

**UNIVERSIDADE DOS AÇORES  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**EFEITO DE DIFERENTES REGIMES ALIMENTARES SOBRE  
A QUALIDADE DO LEITE PRODUZIDO.**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM PRODUÇÃO ANIMAL**

**ORIENTADOR PROFESSOR DOUTOR ANTÓNIO MOITINHO RODRIGUES  
CO-ORIENTADOR PROFESSOR DOUTOR VALDEMAR OSÓRIO E CASTRO**

**SANDRA DUARTE DA FONSECA DIAS**

**ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA DE CASTELO BRANCO  
2006**

## ÍNDICE FIGURAS

	PÁGINA
<b>Figura 1</b> – Influência das diferentes rações sobre os AGV formados no rúmen e destes sobre a composição do leite.	<b>14</b>
<b>Figura 2</b> – Planta da Quinta Nossa Senhora de Mércules.	<b>16</b>
<b>Figura 3</b> – Diagrama Ombrotérmico de Castelo Branco (1931-1960).	<b>17</b>
<b>Figura 4</b> – Balanço Hídrico de Castelo Branco (1931-1960).	<b>18</b>

## ÍNDICE GRÁFICOS

	PÁGINA
<b>Gráfico 1</b> – Ácido linoleico conjugado (CLA).	<b>35</b>
<b>Gráfico 2</b> – Ácidos gordos de cadeia curta (C10:0, C11:0 e C12:0).	<b>36</b>
<b>Gráfico 3</b> – Frações caseínicas do leite.	<b>37</b>

## ÍNDICE QUADROS

	PÁGINA
<b>Quadro 1</b> – Composição média do leite de vários mamíferos.	5
<b>Quadro 2</b> – Regimes alimentares formulados segundo o Sistema do NRC (2001).	19
<b>Quadro 3</b> – Composição analítica dos alimentos utilizados.	21
<b>Quadro 4</b> – Condições do processo de separação do aparelho “PhastSystem”.	25
<b>Quadro 5</b> – Condições do método de coloração do aparelho “PhastSystem”.	26
<b>Quadro 6</b> – Condições de separação dos ésteres metílicos dos ácidos gordos no cromatógrafo “Hewlet Packard 3800”.	29
<b>Quadro 7</b> – Condições de separação dos ésteres metílicos dos ácidos gordos no cromatógrafo “Hewlet Packard 5890”.	30
<b>Quadro 8</b> – Influência dos diferentes regimes alimentares na composição em ácidos gordos do leite.	33
<b>Quadro 9</b> – Influência dos diferentes regimes alimentares nos parâmetros químicos (teor butiroso, teor proteico, produção de leite e ureia).	37
<b>Quadro 10</b> – Influência dos diferentes regimes alimentares na composição em caseínas.	38

# **ÍNDICE**

**ÍNDICE FIGURAS**

**ÍNDICE GRÁFICOS**

**ÍNDICE QUADROS**

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**RESUMO**

**ABSTRACT**

	<b>PÁGINA</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>4</b>
<b>2.1. O LEITE</b>	<b>4</b>
<b>2.2. FRACÇÃO LIPÍDICA</b>	<b>6</b>
<b>2.3. FRACÇÃO PROTEICA</b>	<b>10</b>
<b>2.4. A LACTOSE</b>	<b>12</b>
<b>2.5. A PLASMINA</b>	<b>13</b>
<b>2.5. MANIPULAÇÃO DA ALIMENTAÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>16</b>
<b>3.1. CARACTERIZAÇÃO DA EXPLORAÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>3.1.1. LOCALIZAÇÃO DA EXPLORAÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>3.1.2. CARACTERÍSTICAS EDAFO-CLIMÁTICAS</b>	<b>17</b>
<b>3.2. DELINEAMENTO DA PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>19</b>

	21
<b>3.3. ALIMENTAÇÃO, COLHEITA E ANÁLISES LABORATORIAIS</b>	
	22
<b>3.4. COLHEITA E ANÁLISES LABORATORIAIS DO LEITE</b>	
<b>3.4.1. DETERMINAÇÃO DOS SÓLIDOS TOTAIS (ST), DOS SÓLIDOS NÃO GORDOS (SNG), DO TEOR BUTIROSO (TB), PROTEICO (TP) E LACTOSE (TL)</b>	22
<b>3.4.2. SEPARAÇÃO DA GORDURA DO LEITE</b>	23
<b>3.4.3. PRECIPITAÇÃO DAS CASEÍNAS</b>	23
<b>3.4.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA (MÉTODO DO BIURETO)</b>	24
<b>3.4.5. ELECTROFORESE (PHARMACIA LKB-PHASTSYSTEM)</b>	24
<b>3.4.6. QUANTIFICAÇÃO DAS CASEÍNAS</b>	27
<b>3.4.7. EXTRACÇÃO DA GORDURA PARA DETERMINAÇÃO DOS ÉSTERES METÍLICOS DOS ÁCIDOS GORDOS (FAME'S)</b>	27
<b>3.4.8. PREPARAÇÃO DOS ÉSTERES METÍLICOS DOS ÁCIDOS GORDOS (FAME'S)</b>	28
<b>3.4.9. DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS GORDOS DO LEITE</b>	28
<b>3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	31
<b>4. RESULTADOS</b>	32
<b>5. DISCUSSÃO</b>	40
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	42
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	43
<b>ANEXO</b>	

