de síntese e secreção do leite pela glândula mamária tem início no final da gestação, coincidindo com o desencadeamento do parto (SILVA, 2020). Após o parto, a produção e a secreção de leite só prosseguem através de estímulo nos complexos mamários, como a sucção do teto e/ou massagem do quarto mamário com a língua do neonato, ativando o arco reflexo neuro-hormonal (KONIG; LIEBICH, 2021).

A prolactina é fundamental na secreção do leite ou lactogênese. Ela é liberada em conjunto com a manipulação do teto ou por meio tanto da amamentação quanto do processo de ordenha. Os estímulos realizados são direcionados ao hipotálamo, dessa

forma, a síntese e liberação da dopamina (principal inibidor da secreção da prolactina) são bloqueadas, ao passo que, os neurônios no núcleo paraventricular são estimulados a produzir e liberar o peptídeo vasoativo intestinal, estimulador da liberação da prolactina. Um pico curto da prolactina ocorre por volta do início da retirada do leite e os valores de pico são atingidos geralmente 30 minutos após o estímulo inicial. A princípio não existe a necessidade dos picos principais de prolactina serem estimulados a cada hora para a manutenção da lactação, uma vez que, um intervalo de liberação de 12 horas (como ocorre em associação à ordenha das vacas leiteiras) é suficiente para manter a lactogênese. A medida que a lactação avança, a resposta da prolactina em função da quantidade de hormônio liberada após o estímulo da glândula mamária diminui (KLEIN, 2021).

Para que ocorra a liberação do leite pelos alvéolos e ductos é necessária a ação de células mioepiteliais presentes ao redor dos mesmos. Tais células são particularmente responsivas à ocitocina e, sendo assim, contraem-se quando expostas ao hormônio. A síntese e liberação da ocitocina pela hipófise posterior são estimuladas pelo arco reflexo neuro-hormonal, que envolve a estimulação do úbere pela amamentação e/ou a estimulação manual durante a higienização do úbere antes da ordenha. Esses estímulos sensoriais do úbere são direcionados através da medula espinhal para o hipotálamo. Os neurônios dos núcleos paraventricular e supraóptico são impulsionados a sintetizar a ocitocina e liberá-la dos terminais nervosos que passam sobre a eminência mediana. Outros estímulos sensoriais também podem acarretar na liberação de ocitocina, tais como o auditivo, o visual e o olfatório, que geralmente ocorrem próximo sala de ordenha (KLEIN, 2021).

É importante ressaltar que, os estímulos que liberam a ocitocina (hormônio que inicia a parte passiva da lactogênese) são diferentes dos estímulos que liberam a prolactina (hormônio que influencia diretamente a lactogênese). Qualquer estímulo sensorial que a vaca associe à ordenha possui o potencial de liberar a ocitocina. O reflexo neuro-hormonal é estimulado na intenção da retirada do leite devido ao ambiente (sala de ordenha) ao qual o animal está sendo exposto. A prolactina, no entanto, é liberada somente por meio de estímulos táteis do úbere. O que faz sentido, uma vez que, não há necessidade de estimular a síntese e liberação do leite se não houver evidência de retirada do leite (estimulação do úbere). O leite retirado durante a ordenha manual é retido no teto e forçado para fora, enquanto que o leite retirado mecanicamente se desloca por sucção

(KLEIN, 2021).

4.5 CURVA DE LACTAÇÃO

A produção de leite bovino pode ser descrita por uma curva de lactação, formada por equações que definem a produção de leite de acordo com os dias após o parto e a produção diária. Tais equações levam em consideração a produção de leite diária, a quantidade de dias após o parto, o nível de produção, a taxa de crescimento da produção até o pico de lactação e a taxa de declínio após o pico. Essas informações auxiliam no entendimento da produção geral do rebanho, assim como a produção individual por animal, auxiliando na implementação de estratégias para uma produção mais eficaz nas propriedades (LI *et al.*, 2022).

A curva de lactação tem como principal característica uma fase crescente, que se estende próximo de 35 dias após o parto, uma fase de pico, que é representada pela produção máxima observada, e uma terceira fase de declínio que se estende até o final da lactação. Porém, existem certas propriedades da curva de lactação que determinam sua forma, tais como a persistência e o pico da lactação (ALI; SCHAEFFER, 1987).

4.6 COMPOSTOS DO LEITE

Os principais constituintes do leite total incluem as proteínas (caseína, alfa-lactalbumina, albumina sérica e imunoglobulinas), açúcares (lactose), gorduras (especialmente na forma de triglicerídeos), vitaminas em geral, eletrólitos e minerais (Ca, K, P, Mg e Zn) e citratos (SILVA, 2020).

A síntese e a liberação do leite ocorrem através das células alveolares (KLEIN, 2021) e é resultado de uma combinação de aporte de nutrientes endógenos e exógenos. Portanto, tanto a mobilização de reservas orgânicas endógenas quanto a nutrição exógena são essenciais para suprir as demandas nutricionais e garantir a síntese adequada dos compostos do leite (FANTONELI, 2001).

As células alveolares sintetizam a gordura, proteínas e carboidratos e direcionam o produto para dentro da luz dos alvéolos. Inicialmente as gotas de gordura se acumulam no citoplasma basal da célula e então se deslocam para o ápice, onde se conduzem para o

lúmen alveolar. A membrana da célula se fecha na base da gota de gordura, então a gordura se dispersa no leite em pequenos glóbulos, envolvidos pela membrana celular; o glóbulo normalmente contém porções de citoplasma celular (KLEIN, 2021).

As proteínas do leite são sintetizadas no retículo endoplasmático. As moléculas de caseína passam para o aparelho de Golgi e lá são fosforiladas e organizadas em micelas dentro das vesículas de Golgi. A lactose também é sintetizada dentro das vesículas de Golgi e é liberada adjunta com as proteínas do leite. O processo de liberação das proteínas e dos carboidratos é diferente da gordura. No caso, as vesículas de Golgi se unem à membrana da célula, e a liberação das proteínas e dos carboidratos ocorre por exocitose. Ainda não se sabe ao certo com que frequência as células passam pelos ciclos de síntese e liberação de compostos, no entanto, estes podem ocorrer duas vezes por dia, principalmente nas vacas leiteiras que possuem duas ordenhas diárias (KLEIN, 2021).

Durante a lactação, o leite sofre uma variação considerável em sua composição. Alguns estudos demonstram que o teor de gordura no leite total tende a ser maior no final da lactação do que no começo, acontecendo o mesmo com o teor de proteínas (GONZÁLEZ *et al.*, 2001). Dias *et al.* (2017) observaram que a concentração de extrato seco desengordurado (ESD), que representa a porção sólida do leite, com exceção da gordura, foi maior em vacas no início da lactação. Observaram também que o teor de caseína (proteína em maior quantidade no leite total) se apresentou maior nos animais de final de lactação e que, valores de ureia, se apresentavam maiores a partir do 90º dia de lactação, comprovando a alteração fisiológica dos compostos ao longo da lactação. Outro composto que sabidamente sofre alteração é a lactoferrina, proteína de defesa que tem a tendência de ter uma maior concentração no final de lactação, quando inicia a involução da glândula mamária (NORO, 2001).

Em relação ao soro lácteo, o mesmo se trata da parte líquida remanescente após a coagulação do leite. Sua composição difere da do leite total, principalmente porque a maior parte da caseína é removida durante o processo de coagulação. Geralmente contém os seguintes componentes: água, lactose, proteínas solúveis, sais minerais e gordura. Em relação aos sólidos totais do soro lácteo, aproximadamente 70% são compostos por lactose e 20% são constituídos pelas proteínas solúveis. Essas proporções podem variar dependendo do processamento do soro lácteo (RÉVILLION *et al.*, 2000; OLIVEIRA, 2009; ZIEGLER; SGARBIERI, 2009). A dinâmica e as interações específicas dos

componentes do soro lácteo ainda são áreas de estudo em constante desenvolvimento. Embora haja uma compreensão geral dos constituintes presentes no soro lácteo, as interações entre esses componentes e os mecanismos subjacentes ainda não são completamente compreendidos.

4.7 ALTERAÇÕES NOS COMPOSTOS DO LEITE POR AFECÇÃO PATOLÓGICA DA GLÂNDULA MAMÁRIA (MASTITE)

Como resultado da resposta inflamatória, durante a mastite são observadas intensas mudanças nas concentrações tanto dos principais componentes (proteína, gordura e lactose) quanto dos componentes encontrados em menores níveis no leite (minerais e enzimas). Estas mudanças ocorrem devido à redução na secreção de componentes do leite que são sintetizados na glândula mamária e também decorrente do aumento de permeabilidade capilar (SILVA *et al.*, 2000).

Em animais com mastite ocorre aumento na concentração de proteínas de origem sanguínea durante a inflamação, com concomitante redução na concentração de caseína do leite, resultando, assim, em alterações mínimas na concentração de proteína total no leite. No leite com altas CCS ocorrem aumentos na concentração de albumina sérica e na concentração de imunoglobulinas nos quartos afetados (FONSECA; SANTOS, 2001). Paralelamente ao aumento na concentração de proteínas séricas, ocorre diminuição na concentração de caseína do leite com altas CCS. Esse fenômeno ocorre principalmente devido à degradação da caseína pelas proteases de origem bacteriana, dos leucócitos e do sangue. Adicionalmente, a redução na concentração de caseína do leite com altas CCS pode, em parte, ser explicada pela redução da capacidade de síntese e secreção de caseína devido ao dano causado no epitélio secretor por toxinas bacterianas (FONSECA; SANTOS, 2001).

Sobre as enzimas GGT e ALP, poucos estudos foram realizados, no entanto, Pozzatti *et al.* (2016) encontraram evidências de que em quadros de mastite, onde há alta contagem de células somáticas, ocorre elevação da concentração de fosfatase alcalina e de gamaglutamiltransferase no leite.

O potássio, que é o mineral mais abundante no leite, sofre diminuição da sua concentração devido a sua passagem do leite para o sangue através do epitélio lesionado.