## LISTA DE ABREVIATURAS

%	percentagem
‘N	Norte
‘W	Oeste
<	menor
>	maior
1 <sup>a</sup>	primeira
1 <sup>o</sup>	primeiro
AGV	ácidos gordos voláteis
ATP	adenosina trifosfatada
cit.	citado
CN	caseína
CoA	Coenzima A
Enet	energia net
ESACB	Escola Superior Agrária de Castelo Branco
ha	hectare
M	Molar
m	metro
Mcal	megacaloria
mA	miliampere
mg	miligrama
ml	mililitro
mm	milímetro
n <sup>o</sup>	número
N	número amostras
N	Normalidade
NADPH <sub>2</sub>	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato redutase

NDF	fibra neutro detergente
nm	Nanómetro
NP	Norma Portuguesa
NRC	National Research Council
°C	grau centígrado ou grau Celsius
PVC	pressão e volume constante
RNA <sub>m</sub>	ácido ribonucleico mensageiro
rpm	rotações por minuto
s/d	sem data
β	beta
UDP	uridina difosfatada
UHT	“ultra high temperature”
V	Volt
VH	Volthora
W	Watt
α	alfa
μg	micrograma
μl	microlitro
μm	micrómetro

## **AGRADECIMENTOS**

A realização deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração, apoio e incentivo prestado por algumas pessoas e instituições, às quais gostaria de expressar o meu mais sincero agradecimento:

**MUITO OBRIGADO**

## RESUMO

Com o objectivo de avaliar o efeito do regime alimentar sobre a produção e composição de leite de vacas Holstein Friesian realizou-se um ensaio em que foram utilizados regimes alimentares diferenciados e isoenergéticos: predominando a silagem de milho (T2, Enet 36,9Mcal), predominando a pastagem (T3, Enet 36,0Mcal) e regime alimentar base onde predominou o feno (T1, Enet 34,3Mcal). Efectuaram-se recolhas semanais e individuais, das duas ordenhas diárias, de leite das seis vacas utilizadas para o estudo.

Os alimentos utilizados foram analisados no Laboratório de Nutrição Animal e o leite produzido nos laboratórios de Química, Bioquímica e Instrumentação Analítica da ESACB.

Os resultados foram os seguintes: influência do regime alimentar sobre a composição do leite

em relação ao teor butiroso (pastagem 3,81% ( $\pm 0,52$ ), silagem milho 4,04% ( $\pm 0,76$ ), feno 3,66% ( $\pm 0,66$ )) ( $p > 0,05$ ), ao teor proteico (pastagem 3,09% ( $\pm 0,28$ ), silagem milho 3,18% ( $\pm 0,20$ ) feno 2,98% ( $\pm 0,21$ )) ( $p > 0,05$ ), à produção leite (pastagem 229,69% ( $\pm 25,03$ ), silagem milho 207,18% ( $\pm 28,86$ ), feno 222,69% ( $\pm 26,52$ )) ( $p < 0,05$ ) e ureia (pastagem 225,92% ( $\pm 74,95$ ), silagem milho 171,67% ( $\pm 44,33$ ), feno 194,58% ( $\pm 64,46$ )) ( $p < 0,05$ );

em relação aos ácidos gordos do leite (C14:1cis9) (pastagem 0,73% ( $\pm 0,28$ ), silagem milho 1,09% ( $\pm 0,22$ ), feno 0,91% ( $\pm 0,19$ )), ácido gordo isoC16:0 (pastagem 0,78% ( $\pm 0,08$ ), silagem milho 1,02% ( $\pm 0,21$ ), feno 0,89% ( $\pm 0,10$ )), (C16:0) (pastagem 22,71% ( $\pm 1,76$ ), silagem milho 31,40% ( $\pm 2,93$ ), feno 25,84% ( $\pm 2,18$ )), (C18:0) (pastagem 10,41% ( $\pm 1,81$ ), silagem milho 6,86% ( $\pm 1,38$ ), feno 8,21% ( $\pm 1,58$ )) e (C18:1cis9) (pastagem 20,94% ( $\pm 4,68$ )), silagem milho 14,56% ( $\pm 2,29$ ), feno 18,22% ( $\pm 3,35$ )) ( $p < 0,05$ );

em relação à caseína k (pastagem 8,90% ( $\pm 2,09$ ), silagem milho 8,24% ( $\pm 2,22$ ), feno 7,90% ( $\pm 2,80$ )), caseína  $\beta$  (pastagem 30,57% ( $\pm 7,36$ ), silagem milho 26,52% ( $\pm 9,63$ ), feno 26,41% ( $\pm 7,04$ )), caseína  $\alpha S1$  (pastagem 43,34% ( $\pm 7,94$ ), silagem milho 41,57% ( $\pm 6,03$ ), feno 39,40% ( $\pm 4,79$ )) e caseína  $\alpha S2$  (pastagem 8,64% ( $\pm 2,80$ ), silagem milho 7,23% ( $\pm 3,61$ ), feno 7,56% ( $\pm 2,56$ )) ( $p > 0,05$ ).

Concluí-se que a utilização de pastagem na alimentação das vacas aumenta a produção de CLA em 36% em relação à silagem de milho. Embora não tenhamos encontrado diferenças estatisticamente significativas em relação às caseínas, a utilização de pastagem permitiu obter leite com maior quantidade de caseínas. A silagem de milho favorece o aumento dos ácidos gordos de cadeia curta enquanto que a pastagem os ácidos gordos de cadeia longa.

**Palavras-chave:** Pastagem, Silagem de Milho, Leite, CLA, Caseínas; Ácidos Gordos.

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de bovinos de leite, como indústria agrícola, constitui no Mundo uma função indispensável pelo valor nutritivo do alimento leite, cuja composição e produção são resultado da relação de elementos inerentes à vaca e ao seu meio envolvente.

Vários são os factores que poderão influenciar a composição do leite, nomeadamente a raça, a genética, a idade, a alimentação, o meio ambiente, o estado higio-sanitário, o manejo e a técnica de ordenha (Baudet, 1991). A genética, a nutrição e o manejo são para Hullár e Brand (1993) os factores mais importantes.

O leite é constituído por uma mistura de diferentes substâncias, de complexidade variável, dispersas num meio aquoso. Segundo Chamberlain e Wilkinson (1996), de entre os diferentes componentes do leite, a gordura e a proteína são normalmente os que merecem maior atenção devido ao seu valor comercial.

Destacamos o melhoramento genético e a nutrição como vias a explorar para alterar a composição do leite.

Sabe-se que ao actuarmos via melhoramento genético as modificações são extremamente lentas, mesmo sabendo que essa alteração se repercutirá nas gerações seguintes.

Em relação à nutrição, as modificações efectuadas via alimentar ocorrem de forma quase imediata sendo que esta é, normalmente, a via a escolher para alterar a composição do leite de modo a responder às exigências do mercado.

Segundo Sutton (1989), os alimentos fornecem aos ruminantes os nutrientes que serão percursores, directa ou indirectamente, dos principais sólidos do leite. A formulação da dieta animal é um passo importante, pois é neste ponto que se poderá intervir para ocasionar alterações na composição do leite.

Há alguns anos atrás o leite era valorizado pelo seu teor butiroso o que levou a que a Europa se tornasse excedentária em gordura. Nos últimos anos ou mais recentemente os consumidores têm vindo associar a gordura de origem animal ao aumento do número de acidentes cardio-vasculares (Nunes, 2004).

Murphy (2000) menciona que o perfil de ácidos gordos do leite de vaca pode ser influenciado manipulando o regime alimentar.

A modificação do conteúdo em gordura do leite, manipulando o regime alimentar, não é um conceito recente, já que em estudos realizados na década de 70, para aumentar a quantidade de gordura insaturada da gordura do leite também se manipulou a dieta das vacas (Grummer, 1991).

Nos últimos anos têm existido avanços no sentido de dar mais importância ao conteúdo em proteína do leite, contrariando o que era feita até então, pois os animais eram orientados para produzir elevadas quantidades de leite e com elevados conteúdos em gordura. Alguns industriais de produtos lácteos passaram a valorizar o leite pelo seu conteúdo em proteínas ou, mais precisamente, pela percentagem em caseínas. Isto, porque se sabe que as caseínas, que representam 80% das proteínas do leite, determinam o rendimento de transformação do leite em queijo e ou iogurte.

A proteína láctea entra na constituição de um grande número de produtos alimentares. Os produtos alimentares transformados são cada vez mais a base da alimentação humana. Como consequência, a indústria láctea de produtos alimentares é uma actividade de grande relevo havendo a necessidade de ajustar o perfil do leite produzido às necessidades da transformação.

A empresa DANONE Portugal S. A., localizada no distrito de Castelo Branco, é uma empresa de lacticínios, que tem crescido como resultado do aumento do consumo de iogurte, produto de reconhecido benefício para a saúde humana.

Este trabalho, realizado no Sector de Bovinicultura da Escola Superior Agrária de Castelo Branco (vacaria vocacionada para a produção de leite em regime de semi-estabulação), tem como interesse para a empresa valorizar o leite na perspectiva da transformação em iogurte e presença de CLA (ácido linoleico conjugado).