De maneira inversa, a concentração do sódio e os cloretos encontram-se aumentados, uma vez que as concentrações no sangue são normalmente maiores que as do leite (AULDIST *et al.*, 1995; FONSECA; SANTOS, 2001). Com relação à concentração total de cálcio, pode ocorrer diminuição na concentração desse mineral no leite com altas CCS, uma vez que nessa situação há redução da síntese de caseína, estando a maioria do cálcio do leite incorporado em micelas desta (NEVILLE; WATTERS, 1983; FONSECA; SANTOS, 2001).

As perdas de leite associadas a uma alta CCS em vacas são uma consequência da resposta inflamatória da glândula mamária bovina contra a injúria causada por patógenos que são os causadores da mastite (HORTET; SEEGERS, 1998; SEEGERS *et al.*, 2003). As alterações de concentrações de componentes do soro lácteo, como íons K, Na, Cl, decorrentes da mastite subclínica (FONSECA; SANTOS, 2001), podem ser detectadas no soro lácteo. No entanto, para isto, é necessário utilizar como base valores de referência confiáveis. Neste sentido, os compostos do leite se alteram de forma fisiológica durante as fases de lactação, como demonstrado por PIZAURO *et al.* (2014) e, portanto, são necessários valores de referência bem definidos para cada trimestre de lactação, para que seja possível, através da comparação de resultados com vacas com mastite, definir de forma eficaz um diagnóstico para a patologia, sendo uma nova opção de diagnóstico para os clínicos.

4.8 IMPORTÂNCIA DE SE DETERMINAR VALORES DE REFERÊNCIA

Um problema recorrente de laboratórios de diagnóstico veterinário é o estabelecimento de valores de referência para uma determinada característica. Esse intervalo de referência nada mais é que uma faixa de valores prováveis dessa característica em animais considerados saudáveis. Valores fora deste intervalo são sugestivos de alterações da saúde, ou seja, se assume que, se os animais são saudáveis, seus valores de referência relacionados a uma determinada variável terão uma forma de distribuição, enquanto que, os valores de animais não saudáveis terão uma distribuição diferente (LUMSDEN; MULLEN, 1978).

O estabelecimento de valores de referência é uma função muitas vezes subestimada. Os resultados obtidos em laboratório e, os valores de referência com os

quais vão ser comparados, dependem de uma infinidade de fatores relacionados à natureza e criação, tais como raça, idade, sexo, dieta, peso corporal, gestação, uso de medicamentos, sazonalidade, estado reprodutivo, forma da coleta das amostras, manuseio e armazenamento de amostras e a metodologia utilizada (BLANKESTEIN, 2015). Tanto na medicina humana, quanto na medicina veterinária, uma questão adicional é a incerteza do estado de saúde do grupo ou indivíduo de referência, uma vez que, as definições de “aparentemente saudável” ou “autodeclarado saudável” deixam espaço para uma interpretação mais ampla do que o desejado. Embora, em muitos casos, a saúde do grupo de referência seja ainda comprovada pela demonstração de que os resultados de outros exames laboratoriais, por exemplo, aqueles que refletem doenças da tireoide, fígado ou rins, são normais, a saúde de um indivíduo designado para o grupo de controle pode muitas vezes não ser estabelecido com certeza (BLANKESTEIN, 2015; WHITEHEAD *et al.*, 2015).

A determinação de valores de referência ocorre estreitamente na intenção de se distinguir através dos resultados obtidos, o status de saúde ou doença. Para que isso ocorra, é necessário comparar os resultados obtidos de testes realizados no indivíduo do qual deseja se descobrir o status da característica em questão, com os valores reconhecidos como valores de referência. No entanto, a principal dificuldade em se obter um valor de referência é a variação biológica e fisiológica existente das concentrações dos constituintes regulados por processos homeostáticos no corpo. Isso acarreta dificuldades na determinação de intervalos de referência adequados para numerosos parâmetros de diagnóstico (AARSAND *et al.*, 2018).

Na medicina humana onde apenas uma espécie está envolvida, a determinação de valores de referência está em estágio de desenvolvimento em diversos setores e especializações. Na medicina veterinária ocorre uma maior dificuldade, principalmente devido às diversas espécies e raças (LUMSDEN; MULLEN, 1978). Em se tratando da bovinocultura leiteira brasileira, assim como as regiões são diversas em suas sazonalidades, os tipos de manejo e as raças utilizadas para produção de leite são totalmente heterogêneas. As raças geralmente são escolhidas dependendo da sua capacidade de se adaptar à região de destino e o nível de produção. No Brasil, elas são basicamente divididas em dois grandes grupos, os zebuínos e os taurinos/europeus, sendo os zebuínos caracterizados por uma maior rusticidade, capacidade de adaptação e produção moderada,

enquanto que os taurinos se destacam no nível de produção, porém deixam a desejar na resistência ao ambiente e seus desafios. O Paraná, estado de destaque em produção de leite, é caracterizado por sua heterogeneidade de produção, no entanto, por ser um estado de clima considerado temperado, é capaz de alojar com qualidade bovinos de origem taurina, onde conseguem se desenvolver sem grandes desafios. A raça taurina de maior predominância na produção leiteira brasileira e paranaense é a Holandesa, enquanto que a zebuína é a Gir. Na busca de animais de maior produção e resistência, é comum o cruzamento entre essas raças, que dão origem aos Girolandos, animais com nível de produção considerável e ao mesmo tempo rusticidade ao ambiente.

Essa heterogeneidade não se reflete só na questão do nível de produção e rusticidade. Em se tratando de exames laboratoriais e IRs, esses são fatores que provocam alterações, assim como o tipo de manejo e alimentação, uma vez que, dependendo da dieta (assim como os seres humanos), o animal vai apresentar em suas análises do leite ou sangue, resultados naturais para cada tipo de criação no qual está inserido e, caso seja comparado com animais de outras regiões e raças, vão dar divergências de valores, podendo acarretar em erro de interpretação. E isso é uma das questões de maior dificuldade para se estabelecer IRs, uma vez que existe diversas raças e tipos de criação. Levando em consideração essa heterogeneidade, é necessário que se estabeleça valores de referência para cada categoria de animais, uma vez que, a confiabilidade diminui quando se utiliza IRs de uma raça para outra, de uma certa idade para outra, de animais com uma determinada dieta para outra e animais em diferentes fases de lactação, pois o risco de estar cometendo um erro de interpretação é considerável, uma vez que não são animais do mesmo grupo.

Portanto, apesar da dificuldade, o estabelecimento desses valores de referência nas espécies e categorias dentro dessas espécies se faz necessário. Na bovinocultura leiteira, é escasso e quase inexistente trabalhos referentes a determinações de valores de referências para compostos do leite total e soro lácteo, em especial, levando em consideração as fases da lactação bovina. Pensando nesse intuito, o trabalho busca determinar valores de referência de íons e minerais (Na, K, Ca, e Cl), em um grupo de fêmeas bovinas da raça Girolando, da Região Noroeste do estado do Paraná, servindo como um impulso para novos estudos nessa área.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 PRIMEIRA ETAPA: AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS FASES DE LACTAÇÃO, NO SORO LÁCTEO, NAS CONCENTRAÇÕES DE SÓDIO, POTÁSSIO, CÁLCIO IÔNICO E CLORETOS

5.1.1 Critérios de Inclusão dos Animais, Seleção da Propriedade de Coleta e Distribuição dos Grupos Experimentais

Inicialmente, foram selecionadas fêmeas bovinas seguidos os critérios relatados abaixo:

- 1º) Fêmeas bovinas que possuíam as quatro glândulas mamárias.
- 2º) Fêmeas bovinas até no máximo cinco crias.
- 3º) Fêmeas bovinas entre 15 e 305 dias de lactação.

As coletas das amostras de leite foram realizadas em vacas da raça Girolando, raça de eleição na propriedade de escolha. Tal raça é caracterizada pela excelente capacidade de regulação de temperatura corporal, hábito de pastejo e capacidade ruminal, fatores esses que lhe atribuem grande resistência e adequação aos diversos tipos de ambiente (RUAS, 2004). A dieta destinada aos animais no período da coleta consistia em farelo de arroz, milho moído, silagem de milho, farelo de soja, BOVIGOLD® CRINA® e pré-secado de tifton (*Cynodon spp.*). Além disso, antes das coletas, foi averiguado a data dos partos ou dias em lactação (DEL), data da secagem das vacas selecionadas, número de animais em lactação e produção mensal dos animais.

A propriedade selecionada era localizada no município de Marilena, situada na Região Noroeste do Estado do Paraná, possuindo um sistema de instalação de Compost Barn, que consiste em um extenso espaço físico, revestido de serragem ou palha de arroz, destinado ao descanso das vacas, sendo um local confortável e seco durante o ano (GUIMARÃES, 2018). Essa região é caracterizada por verões quentes (média de 27°C) e invernos mais amenos (média de 15°C a 20°C) e índices pluviométricos em maior concentração no verão e consideravelmente seco no inverno (NITSCHKE *et al.*, 2019).

Para ser incluída na pesquisa, a propriedade precisou seguir os seguintes critérios: realizar a medição da quantidade de leite produzida por animal diariamente; possuir medidor manual ou eletrônico; fazer ao menos duas ordenhas por dia e possuir Contagem de Células Somáticas (CCS) abaixo de 500.000 (IN76/77) no tanque nos últimos três meses, sendo essa última informação, obtida através de relatório enviado ao produtor pelo laticínio de destino.