Deste modo, com a realização deste trabalho, pretendemos avaliar o efeito que três regimes alimentares diferentes tiveram sobre a composição do leite produzido ao nível do teor butiroso (TB), teor proteico (TP), teor em lactose (TL), teor em sólidos totais (ST), ureia e composição da proteína e da gordura.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. O LEITE

O leite, segundo NP-572 de 1981, “ é o líquido segregado pelas glândulas mamárias da vaca em estado de saúde normal. Considera-se leite para fins alimentares, a secreção láctea obtida de uma ou mais ordenhas completas e ininterruptas, de uma ou mais fêmeas sadias, não fatigadas, mantidas em boas condições alimentares e de higiene, livre de substâncias estranhas, obtido com asseio e isento de colostro”.

Segundo a Directiva 92/46/CEE do Conselho (1992) “considera-se leite para consumo o leite cru: leite produzido pela secreção da glândula mamária de uma ou várias vacas, ovelhas, cabras ou búfalas, e não aquecido a uma temperatura superior a 40°C, nem submetido a um tratamento de efeito equivalente”.

A designação genérica do leite é aplicada exclusivamente ao leite de vaca, devendo o leite proveniente de outras espécies ser designado pelo nome da fêmea produtora.

O leite é constituído por uma mistura de diferentes substâncias de complexidade variável dispersas num meio aquoso. O valor do leite é função do seu conteúdo sólido, essencialmente gordura, proteína, açúcar, vitaminas e minerais.

Devido à riqueza da sua composição química é considerado um alimento de alto valor nutricional e de alta polivalência alimentar. Trata-se de um fluído biológico complexo, produzido pelas fêmeas dos mamíferos, variável de espécie para espécie (Quadro 1).

**Quadro 1** – Composição média do leite de vários mamíferos

<b>Espécie animal</b>	<b>Proteína (%)</b>	<b>Gordura (%)</b>	<b>Sólidos Totais (%)</b>	<b>Lactose (%)</b>	<b>Cinzas (%)</b>
<b>Bovino</b>	3,4	3,7	12,7	4,8	0,7
<b>Ovino</b>	5,5	7,4	19,3	4,8	1,0
<b>Caprino</b>	2,9	4,5	13,2	4,1	0,8
<b>Camelídeo</b>	3,9	5,4	15,6	5,1	0,7

Kaufmann *et al.* (1987) cit. por Nunes (2004)

A composição do leite varia dentro da mesma espécie, de raça para raça e individualmente

Raças seleccionadas para alta produção produzem leite com baixo conteúdo de sólidos totais. A gordura mostra mais variação entre raças que a proteína (Juarez e Ramos, 2003).

Os factores de variação da composição do leite podem-se dividir em dependentes do animal e externos ao animal.

Segundo Bencini e Pulina (1997), dos factores dependentes do animal são para além da raça e do seu próprio genótipo, os factores fisiológicos como a idade, número de partos, número de crias, fase da lactação, e estado de saúde. São factores externos ao animal as técnicas de ordenha e o material nela utilizado, bem como o maneio a que os animais estão sujeitos.

Coulon *et al.* (1998) refere a fase de lactação é o maior factor de variação da composição do leite, principalmente nos teores de gordura e proteína, conteúdo mineral e algumas enzimas como a plasmina.

Relativamente à fase de lactação, Juarez e Ramos (2003) referem que o colostro contém levados níveis de gordura e proteínas, a maioria são imunoglobulinas e baixos níveis de lactose. O abundante nível de proteína no leite decresce durante a 1ª semana pós-parto e depois aumenta gradualmente após o 1º mês até ao fim da lactação e a produção declina. O conteúdo em lactose cai levemente durante a lactação e mais rapidamente no fim.

A nutrição representa, também, um papel importante na produção e composição do leite, especialmente no conteúdo em gordura. A idade, a base genética do animal, a saúde dos animais, as condições ambientais e o manejo, são outros dos factores a ter em conta (Juarez e Ramos, 2003).

Bencini e Pulina (1997) referem que a má nutrição é a maior responsável pela diminuição do teor proteico do leite. Contudo, elevadas quantidades de proteína na dieta provocam um aumento da concentração de azoto não proteico, principalmente ureia, com prejuízo para a posterior transformação do leite.

Segundo os mesmos autores, dietas ricas em hidratos de carbono e pobres em fibras destabilizam as fermentações ruminais conduzindo a uma diminuição da produção do leite e do seu teor butiroso. O teor butiroso do leite apresenta uma correlação positiva com o teor de fibra da dieta.

A relação existente entre a composição do regime alimentar e os constituintes individuais do leite não é simples. Quer isto dizer que o aumento de um determinado constituinte no alimento nem sempre resulta num aumento da secreção de um constituinte similar no leite ou num aumento relativo da concentração de outros constituintes (Sutton, 1989).

Segundo o mesmo autor, este facto explica-se devido às complexas transformações que ocorrem durante a fermentação ruminal, às influências hormonais e às restrições fisiológicas e bioquímicas resultantes das vias através das quais os constituintes sólidos do leite são sintetizados e secretados pelas células da glândula mamária.

## 2.2. FRACÇÃO LIPÍDICA

O mecanismo através do qual se dá a síntese da gordura não é totalmente conhecido, embora se saiba que as moléculas de triglicéridos são sintetizadas pelo retículo endoplasmático da célula epitelial secretora.