As coletas foram realizadas mensalmente ao longo de uma lactação completa (305 dias). Antes da coleta, foram realizadas exame físico geral e da glândula mamária, teste da caneca telada do fundo escuro (CTFE) e o teste California Mastitis Test (CMT). Assim sendo, foram coletadas amostras de leite somente de fêmeas que não apresentaram alterações no exame clínico e na glândula mamária, assim como resultados negativos para o teste da CTFE e CMT. As amostras coletadas foram posteriormente enviadas para realização da contagem de células somáticas (CCS) e para análise microbiológica, sendo que apenas as amostras com $CCS < 200.000$ células/mL e negativas para o exame microbiológico foram incluídas no estudo. Assim, após a realização de todos estes processos, as amostras foram divididas em três grupos experimentais sendo eles:

Grupo 1 (G1): Amostras de leite de quartos mamários de fêmeas sadias (CTFE negativo, CMT negativo, $CCS < 200.00$ células/mL e exame microbiológico negativo) do primeiro trimestre de lactação (1° ao 3° o mês de lactação)

Grupo 2 (G2): Amostras de leite de quartos mamários de fêmeas sadias (CTFE negativo, CMT negativo, $CCS < 200.00$ células/mL e exame microbiológico negativo) do segundo trimestre de lactação (4° ao 6° o mês de lactação)

Grupo 3 (G3): Amostras de leite de quartos mamários de fêmeas sadias (CTFE negativo, CMT negativo, $CCS < 200.00$ células/mL e exame microbiológico negativo) do terceiro trimestre de lactação (7° ao 9° o mês de lactação).

5.1.2 Coleta das Amostras de Leite

As coletas seguiram a seguinte cronologia abaixo:

1. Exame físico do animal: As fêmeas bovinas foram avaliadas quanto ao seu estado físico, devendo as mesmas se apresentarem saudáveis, ou seja, sem alterações

aparentes ao exame físico, com escore corporal adequado e com temperatura retal dentro da normalidade.

2. Exame físico dos quartos mamários: inicialmente realizou-se a avaliação da pele do úbere e tetos, observando a ocorrência de lesões como úlceras, descamações, papilomas ou fístulas, assim como alterações na coloração como congestão e cianose. Posteriormente foi avaliado o úbere como um todo, verificando a presença de alterações de dimensão (aumento/diminuição, generalizado/localizado) e de formato (inserção, profundidade, assimetria ou relaxamento de ligamentos). Nas avaliações foram consideradas a integridade dos quatro quartos mamários, a ocorrência de tetos supranumerários e suas extremidades. As inspeções e avaliações em geral, foram realizadas por meio de palpação dos tetos e do úbere, avaliando cada unidade para aferir consistência, temperatura e sensibilidade. Foi observado também a provável ocorrência de nódulos no parênquima glandular e realizada a tração da pele do úbere para verificar a presença de edema.

3. Teste da caneca telada de fundo escuro (CTFE): através dos três primeiros jatos de leite de cada quarto mamário foram verificadas a presença de grumos, coágulos e/ou pus, o que conseqüentemente caracteriza a presença de mastite clínica.

4. California Mastitis Test (CMT): A realização do teste depende da adição de detergente aniônico (alquil- aril-sulfonato de sódio) ao leite, no qual a reação formada resulta no rompimento da membrana de leucócitos, aumentando a viscosidade. Portanto, após a realização do teste da caneca telada de fundo escuro, foi coletado 1 mL de leite de cada teto em recipiente próprio (raquete) para a análise e posteriormente adicionado 1 mL de reagente, gerando 2 mL de amostra por recipiente na raquete. Para eficaz reação, foram realizados movimentos circulares e inclinação da raquete, para assim ser possível visualizar a viscosidade. A interpretação dos resultados foi dividida em amostras negativas e positivas (+, ++ e +++).

5. Antissepsia dos quartos mamários: foi realizada por meio de pré-dipping e subsequentemente secagem com papel toalha e limpeza da extremidade do teto e esfínter com algodão embebido em álcool 70%. Ao final da antissepsia, foi dispensado um jato de leite e posteriormente coletada uma amostra para microbiologia (tubo falcon estéril).

6. Posteriormente, coletou-se amostras de 15 mL de leite em tubo falcon para a análise do perfil bioquímico sérico do soro lácteo e outros 30 mL de leite em frascos próprios, com conservante, para envio e realização da CCS.

5.1.3 Transporte e Armazenamento das Amostras

As amostras coletadas foram armazenadas em caixa térmica contendo gelo reciclável, em temperatura média de 5 a 7°C.

As amostras para realização dos exames microbiológicos e do perfil bioquímico do soro lácteo foram direcionadas ao Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Medicina Veterinária, UEM/Campus Regional de Umuarama, onde foram congeladas a -20°C até o momento da realização das análises (para a realização do exame microbiológico) e dessoradas e o soro lácteo congelado a -20°C até o momento da realização das análises (para a realização do perfil bioquímico do soro lácteo).

As amostras para análise da CCS foram imediatamente enviadas ao Laboratório de Fisiologia da Lactação “Lair Antônio de Souza” (LAFLA), da Clínica do Leite, no Departamento de Produção Animal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - USP/Piracicaba, SP, para realização da contagem de células somáticas (CCS).

5.1.4 Análises Laboratoriais

5.1.4.1 Cultivo bacteriológico do leite e identificação de bactérias

O leite coletado de forma asséptica de cada quarto mamário (1 mL), visando o cultivo bacteriológico e a identificação qualitativa das bactérias, foi semeado nos meios de ágar sangue bovino desfibrinado 5% e ágar MacConkey, e mantidos a 37°C, em condições de aerobiose, com leituras diárias durante 72 horas. Os microrganismos foram identificados segundo as características morfo-tintoriais, bioquímicas e de cultivo.

5.1.4.2 Análise do Perfil Bioquímico do Soro Lácteo

5.1.4.2.1 Obtenção das amostras de soro lácteo

Para obtenção do soro, foi necessário realizar a coagulação do leite através da adição de renina (Coalho Estrella, Chr. Hansen Brasil Ind. e Com. Ltda, Valinhos, São Paulo, Brasil), utilizando a técnica descrita por SANT'ANA & BIRGEL (2003). Após adicionar a renina, as amostras foram submetidas a banho-maria a 37°C durante 20 minutos e, em seguida, foram centrifugadas durante 10 minutos a 4.500rpm. O soro lácteo obtido foi congelado até a realização das análises.

5.1.4.2.2 Análise do perfil bioquímico do soro lácteo: concentração de Na, K, Cai e Cl

A concentração dos íons foi obtida através de análise no soro lácteo. As leituras das amostras foram executadas em espectrofotômetro semiautomático (Labquest, Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil), com luz de comprimento de onda apropriado para cada teste. Foram definidas quatro variáveis, sendo elas: cálcio ionizado (Cai), sódio (Na) e potássio (K), analisados pelo método de íons seletivos, em analisador automático (9180 ElectrolyteAnalyzer, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) e os cloretos (Cl), utilizando o kit reagente comercial da marca Labtest.

5.1.4.3 Realização da Contagem de Células Somáticas (CCS)

A contagem de células somáticas será realizada pelo método automático com contador eletrônico infravermelho. Este aparelho emprega citometria de fluxo com laser para determinar o conteúdo de células somáticas na amostra de leite.

5.1.5 Análises estatísticas

As variáveis foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey para comparação entre pares de médias, ao nível de 5% de significância. As análises estatísticas foram efetuadas com auxílio de um programa estatístico computadorizado (Graphpad Prism Versão 9.1).

5.2 SEGUNDA ETAPA: CONSTITUIÇÃO DE VALORES DE REFERÊNCIA, NO SORO LÁCTEO, PARA CONCENTRAÇÕES DE SÓDIO, POTÁSSIO, CÁLCIO IÔNICO E CLORETOS, CONSIDERANDO AS FASES DE LACTAÇÃO

A partir dos dados avaliados na etapa 1, foram gerados os valores de referência para teores de cloretos, sódio, potássio e cálcio iônico, nos trimestres de lactação. Para isso, foi utilizado programa estatístico específico para cálculo destes valores. Assim sendo, os IRs foram determinados de acordo com as diretrizes da Sociedade Americana de Patologia Clínica Veterinária (ASVCP) (FRIEDRICHS *et al.*, 2012). O teste de Anderson-Darling foi utilizado para avaliar a normalidade da distribuição com $p < 0,05$ e o teste de Dixon e de Tukey ($3 \times \text{IQR}$, $1,5 \times \text{IQR}$) foram utilizados para identificar “outliers” (Reference Value Advisor - RVA) (GEFFRÉ *et al.*, 2011). Os limites inferior e superior do IR e IC 90% foram determinados utilizando dados não transformados se a distribuição dos dados foi normal (Gaussiana) ou simétrica mais não Gaussiana. Quando a distribuição não foi simétrica, realizou-se transformação Box-Cox para normalizar os dados.

Após realização das análises estatísticas, foi disposto em tabelas, para cada parâmetro estudado, os resultados da estatística descritiva (média, desvio padrão, mediana, valores mínimos e máximos) e os valores de intervalo de referência (limite inferior com 90% de intervalo de confiança; limite superior com 90% de intervalo de confiança).

6 RESULTADOS

6.1 PRIMEIRA ETAPA: AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS FASES DE LACTAÇÃO, NO SORO LÁCTEO, PARA CONCENTRAÇÕES DE SÓDIO, POTÁSSIO, CÁLCIO IÔNICO E CLORETOS, CONSIDERANDO AS FASES DE LACTAÇÃO

Inicialmente, foram coletadas 924 amostras, de 231 vacas da raça Girolando. No entanto, após a exclusão de animais e de amostras, seguindo os critérios expostos na sessão materiais e métodos, foram incluídas 280 amostras de leite (soro lácteo) no experimento (quantidade geral), sendo 64 amostras no G1, 46 amostras no G2 e 170 amostras no G3.

6.1.1. Influência das Fases de Lactação nas Concentrações de Sódio (Na)

Em relação ao teor de Na, observou-se menores concentrações no segundo trimestre de lactação (G2), quando comparado com o G1 e G3, fazendo com que esse período da lactação se diferenciasse estatisticamente dos demais períodos, como observado na **Tabela 1** e **Figura 1**.

Tabela 1 – Comparação do perfil bioquímico da concentração de Sódio (Na) de amostras de soro lácteo provenientes de quartos mamários de vacas Girolando, hígdas, coletadas no primeiro (G1), segundo (G2) e terceiro (G3) trimestres de lactação.