À temperatura a que o leite é segregado a gordura apresenta-se numa emulsão microscópica de glóbulos de gordura dispersos em água. Os glóbulos de gordura tomam forma esférica e são estabilizados por uma membrana constituída principalmente por fosfolípidos e proteínas (Correia e Correia, 1985), com um diâmetro médio de 3 a 5  $\mu\text{m}$  podendo atingir 20  $\mu\text{m}$  (Danthine *et al.*, 2000).

A gordura do leite é constituída principalmente por triglicéridos, fosfolípidos, colesterol e glicolípidos. Os triglicéridos representam 98 a 99% do total dos constituintes (Correia e Correia, 1985).

Os triglicéridos por sua vez, constituídos por três ácidos gordos ligados a uma molécula de glicerol-1-fosfato. O glicerol chega à glândula mamária através da corrente sanguínea proveniente da hidrólise dos triglicéridos alimentares. Na célula epitelial secretora a enzima gliceroquinase converte-o em glicerol-1-fosfato.

Os ácidos gordos podem ter duas origens: síntese na glândula mamária ou corrente sanguínea. Embora outras espécies possam utilizar a glicose e o ácido acético para a síntese dos ácidos gordos, a vaca e os ruminantes em geral, usam apenas o ácido acético, uma vez que, não possuindo a enzima ATP-citrato-liase, não conseguem utilizar fora das mitocôndrias o acetil-CoA existente naquelas, proveniente da glicose a partir do ciclo de Krebs.

Os ruminantes obtêm o acetil-CoA por acção da acetil-CoA sintetase, uma enzima muito activa existente nas células epiteliais secretoras.

Através da enzima acetil-CoA-carboxilase, o acetil-CoA dá origem ao malonil. O malonil, através malonil-CoA é o principal responsável pela síntese de ácidos gordos de cadeia longa.

Contribuem também para a síntese de ácido gordos as lipoproteínas de baixa densidade e os produtos provenientes da via das pentoses, nomeadamente o NADPH<sub>2</sub> (Correia e Correia, 1985).

Cerca de 50% dos ácidos gordos dos triglicéridos do leite provêm da corrente sanguínea. No entanto admite-se que a glândula mamária consiga converter alguns ácidos gordos noutros. É o caso do ácido oleico (C18:1) que, existindo em maior quantidade no leite, é incorporado na glândula em menor quantidade que o ácido esteárico (C18:0), que por sua vez, existe em menor quantidade no leite. Admite-se que a glândula mamária sintetize parcialmente alguns ácidos gordos, como é o caso do palmítico (C16:0), havendo outros como o oleico (C18:1) que provêm exclusivamente da corrente sanguínea.

Admite-se que a existência de grande quantidade de ácidos gordos de cadeia curta, possuidores de um baixo ponto de fusão, contribua para manter a gordura num estado líquido (Luquet, 1990).

A gordura do leite é constituída por ácidos gordos saturados como, láurico (C12:0), mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0), que contribuem para o aumento de doenças cardiovasculares, quando utilizadas em quantidades acima das adequadas. Mas existem ácidos gordos do leite que são considerados benéficos para a saúde humana (Firkins *et al.*, 2004).

German *et al.* (1997), menciona que o leite de vaca contém ácidos gordos de cadeia curta em maior proporção do que ácidos gordos polinsaturados. A riqueza do leite de ruminante em ácidos gordos saturados deve-se à hidrogenação das gorduras no rúmen e à existência da enzima tioesterase II nas células epitéliais secretoras, que só sintetizam ácidos gordos de cadeia curta (< C16:0).

As gorduras ingeridas são hidrolizadas no rúmen por lipases de origem microbiana, dando origem a glicerol e ácidos gordos saturados e insaturados. Estes últimos sofrem hidrogenação por acção da população microbiana, num processo que constitui um mecanismo de defesa dos próprios microorganismos, pois, os ácidos gordos insaturados exercem um efeito detergente sobre a parede das bactérias (tóxico para os microorganismos). Como resultado da hidrogenação, os ácidos gordos são maioritariamente absorvidos na forma de saturados (German *et al.*, 1997).

O ácido linoleico conjugado (CLA) ocorre naturalmente na carne e leite dos ruminantes e é formado no rúmen e a sua concentração é influenciada pela estação do ano, dieta alimentar, não se sabendo se existem influências genéticas. Possui propriedades anti cancerígenas (Emanuelson *et al.*, 1999).

Nos ruminantes o ácido linoleico conjugado (CLA) as duplas ligações encontram-se normalmente nas posições 9 e 11, mas também nas posições trans7, cis9, cis11, trans13, trans10, e cis12, noutros isómeros que podem ocorrer (Ryhänen *et al.*, 2005)

O termo CLA é utilizado para o isómero do ácido linoleico, que contém uma ligação dupla insaturada (C18:2 cis9, trans11). A gordura de leite contém entre 3 e 6 mg de CLA/g gordura, mas os níveis de CLA variam de exploração para exploração. Logo, a forma de atenuar estas variações é intervir no regime alimentar (Wu *et al.*, 2005).