<i>VARIÁVEL</i>	<i>UNIDADE</i>	<i>GRUPOS</i>	<i>MÉDIA</i>	<i>DESVIO PADRÃO</i>	<i>VALOR MÍNIMO</i>	<i>VALOR MÁXIMO</i>
<i>Na</i>	mEq/L	G1	165 A	33,0	120	276
		G2	141 B	27,0	76,0	165
		G3	160 A	16,0	129	189

Siglas: mEq/L (milequivalente/litro).

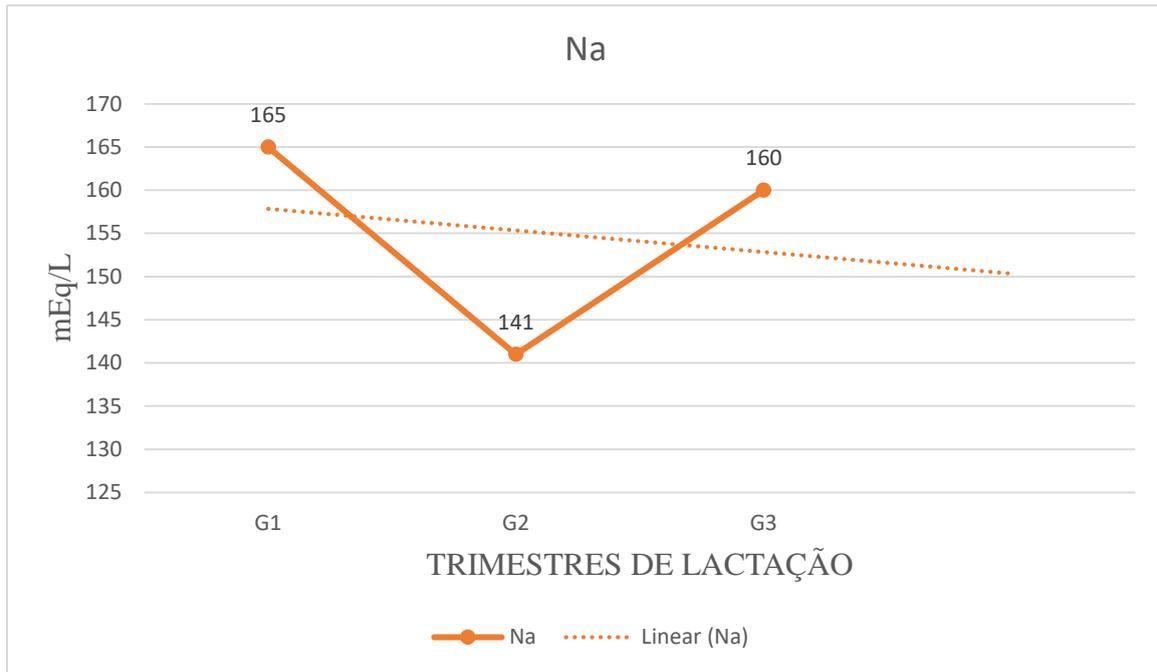


Figura 1 – Representação gráfica da dinâmica da concentração de Sódio (Na) no soro lácteo de amostras provenientes de quartos mamários de vacas Girolando, hígidas, coletadas no primeiro (G1), segundo (G2) e terceiro (G3) trimestres de lactação. Siglas: mEq/L (milequivalente/litro).

6.1.2. Influência das Fases de Lactação nas Concentrações de Potássio (K)

De forma diferente, para o teor de K observou-se diferenças estatísticas entre o primeiro e segundo trimestre (G1xG2). No entanto, é possível observar que suas concentrações se reduziram no início e no final da lactação (G1xG3), enquanto que no segundo trimestre (G2) houve um aumento (**Tabela 2 e Figura 2**).

Tabela 2 – Comparação do perfil bioquímico da concentração de Potássio (K) de amostras de soro lácteo provenientes de quartos mamários de vacas Girolando, hígidas, coletadas no primeiro (G1), segundo (G2) e terceiro (G3) trimestres de lactação.

VARIÁVEL	UNIDADE	GRUPOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
K	mEq/L	G1	34,0 A	4,40	25,8	42,0
		G2	38,0 B	3,40	31,8	43,8
		G3	35,0 AB	6,00	20,7	46,8

Siglas: mEq/L (milequivalente/litro).

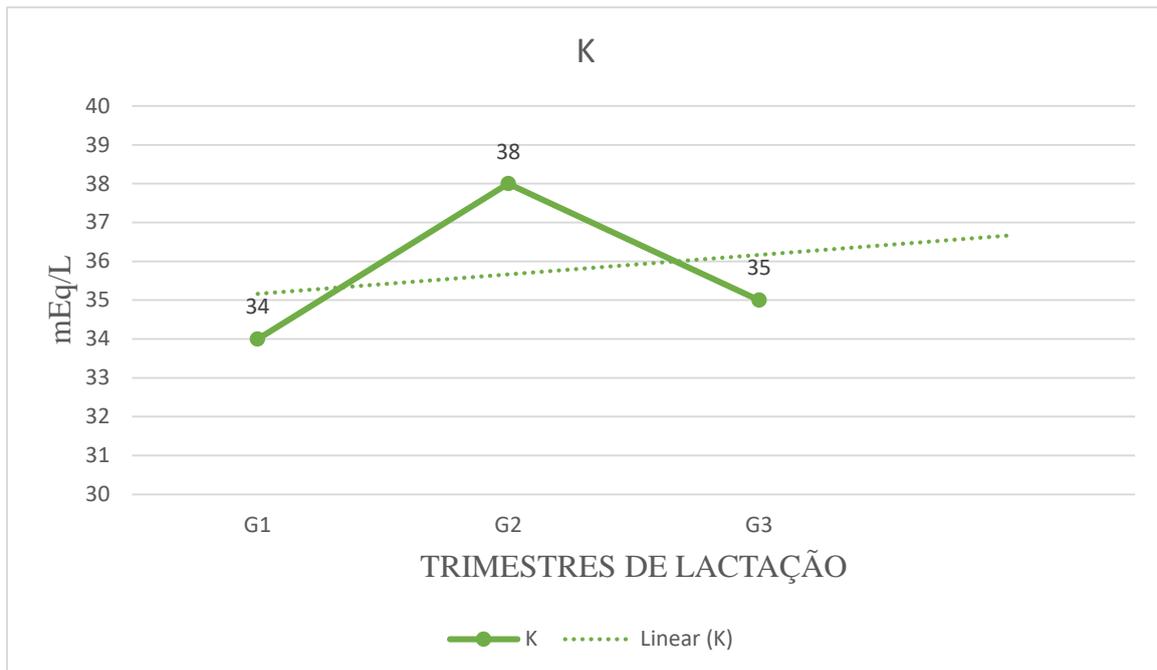


Figura 2 – Representação gráfica da dinâmica da concentração de Potássio (K) no soro lácteo de amostras provenientes de quartos mamários de vacas Girolando, hígidas, coletadas no primeiro (G1), segundo (G2) e terceiro (G3) trimestres de lactação. Siglas: mEq/L (milequivalente/litro).

6.1.3. Influência das Fases de Lactação nas Concentrações de Cálcio Iônico (Cai)

O Cai apresentou concentrações estatisticamente maiores no primeiro trimestre de lactação em relação ao segundo (G2) e terceiro trimestres (G3). Já o G2 e G3 evidenciaram resultados semelhantes (**Tabela 3** e **Figura 3**). Avaliando a **Figura 3**, a linha de tendência nos mostra que as concentrações tendem a diminuir do primeiro trimestre de lactação para o segundo e terceiro trimestres.

Tabela 3 – Comparação do perfil bioquímico da concentração de Cálcio Iônico (Cai) de amostras de soro lácteo provenientes de quartos mamários de vacas Girolando, hígidas, coletadas no primeiro (G1), segundo (G2) e terceiro (G3) trimestres de lactação.

VARIÁVEL	UNIDADE	GRUPOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
Cai	mEq/L	G1	3,70 A	0,71	2,34	4,80
		G2	3,10 B	0,72	2,01	4,05
		G3	3,10 B	0,85	1,68	5,16

Siglas: mEq/L (milequivalente/litro).

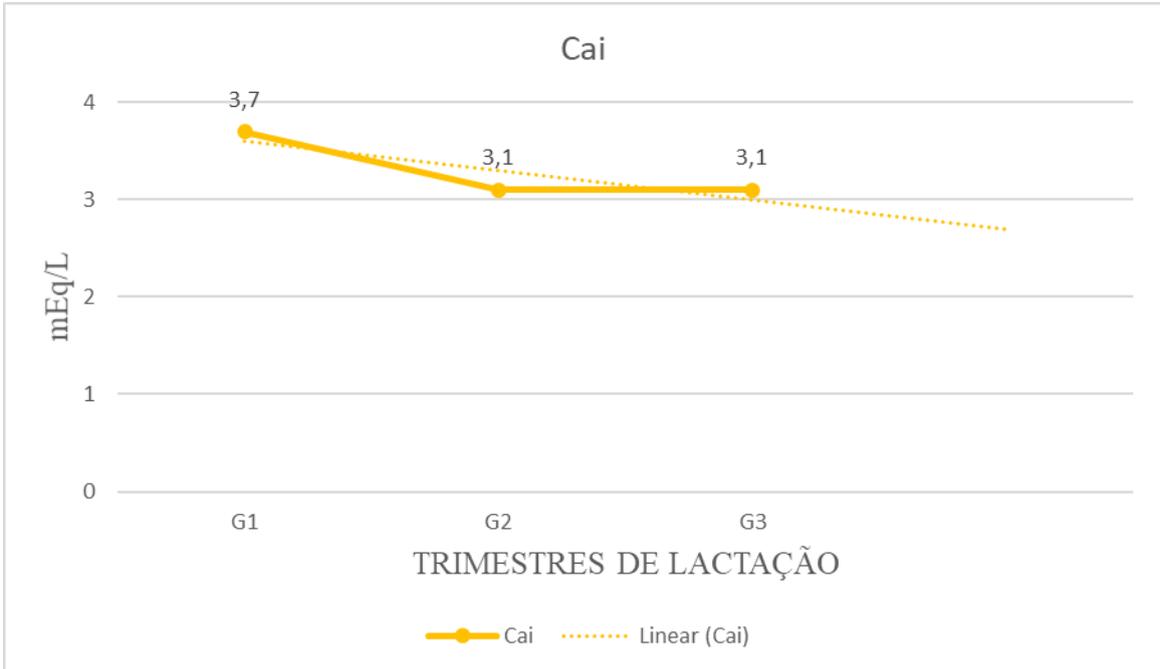


Figura 3 – Representação gráfica da dinâmica do Cálcio Iônico (Cai) no soro lácteo de amostras provenientes de quartos mamários de vacas Girolando, hígidas, coletadas no primeiro (G1), segundo (G2) e terceiro (G3) trimestres de lactação. Siglas: mEq/L (milequivalente/litro).

6.1.4. Influência das Fases de Lactação nas Concentrações de Clorestos (Cl)

Avaliando a **Tabela 4** e o **Figura 4**, observa-se que as concentrações de Cl foram estatisticamente maiores no G1 em relação aos grupos G2 e G3, sendo que os grupos G2 e G3 não diferiram entre si. Assim, o Cl apresentou uma dinâmica semelhante ao Cai.

Avaliando o **Figura 4**, podemos observar como ocorre a dinâmica desse íon, sendo evidente a decaída de suas concentrações conforme o trimestre de lactação. A linha de tendência nos mostra que, apesar de as concentrações do Cl aumentarem no final da lactação (G3), ainda sim, sua tendência é ser menor que no início da lactação.

Tabela 4 – Comparação do perfil bioquímico da concentração de Cloreto (Cl) de amostras de soro lácteo provenientes de quartos mamários de vacas Girolando, hígdas, coletadas no primeiro (G1), segundo (G2) e terceiro (G3) trimestres de lactação.

VARIÁVEL	UNIDADE	GRUPOS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
Cl	mEq/L	G1	197 A	34,0	126	320
		G2	173 B	27,0	104	215
		G3	182 B	23,0	122	234

Siglas: mEq/L (milequivalente/litro).

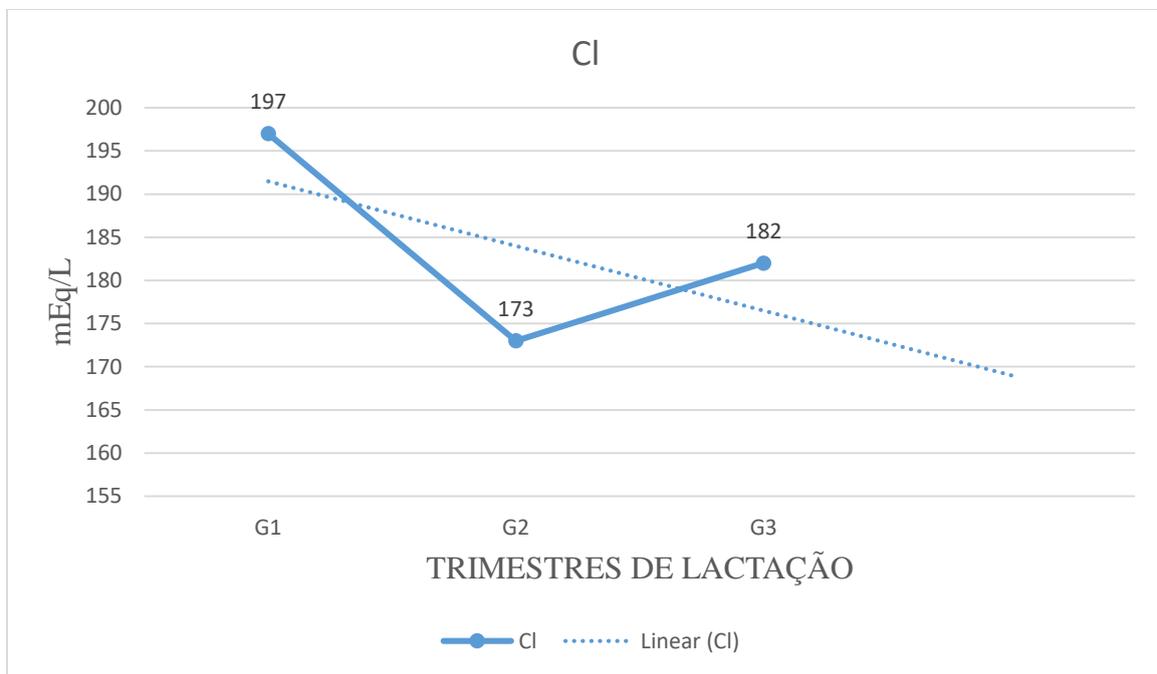


Figura 4 – Representação gráfica da dinâmica da concentração de Cloretos (Cl) no soro lácteo de amostras provenientes de quartos mamários de vacas Girolando, hígdas, coletadas no primeiro (G1), segundo (G2) e terceiro (G3) trimestres de lactação. Siglas: mEq/L (milequivalente/litro).

6.2 SEGUNDA ETAPA: DETERMINAÇÃO DE VALORES DE REFERÊNCIA, NO SORO LÁCTEO, PARA CONCENTRAÇÕES DE SÓDIO, POTÁSSIO, CÁLCIO IÔNICO E CLORETOS, CONSIDERANDO AS FASES DE LACTAÇÃO

Os IRs foram determinados de acordo com as diretrizes da Sociedade Americana de Patologia Clínica Veterinária (ASVCP) (FRIEDRICHS *et al.*, 2012), sendo gerados

utilizando o programa “Reference Value Advisor”, programa estatístico específico para cálculo de IRs. Utilizando o programa estatístico, foi possível gerar 16 IRs, sendo possível calcular os limites inferior e superior com 90 % de CI. Assim, para cada variável estudada, foram gerados quatro IRs, sendo eles: um IR Geral, sem divisão de dados por trimestres de lactação, e três outros IRs, separando os trimestres de lactação (G1, G2 e G3) (**Tabela 5**).

Inicialmente, todos os IR foram gerados assumindo que os dados se encaixavam em uma distribuição Guassiana. Para isto, utilizou-se dados não transformados (URD). No entanto, quando o teste de Anderson-Darling apontou que a distribuição dos dados não foi Gausiana, realizou-se um ajuste logarítmico na tentativa de transformar os dados em uma distribuição Gausiana. Nestes casos, quando um novo teste Anderson-Darling apontou que a distribuição dos dados foi considerada Gausiana, os valores de referência foram calculados utilizando-se dados transformados por Box-Cox (BCTRD).

Assim sendo, foi possível calcular os valores de referência utilizando dados não transformados (URD) apenas para os parâmetros Na e CI, ambos para amostras do segundo trimestre de lactação (G2). Os demais intervalos de referências foram calculados utilizando dados transformados por Box-Cox (BCTRD) (**Tabela 5; Figuras 1, 2, 3 e 4**).

Tabela 5 – Estatística descritiva e limites inferiores e superiores dos IRs para concentração de Na, K, Cai e Cl, no soro lácteo proveniente de quartos mamários de vacas da raça Girolando, hígdas, no primeiro (G1), segundo (G2) e terceiro (G3) trimestres de lactação.

Variável	Unidade	Grupo	Estatística Descritiva				IR com 90% CI		Reference Value Advisor	
			Média	DP	Mediana	Min-Máx	Limite Inferior (90% CI)	Limite Superior (90% CI)	<i>n</i>	Método
Na	mEq/L	Geral	156	19,4	156	76-198	116 (110-121)	190 (186-193)	280	BCTRD
		G1	158	17,4	158	120-198	122 (114-130)	193 (185-199)	60	BCTRD
		G2	141	26,5	153	76-165	85,6 (66,8-112)	196 (183-202)	46	URD
		G3	160	15,8	158	129-189	130 (126-133)	193 (189-198)	170	BCTRD
K	mEq/L	Geral	35,4	5,31	36,3	20,7-46,8	23,7 (22,4-25,2)	45,0 (44,2-45,8)	280	BCTRD
		G1	34,3	4,37	34,5	25,8-42,0	25,7 (24,5-27,0)	43,3 (41,7-44,8)	64	BCTRD
		G2	38,4	3,35	37,5	31,8-43,8	31,2 (29,7-32,9)	45,6 (43,3-47,2)	46	BCTRD
		G3	35,2	6,00	37,2	20,7-46,8	21,5 (19,5-24,0)	46,3 (45,0-47,6)	170	BCTRD
Cai	mEq/L	Geral	3,30	0,83	3,12	1,68-5,16	1,88 (1,80-1,98)	5,16 (4,95-5,34)	280	BCTRD
		G1	3,71	0,71	3,75	2,34-4,80	2,19 (1,92-2,48)	5,06 (4,87-5,21)	64	BCTRD
		G2	3,10	0,71	3,00	2,01-4,05	1,90 (1,75-2,14)	4,89 (4,40-6,10)	46	BCTRD
		G3	3,12	0,85	2,91	1,68-5,16	1,85 (1,68-2,07)	5,12 (4,88-5,16)	170	BCTRD
Cl	mEq/L	Geral	183	25,4	187	104-263	136 (132-141)	258 (247-270)	280	BCTRD
		G1	193	26,5	191	126-263	142 (133-154)	247 (234-262)	62	BCTRD
		G2	173	26,8	174	104-215	121 (109-134)	230 (217-241)	46	URD
		G3	182	23,4	187	122-234	126 (122-134)	219 (214-234)	170	BCTRD

n indica o número de animais; mEq/L – milequivalentes; URD, Untransformed robust data; BCTRD, Box–Cox transformed robust data; Sódio (Na); Potássio (K); Calcio Iônico (Cai); Cloretos (Cl).