Segundo Doyle *et al.* (2003) o ácido butírico (C4:0), que se encontra presente unicamente no leite dos ruminantes, parece desempenhar um papel importante na prevenção do cancro cólon.

### 2.3. FRACÇÃO PROTEICA

A síntese proteica é análoga à síntese verificada noutros tecidos, as proteínas são sintetizadas nos polissomas – ribossomas associados a RNAm – existentes no retículo endoplasmático rugoso (Correia e Correia, 1985).

A fracção proteica do leite cru é constituída por proteínas solúveis e proteínas insolúveis.

As caseínas são proteínas insolúveis, fosfoproteínas, que precipitam por acidificação a pH 4.6 a 20°C. Possuem propriedades físicas que as diferenciam das restantes proteínas e que lhes permitem associarem-se em micelas, partículas em suspensão coloidal com dimensão entre 20 a 600µm. Membros desta família podem ser identificados pela técnica da electroforese. Existem quatro tipos principais de caseína, a  $\alpha$ S1-CN, a  $\alpha$ S2-CN, a  $\beta$ -CN e a k-CN. O grupo de proteínas solúveis, que coagulam por acção do calor, em condições normais, encontram-se solubilizadas no soro do leite e são a  $\beta$ -lactoglobulina, a  $\alpha$ -lactoalbumina, a soroalbumina, as imunoglobulinas e outras proteínas menores, principalmente, a protease-peptona e a lactoferrina, (Swaisgood *et al.*, 2004).

A  $\alpha$ S1-CN juntamente com a  $\alpha$ S2-CN representam 50% da caseína total, a  $\beta$ -CN 45% e a k-CN somente 5%. As proteínas do soro representam 17% das proteínas totais do leite de vaca (Luquet, 1990).

A captação dos aminoácidos pela glândula mamária depende da concentração arterial destes, do fluxo de sangue na glândula mamária e do fluxo de aminoácidos através dos tecidos. Os aminoácidos que chegam à glândula mamária sofrem polimerização para formar a proteína do leite ou para formar proteínas celulares ou entram em reacções metabólicas produzindo anidrido carbónico, ureia, poliaminas, aminoácidos não essenciais ou passam para o leite sem sofrerem qualquer alteração (aminoácidos livres) (DePeters e Cant, 1990).

As proteínas do leite são totalmente sintetizadas na glândula mamária a partir de aminoácidos que aí chegam via corrente sanguínea (Correia e Correia, 1985).

A disponibilidade dos aminoácidos essenciais, em particular a metionina, pode limitar a produção das proteínas do leite tal como a lisina, a histidina, a fenilalanina e a treonina podem limitar a caseína.

A glândula mamária tem a capacidade de sintetizar aminoácidos em falta com base noutros já existentes (Luquet, 1990).

Correia e Correia (1985), referem ainda que a glândula mamária da vaca é capaz de sintetizar todos os aminoácidos não essenciais, que depois irão integrar a constituição da caseína.

As caseínas, bem como a  $\alpha$ -lactoalbumina, a  $\beta$ -lactoglobulina e a lactoferrina são produzidas na glândula mamária, enquanto que as imunoglobulinas e a soroalbumina provêm da corrente sanguínea e são incorporadas no leite por simples filtração (Walter *et al.*, 2004).

Hoffman *et al.* (1991) referem que são os processos mamários de síntese proteica, controlados por múltiplas vias hormonais, os únicos responsáveis pela variação do teor de proteína do leite.

A síntese e secreção das proteínas do leite estão dependentes de processos intramamários complexos e da disponibilidade de determinados aminoácidos considerados limitantes (Hoffman *et al.*, 1991; Puyol *et al.*, 1995), factores que dificilmente serão afectados por variações da dieta dos animais, dado que a composição em aminoácidos dos alimentos que atingem o rúmen é completamente diferente daquela que atinge o intestino delgado. Assim sendo, um aumento dos níveis de concentrado na dieta provoca um aumento da produção, embora não aumente significativamente o teor proteico do leite, mas é improvável que altere as proporções relativas das classes de caseínas ou das variantes genéticas.

Segundo Nunes (2004), as variações do conteúdo proteico do leite tendem a acompanhar as da quantidade de leite e as da lactose. Assim, as soluções que provocam incremento na produção, também terão efeito positivo no conteúdo de proteína do leite.

## 2.4. A LACTOSE

A lactose é um glúcido específico do leite (Luquet, 1990). É um dissacárido formado pela união de uma molécula de  $\alpha$  ou  $\beta$  – glucose e outra de  $\beta$  – galactose (Sá e Barbosa, 1990).

Segundo Nunes (2004), é o açúcar mais abundante do leite e por isso um importante contribuinte energético da dieta humana.

A lactose é o constituinte do leite osmoticamente mais activo. A sua síntese ocorre aparentemente no complexo de Golgi e é secretada através de vesículas que se movem até à membrana apical e descarregam o seu conteúdo para os alvéolos.