6.2.1. Intervalos de Referência para as Concentrações de Sódio (Na)

Foram calculados quatro IRs para concentração de Na, um IR Geral, sem divisão de dados por trimestres de lactação, e três outros IRs, separando os trimestres de lactação (G1, G2 e G3) (**Tabela 5; Figura 5**).

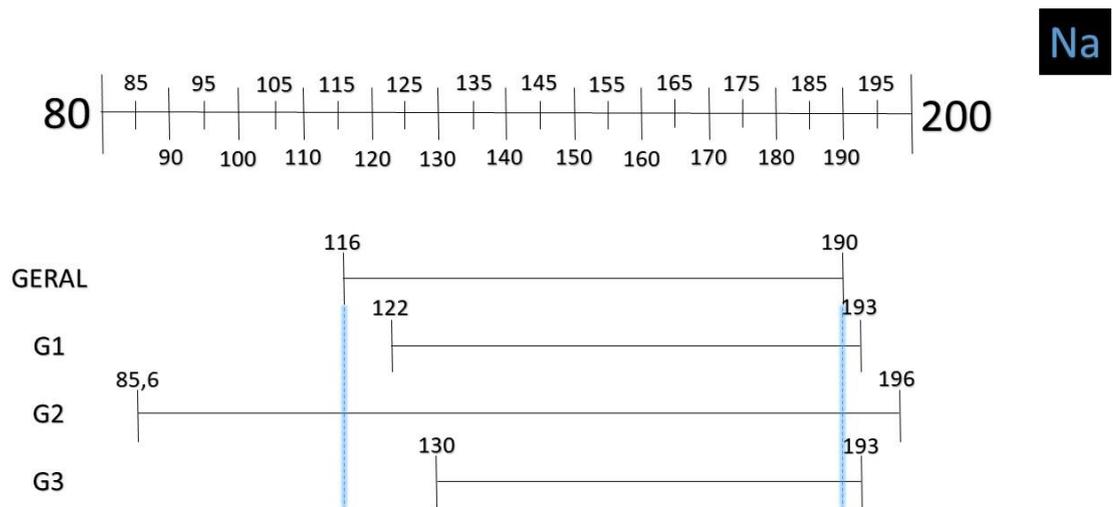


Figura 5. Comparação entre os quatro IRs definidos para concentração de Na. Siglas: IRs (Intervalos de Referência); Na (sódio).

Para o cálculo do IR Geral, sem divisão dos dados por trimestres de lactação, as análises ocorreram em uma etapa, visto que não foram encontrados outliers e portanto nenhum dado precisou ser excluído. Assim, os IRs foram definidos com um número final de 280 amostras.

Para o cálculo dos IRs do G1, as análises ocorreram em duas etapas: 1) O programa encontrou 4 outliers Tukey, que foram retirados. 2) Após retirados os outliers, os IRs foram reanalisados e definidos, portanto, com um número final de 64 amostras (64 amostras iniciais - 4 outliers retirados).

Para o cálculo dos IRs do G2 e do G3, as análises ocorreram em uma etapa, visto que não foram encontrados outliers e portanto nenhum dado precisou ser excluído. Assim, os IRs foram definidos com um número final de 46 amostras (G2) e 170 amostras (G3).

6.2.2. Intervalos de Referência para as Concentrações de Potássio (K)

Foram calculados quatro IRs para a concentração de K, um IR Geral, sem divisão de dados por trimestres de lactação, e três outros IRs, separando os trimestres de lactação (G1, G2 e G3) (**Tabela 5; Figura 6**).

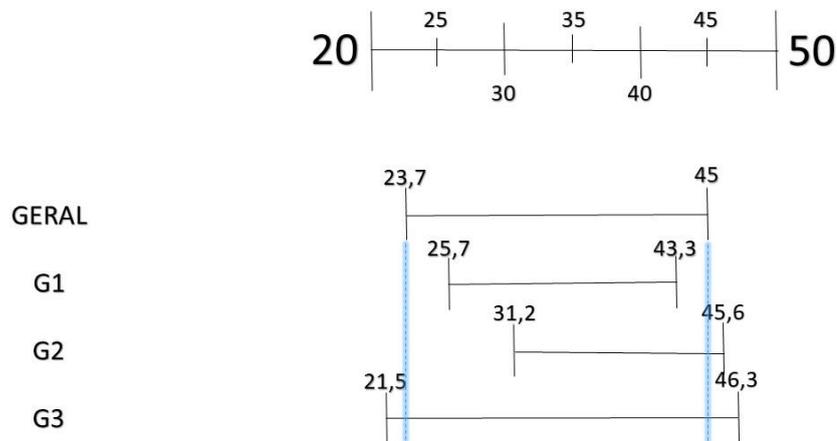


Figura 6. Comparação entre os quatro IRs definidos para as concentrações de K. Siglas: IRs (Intervalos de Referência); K (potássio).

Para o cálculo do IR Geral, sem divisão dos dados por trimestres de lactação, as análises ocorreram em uma etapa, visto que não foram encontrados outliers e portanto nenhum dado precisou ser excluído. Assim, os IR foram definidos com um número final de 280 amostras.

Para o cálculo dos IRs do G1, G2 e G3, as análises ocorreram em uma etapa, visto que não foram encontrados outliers e portanto nenhum dado precisou ser excluído. Assim, os IRs foram definidos com um número final de 64 amostras (G1), 46 amostras (G2) e 170 amostras (G3).

6.2.3. Intervalos de Referência para as Concentrações de Cálcio Iônico (Cai)

Foram calculados quatro IRs para a concentração de Cai, um IR Geral, sem divisão de dados por trimestres de lactação, e três outros IRs, separando os trimestres de lactação (G1, G2 e G3) (**Tabela 5; Figura 7**).

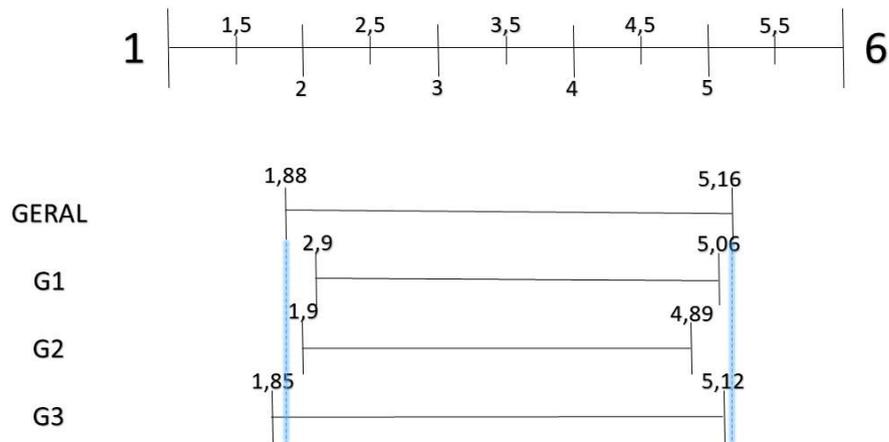


Figura 7. Comparação entre os quatro IRs definidos para as concentrações de Cai. Siglas: IRs (Intervalos de Referência); Cai (cálcio iônico).

Para o cálculo dos IR Geral, sem divisão dos dados por trimestres de lactação, as análises ocorreram em uma etapa, visto que não foram encontrados outliers e portanto nenhum dado precisou ser excluído. Assim, os IRs foram definidos com um número final de 280 amostras.

Para o cálculo dos IRs do G1, G2 e G3, as análises ocorreram em uma etapa, visto que não foram encontrados outliers e portanto nenhum dado precisou ser excluído. Assim, os IRs foram definidos com um número final de 64 amostras (G1), 46 amostras (G2) e 170 amostras (G3).

6.2.4. Intervalos de Referência para as Concentrações de Cloretos (Cl)

Foram calculados quatro IRs para o Cl, um IR Geral, sem divisão de dados por trimestres de lactação, e três outros IRs, separando os trimestres de lactação (G1, G2 e G3) (**Tabela 5; Figura 8**).

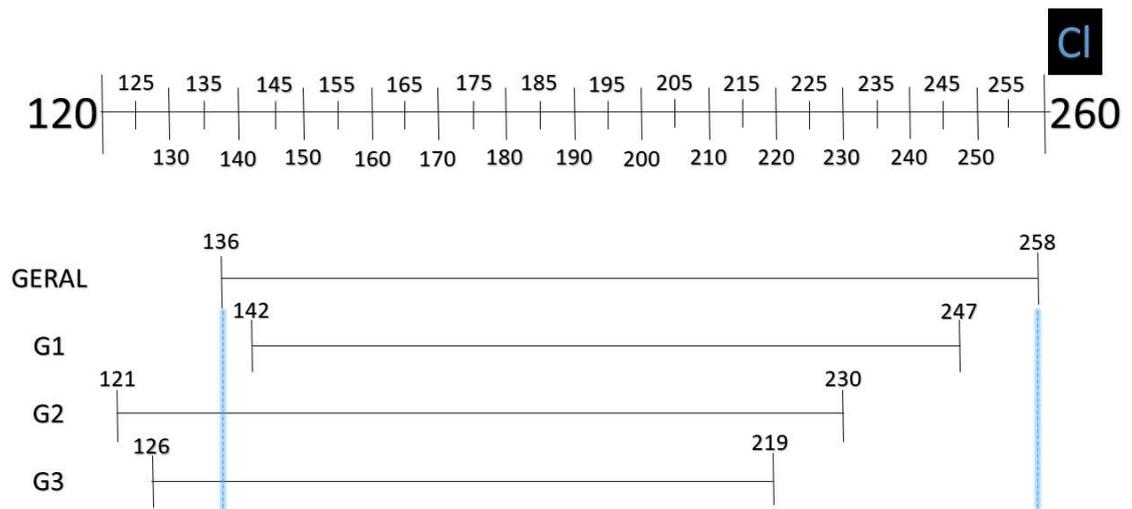


Figura 8. Comparação entre os quatro IRs definidos para as concentrações de Cl. Siglas: IRs (Intervalos de Referência); Cl (cloretos).

Para o cálculo dos IRs Geral, sem divisão dos dados por trimestres de lactação, as análises ocorreram em uma etapa, visto que não foram encontrados outliers e portanto nenhum dado precisou ser excluído. Assim, os IRs foram definidos com um número final de 280 amostras.

Para o cálculo dos IRs do G1, as análises ocorreram em duas etapas: 1) O programa encontrou 2 outliers Tukey, que foram retirados. 2) Após retirados os outliers, os IRs foram reanalisados e definidos, portanto, com um número final de 62 amostras (64 amostras iniciais - 2 outliers retirados).

Para o cálculo dos IRs do G2 e do G3, as análises ocorreram em uma etapa, visto que não foram encontrados outliers e portanto nenhum dado precisou ser excluído. Assim, os IR foram definidos com um número final de 46 amostras (G2) e 170 amostras (G3).

7 DISCUSSÃO

Esse trabalho representa o primeiro estudo direcionado à geração de valores de referência ou intervalos de referência (IRs) durante cada trimestre de lactação, dos compostos Na, K, Cai e Cl, no soro lácteo de vacas da raça Girolando, criadas em sistema de Compost Barn, em uma região de clima temperado, localizada no município de Marilena no Noroeste do Paraná.

Durante a comparação entre as fases de lactação realizada na primeira etapa do trabalho, já se observou diferenças estatísticas entre os grupos. Portanto, através dessas análises, ressalta-se a necessidade de gerar IRs para tais variáveis levando-se em consideração as fases de lactação, visto que tais IRs resultarão em dados mais fidedignos do que a utilização de IRs gerais.

Os dados não foram comparados com a literatura, uma vez que, não se encontra estudos que estabelecem IRs para o leite em bovinos, fortalecendo a necessidade de se gerar esse tipo de literatura para que se tenha um parâmetro de base para utilização em animais doentes. No caso do nosso trabalho, foi estabelecido IRs para vacas Girolando, raça encontrada em maior predominância na região da coleta. O Paraná possui grande diversidade de métodos de criação de bovinos de leite, assim como raças utilizadas, portanto, é importante que se inicie a geração de IR para esses grupos.

Os IRs foram calculados de forma geral e específica para cada composto conforme cada fase de lactação. Calculando esses dados de forma geral e comparando com os dados destrinchados de cada fase de lactação, foi possível enfatizar o risco de se utilizar IRs gerais para monitorar animais em diferentes fases de lactação.

7.1 CONCENTRAÇÕES DE SÓDIO (Na)

O Na é um composto encontrado em maior predominância no sangue, se comparado com o leite, no entanto, nos casos de mastite, a glândula mamária sofre lesão por ação dos microrganismos, acarretando aumento de permeabilidade capilar e consequentemente extravasamento desse composto para o leite, aumentando sua concentração (AULDIST *et al.*, 1995; FONSECA; SANTOS, 2001).

Porém, para que seja possível definir se o animal está tendo um aumento das concentrações do Na no leite decorrente da mastite, é necessário entender como é a dinâmica dele em uma fêmea saudável. E como definição de saudável, utilizou-se critérios de CTFE negativo, CMT negativo, CCS < 200.000 células/mL e exame microbiológico negativo, já descritas nesse trabalho. Além desses fatores, para entender com qualidade como ocorre essa dinâmica, é necessário considerar a raça do animal, seu método de criação, a dieta, a fase de lactação e a idade, uma vez que, os valores de

referência não são os mesmos entre as espécies, nem mesmo entre animais da mesma raça.

Com a **Figura 5**, é possível entender como que animais da mesma raça e no mesmo método de criação possuem dinâmicas diferentes e como um resultado geral pode levar a erros de interpretação. Fisiologicamente o Na sofre alterações de concentração dentro do leite durante as fases de lactação. Dentro desses IRs estabelecidos existe um limite inferior e um superior (**Tabela 5**), no qual se define que, dentro desse limite inferior e superior, a concentração de Na está normal, não indicando alterações por afecções da glândula mamária.

É possível e não deixa de ser importante estabelecer IRs gerais, no entanto, quando a intensão é considerar que a mastite subclínica altera esse composto, o uso do geral vai levar a erros de interpretação. Isso é nitidamente observável através da **Figura 5**, ou seja, se eu utilizar o valor geral e não destrinchar entre as fases de lactação, os limites máximos ou superiores desse composto dentro de cada trimestre de lactação vai se encontrar fora do valor de referência, uma vez que o G1, G2 e G3, apresentaram limite máximo acima de 190 mEq/L, que é o limite superior do IR geral (**Tabela 5**). Isso vai levar a um falso diagnóstico de mastite subclínica por análise de compostos do leite, enfatizando a importância de se definir IR para cada variável considerando a fase de lactação. Não menos importante é observar o limite inferior, é necessário existir também esse parâmetro em cada fase de lactação, no entanto, em se tratando de mastite, para Na, é mais grave erros de interpretação direcionados ao limite máximo do mesmo.

Outro detalhe de grande importância são os Intervalos de Confiança (IC) (**Tabela 5**). Esses dados demonstram uma pequena variação que o IR pode sofrer, considerando o erro estatístico pré-definido. Isso quer dizer que, quando o valor de referência ficar acima ou abaixo do IR considerado normal, é uma situação que necessita ser avaliada com cautela antes de se julgar o resultado como de um animal contendo mastite subclínica ou o contrário.

7.2 CONCENTRAÇÕES DE POTÁSSIO (K)

O K é o mineral mais abundante no leite e sofre diminuição quando passa do leite para o sangue nos casos de epitélio glandular lesionado, decorrente de mastite (AULDIST

et al., 1995; FONSECA; SANTOS, 2001). Levando isso em consideração, ao observar a **Figura 6**, percebemos que, apenas o G3 fica fora do IR ideal de acordo com os valores de referência geral. Isso é preocupante, pois, os animais do G1 e G2 possuem limite inferior maior que o grupo geral (**Tabela 5**), fazendo com que, esses animais passem por animais saudáveis, sem mastite, mesmo que em seus grupos o valor esteja abaixo do ideal. E o G3, passa como um animal acometido por mastite, mesmo estando completamente saudável.

Ocorre alterações também de limite superior, no entanto, para esse composto, é de maior importância considerar os possíveis erros de interpretação considerando os limites mínimos (**Tabela 5**). Porém, é necessário possuir esses dados sobre os limites máximos a título de pesquisa e entendimento de uma lactação saudável.

7.3 CONCENTRAÇÕES DE CÁLCIO IÔNICO (Cai)

A concentração de Ca, em casos de mastite subclínica, sofre diminuição no leite, decorrente da redução da síntese da caseína, na qual a maior parte do Ca fica incorporado às micelas (NEVILLE; WATTERS, 1983; FONSECA; SANTOS, 2001). Assim sendo, ao observar a **Figura 7**, constata-se o mesmo possível erro de interpretação apresentado na dinâmica do K. Isso porque, os limites mínimos de cada grupo (G1 e G2), exceto o G3, são superiores ao valor descrito no IR geral, fazendo com que, ao avaliar um rebanho no primeiro e segundo trimestre de lactação, ocorre o erro de identificar os mesmos como negativos para mastite subclínica. E o contrário ocorre com as fêmeas no terceiro trimestre de lactação (G3), onde, ao apresentarem IR menor que 1,88 mEq/L (**Tabela 5**), podem ser julgadas como positivas para mastite subclínica, mesmo não sendo.

7.4 CONCENTRAÇÕES DE CLORETOS (Cl)

No caso da concentração de Cl, sua tendência é diminuir no leite a partir do segundo trimestre de lactação (**Figura 8**), no entanto, quando se tem um aumento na Contagem de Células Somáticas (CCS) no leite, indicativo de mastite subclínica, o aumento da permeabilidade capilar faz com que esse composto aumente no leite, uma vez

que, naturalmente, sua tendência é estar em maior quantidade no sangue (AULDIST *et al.*, 1995; FONSECA; SANTOS, 2001).

Sabendo que o teor de Cl tem a tendência a aumentar no leite quando em casos de mastite, ao observar a **Figura 8**, se percebe o tamanho da probabilidade de ocorrer erros de interpretações na análise desse rebanho, caso os dados não fossem destrinchados em cada fase de lactação, uma vez que, os dados dos IRs gerais são diluídos e não representam a verdadeira condição do rebanho. Nesse caso, todas as fêmeas bovinas (G1, G2 e G3) que apresentaram IR de limite superior menor que 258 mEq/L estão sujeitas a não serem identificadas com mastite subclínica através dos compostos do leite (**Tabela 5**). Já, levando em consideração cada fase de lactação, se observa que a variável se comporta de maneira diversa, não sendo possível utilizar o IR de um grupo para o outro.

8 CONCLUSÃO

O IR pode ser utilizado de forma geral, no entanto, destrinchando em valores específicos de cada variável em cada fase de lactação, se obtem uma qualidade de diagnóstico melhor. Se alguma variável possui diferença estatística entre as fases de lactação, não se pode utilizar o IR geral, uma vez que, o geral dilui os resultados das fases de lactação e, dessa forma, um valor considerado certo/aceitável no geral, não corresponde ao valor correto dentro de cada trimestre de lactação.

A diferença entre os compostos em cada fase de lactação reforça a necessidade de mais estudos relacionados a geração de IR no leite, uma vez que, já se comprova que o mesmo possui uma dinâmica fisiológica, que necessita ser entendida, para que dessa forma se compreenda melhor sobre as alterações que pode acontecer no leite e seus derivados, decorrentes de patologias da glândula mamária, como a mastite.

9 REFERÊNCIAS

AARSAND, A. K.; RORAAS, T.; BARTLETT, W. A.; COSKUN, A.; CAROBENE, A.; FERNANDEZ-CALLE, P.; JONKER, N.; DÍAZ-GARZ, J.; BRAGA, F.; SANDBERG, S. Harmonization initiatives in the generation, reporting and application of biological variation data. **Clin Chem Lab Med**, v. 56, p. 1629-1636, 2018.