A produção da lactose depende principalmente do aporte e disponibilidade de glucose e da indisponibilidade das unidades de ATP para o transporte da UDP – galactose. Esta reacção é catalizada por uma enzima, lactose-sintetase, que é composta por duas subunidades proteicas, a galactosil transferase e a  $\alpha$  – lactoalbumina (Correia e Correia, 1985).

As fontes de glucose são o ácido propiónico, o glicogénio, forma de reserva de glucose, os aminoácidos, o glicerol e o lactato.

A secreção láctea está intimamente relacionada à síntese da lactose. Há fixação de 90 l de água sempre que 50 g da lactose foram sintetizados, de onde a estreita ligação entre o nível de produção da lactose e o nível de secreção láctea (Luquet, 1990).

Nunes (2004) refere que a quantidade de leite será tanto mais elevada, quanto maior for a quantidade de lactose contida nas células epiteliais secretoras. Isto deve-se ao facto de a lactose estar relacionada com a mobilização de água pela célula secretora.

## 2.5. A PLASMINA

Durante a lactação as proteínas do leite sofrem proteólise. Esta pode ser causada por dois tipos de proteases: as próteses nativas, das quais a plasmina é a mais importante e as proteases microbianas, principalmente bactérias psicotróficas que se multiplicam durante a refrigeração e armazenamento do leite (Fajaro-Lira e Nielsen, 1998).

As proteínas do soro são consideradas relativamente resistentes às proteases nativas mas as CN são-lhes muito susceptíveis, principalmente a  $\beta$ -CN e a  $\alpha$ S2-CN (Aslam e Hurley, 1997).

A maior parte da actividade proteolítica do leite é devida à enzima plasmina (Aslam e Hurley, 1997). A plasmina é uma protease serínica, originária do sangue (Kaminogawa *et al.*, 1972, Halppap *et al.*, 1977, Eigel *et al.*, 1979 citados por Andrews, 1983). Foi pela primeira vez isolada no leite por Kaminogawa *et al.* (1972) tendo sido identificada como homóloga da plasmina sanguínea por Halppap *et al.* (1977) entre outros.

O aumento da actividade da plasmina aparece também associado ao aumento do número de células somáticas no leite. Estudos demonstram que, no leite mamítico, a actividade proteolítica é maior e está associada a um aumento da concentração de plasmina (Politis e Hang, 1989).

A plasmina encontra-se associada principalmente às micelas de CN embora também apareça em concentrações baixas no soro e na membrana do glóbulo de gordura do leite (Aslam e Hurley, 1997; Fajaro-Lira e Nielsen, 1998).

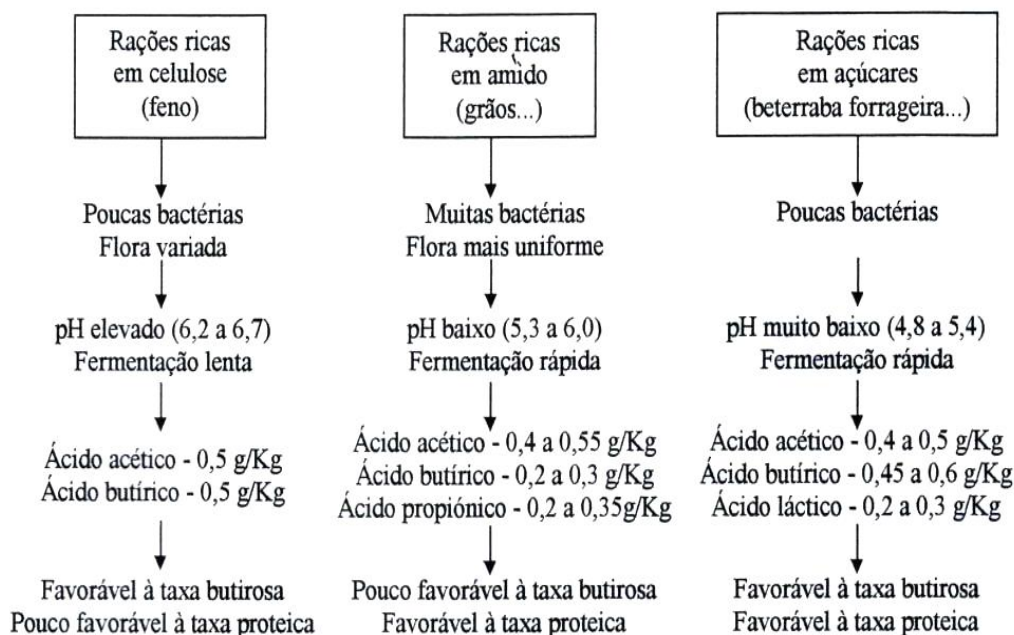
A proteólise das CN pode afectar a qualidade do leite e seus derivados. Fajaro-Lira e Nielsen (1998) consideram que esta pode ser responsável por defeitos como gelatificação do leite UHT e pelo desenvolvimento de sabor amargo no leite e seus derivados.