ALI, T. E.; SCHAEFER, L. R. Accounting for Covariances Among Test Day Milk Yields in Dairy Cows. **Can. J. Anim. Sci**, v. 67, p. 637-644, 1987.

ALMEIDA, C. C.; JÚNIOR, C. A. C.; SILVA, A. C. O.; ALVARES, T. S. Proteína do Soro do Leite: Composição e suas Propriedades Funcionais. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, v. 9, n. 16, p.1840, 2013.

AULDIST, M. J.; COATS, S.; ROGERS, G. L.; MECDOWELL, G. H. Changes in the composition of milk from healthy and mastitic dairy cows during the lactation cycle. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 35, n. 4, p. 427-436, 1995.

BÁNKUTI, F. I.; CALDAS, M. M. Geographical milk redistribution in Paraná State, Brazil: Consequences of institutional and market changes. **Journal os Rural Studies**, v. 64, p. 63-72, 2018.

BLANKENSTEIN, M. A. Reference Intervals – ever met a normal person?. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 52, p. 5-6, 2015.

BRASIL. Decreto nº 1.812 de 8 de fevereiro de 1996. **Lex: Coleção de Leis do Brasil - 1996**, v. 2, p. 805.

DAHL, G. E. Physiology of lactation in dairy cattle – challenges to sustainable production. **Animal Agriculture**. v. 7, p 121-128, 2020.

DECRETO Nº 1.812. ART. 475, DE 08 DE FEVEREIRO DE 1996. Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda. Disponível em: <<https://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/1996/decreto-1812-8-fevereiro-1996-435786-publicacaooriginal-1-pe.html>>. Acesso em: 08 ago. 2023.

DIAS, M. B. C.; LEÃO, K. M.; CARMO, R. M.; SILVA, M. A. P.; NICOLAU, E. S.; MARQUES, T. C. Milk composition and blood metabolic profile from holstein cows at different calving orders and lactation stages. **Acta Scientiarum**, v. 39, n. 3, p. 315- 321, 2017.

FAO, F. and A. O. of the U. N. (2021). Crops and livestock products - FAOSTAT.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. Qualidade do leite e controle da mastite. 2 ed. São Paulo: **Lemos**, 2001. p. 175.

FONTANELI, R. S. Fatores que Afetam a Composição e as Características Físico-químicas do Leite. 2001. 25 p. Pós-graduação em Ciências Veterinárias - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

FRIEDRICHS, K. R.; HARR, K. E.; FREEMAN, K. P.; SZLADOVITS, B.; WALTON, R. M.; BARNHART, K. F.; BLANCO-CHAVEZ, J. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 41, p. 441-453, 2012.

GEFFRÉ, A.; CONCORDET, D.; BRAUN, J. P.; TRUMEL, C. Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40, p.107-112, 2011.

GDP, G. D. P. (2017). Global Dairy Platform Annual Review. **Global Dairy Platform**, 1-20. Disponível em: <<https://www.globaldairyplatform.com/wp-content/uploads/2018/04/gdp-annual-report-online.pdf>>. Acesso em: 08 ago. 2023.

GONZÁLEZ, F. H. D.; DURR, J. W.; FONTANELI, R. S. Uso do Leite para Monitorar a Nutrição e o Metabolismo de Vacas Leiteiras. Biblioteca Setorial da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS, Porto Alegre. p. 77, 2001.

GUIMARÃES, A. S. **Sistema Compost Barn: caracterização dos parâmetros de qualidade do leite, reprodutivos, bem-estar animal, do composto e econômicos em condições tropicais**. Embrapa Cerrados, 2018. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-projetos/-/projeto/209863/sistema-compost-barn-caracterizacao-dos-parametros-de-qualidade-do-leite-e-mastite-reprodutivos-bem-estar-animal-do-composto-e-economicos-em-condicoes-tropicais>>. Acesso em: 08 ago. 2023.

HORTET, P.; SEEGER, H. Calculated milk production losses associated with elevated somatic cell counts in dairy cows: review and critical discussion. **Veterinary Research**, v. 29, p. 497–510, 1998.

IANNOTTI, L.L. The benefits of animal products for child nutrition in developing countries. **Rev Sci Tech**. v. 37, p.37-46, 2018.

IBGE. **Pesquisa da Pecuária Municipal 2021**. Rio de Janeiro, RJ, 2021. v. 49, 12 p. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2021_v49_br_informativo.pdf>. Acesso em: 08 ago. 2023.

IPARDES. **Caracterização Socioeconômica da Atividade Leiteira no Paraná**. Curitiba, PR: Sumário Executivo, 2009. 30 p. Disponível em: <http://www.ipardes.gov.br/biblioteca/docs/sumario_executivo_atividade_leiteira_parana.pdf>. Acesso em: 08 ago. 2023.

KLEIN, B. G. **Cunningham Tratado de Fisiologia Veterinária**. 6. ed. GEN Guanabara Koogan, 2021. 328 p.

KONIG, H. E.; LIEBICH, H. G. **Anatomia dos Animais Domésticos: Atlas Colorido**. 7. ed. Artmed, 2021. 856 p.

LI, M.; ROSA, G. J. M.; REED, K. F.; CABRERA, V. E. Investigating the effect of temporal, geographic, and management factors on US Holstein lactation curve parameters. **Journal of Dairy Science**, v.105, p. 7525-7538, 2022. DOI <<https://doi.org/10.3168/jds.2022-21882>>.

LUMSDEN, J. H.; MULLEN, K. On Establishing Reference Values, **Can. J. comp. Med**, v. 42, p. 293-301, 1978.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Instrução Normativa nº 76/77, de 26 de novembro de 2018. ed. 230. p. 9. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750137/do1-2018-11-30-instrucao-normativa-n-76-de-26-de-novembro-de-2018-52749894IN%2076>. Acesso em: 08 ago. 2023.

NEVILLE, M.C.; WATTERS, C.D. Secretion of calcium into milk: review. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 3, p. 371-380, 1983.

NITSCHKE, P. R.; CARAMORI, P. H.; RICCE, W. S.; PINTO, L. F. D. Atlas Climático do Estado do Paraná. Londrina, PR: Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR), 2019. 210 p.

NORO, G. Síntese e Secreção do Leite. 2001. 21 p. Pós- Graduação em Ciências Veterinárias - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

OLIVEIRA M. N. Tecnologia de produtos lácteos funcionais. Livro: Ed. **Atheneu**. São Paulo, 2009.

OLIVEIRA D. F.; BRAVO C. E. C.; TONIAL I. B. Soro de leite: Um subproduto valioso. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v. 67, p. 64-71, 2012.

PIZAURO, L. J. L.; SILVA, D. G.; SANTANA, A. M.; MORAIS, S. M. A.; BENINCASA, N. C.; FAGLIARI, J. J. Perfil bioquímico, inclusive proteinograma, do soro lácteo de búfalas primíparas e pluríparas sadias ao longo da lactação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, p. 79-76, 2015. DOI <10.1590/S0100-736X2014001300015>.

POZZATTI, P.; HORVATH, R.A.; BARROSO, C.D.N.; MURASAKI, J.; CASAGRANDE, F.P.; PAES LEMES, F.O. Anais... Semana de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2016, Araquari. v Avaliação da Fosfatase Alcalina e Gama-Glutamiltransferase no decorrer do parto aos 180 dias de lactação e em correlação com a Contagem de Células Somáticas do Soro do Leite de Vacas Girolando em Fazenda Comercial de Minas Gerais, Brasil. Araquari: Instituto Federal Catarinense, p. 5, 2016.

RÉVILLION, J. P.; BRANDELLI, A.; AYUB M. A. Z. Produção de extratos de leveduras de uso alimentar a partir do soro de queijo: abordagem de elementos técnicos mercadológicos relevantes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 2, 2000.

ROCHA, D. T.; CARVALHO, G. R.; RESENDE, J.C. **Cadeia Produtiva do Leite no Brasil: produção primária**. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, 2020. 16 p. (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 123). Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/215880/1/CT-123.pdf>>. Acesso em: 08 ago. 2023.

RUAS, J. R. M.; BORGES, L. E.; NETO, A. M.; AMARAL, R. Cria e recria da fêmea F1: Holandês x Zebu para produção de leite. EPAMIG. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.25, n.221, p.40- 46, 2004.

SEEGERS, H.; FOURICHON, C.; BEAUDEAU, F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. **Veterinary Research**, v.34, n.5, p. 475-491, 2003. DOI <10.1051/vetres:2003027>.

SILVA, E. I. C. Fisiologia do Parto e da Lactação. 2020. 19 p. Bacharelado em Zootecnia - Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2020.

SILVA, L.F.P.; PEREIRA, A.R.; MACHADO, P.F.; SARRIÉS, G.A. Efeito do nível de células somáticas sobre os constituintes do leite II - lactose e sólidos totais. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 4, 2000. DOI <10.1590/S1413-95962000000400014>.

SORIO, A. **Cadeia Agroindustrial do Leite no Brasil: Diagnóstico dos Fatores Limitantes à Competitividade**. Brasília, DF, 2018, 167 p. (MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS – MDIC). Disponível em: <https://asbram.org.br/wp5/wp-content/uploads/2019/01/Estudo_do_Leite_Versao_Digital-minimizada.pdf>. Acesso em: 08 ago. 2023.

WHITEHEAD S. J.; CORNES M. P.; FORD C.; outros. Reference ranges for serum total and monomeric prolactin for the current generation Abbott Architect assay. **Ann Clin Biochem**, v. 52, p. 61-66, 2015.

ZIEGLER, F. L. F.; SGARBIERI, V. C. Caracterização químico-nutricional de um isolado proteico de soro de leite, um hidrolisado de colágeno bovino e misturas dos dois produtos. **Revista de Nutrição**, v. 22, n. 1, p. 61-70, 2009.