## 2.5. MANIPULAÇÃO DA ALIMENTAÇÃO

De entre os sólidos do leite a gordura é o mais susceptível a variações, enquanto que as alterações na concentração da proteína são mais reduzidas.

A composição do regime alimentar condiciona a formação dos ácidos gordos voláteis (AGV) no rúmen. Estes influenciam a composição do leite na sua síntese (Figura1).

**Figura 1** – Influência das diferentes rações sobre os AGV formados no rúmen e destes sobre a composição do leite



Luquet, 1990

Pelo aumento da quantidade de amido nas dietas para vacas leiteiras obtém-se um aumento na relação propionato:acetato no rúmen, com possíveis aumentos na proteína do leite e decréscimo na gordura (Murphy e O'Mara,1993).

Chamberlain e Wilkinson (1996), referem que vacas alimentadas com dietas ricas em amido degradável apresentam baixos níveis de gordura no leite quando comparadas com dietas com elevados teores em NDF.

Existem estudos que referem que a redução na relação forragem:concentrado das dietas origina normalmente uma diminuição na concentração de gordura no leite, enquanto que em muitas situações o aumento na ingestão de amidos conduz a aumentos na quantidade e concentração de proteína no leite (Sutton, 1989; Rook *et al.*, 1992).

A concentração de gordura, proteína e lactose do leite pode ser influenciada pela quantidade de energia ingerida, dieta, raça, variações genéticas, época do ano, idade da vaca e fase lactação (Doyle *et al.*, 2003).

Sutton (1989), citado por Doyle *et al.* (2003), refere que a concentração de gordura do leite pode ser alterada em 3%, por via alimentar, enquanto que a concentração de proteína em 0,6%.

Aumentando a proporção de concentrado/grosseiro, de 40/60 para 80/20, verifica-se um aumento da produção de leite, devido a uma maior percentagem e quantidade de lactose e diminuição do seu teor de gordura (Gaynor *et al.*, 1995).

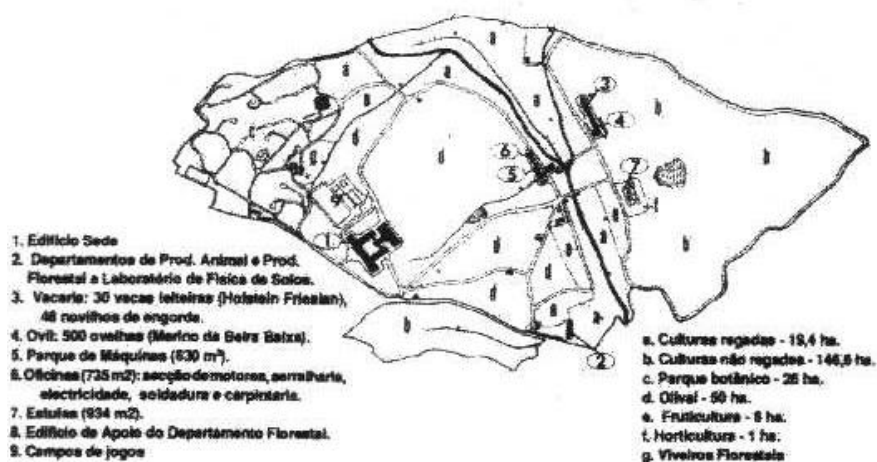
### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. CARACTERIZAÇÃO DA EXPLORAÇÃO

##### 3.1.1. LOCALIZAÇÃO DA EXPLORAÇÃO

O trabalho foi realizado na Escola Superior Agrária de Castelo Branco, localizada na Quinta Nossa Senhora de Mércules (latitude 39° 48'N; longitude 7° 29'W) que possui uma superfície total de 166ha (Figura 2).

**Figura 2** – Planta da Quinta Nossa Senhora de Mércules



Escola Superior Agrária de Castelo Branco (s/d)

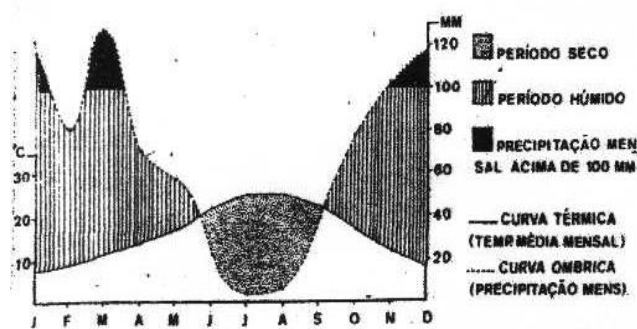
### 3.1.2. CARACTERÍSTICAS EDAFO-CLIMÁTICAS

Os solos são predominantemente ácidos com pH que varia de 4,6 a 5,5, com baixa fertilidade e fraca retenção de água (CNA, 1980).

Segundo o esquema da FAO para a carta de solos da Europa (CNA, 1978) o concelho de Castelo Branco possui pedologia Cambiossolos Dísticos.

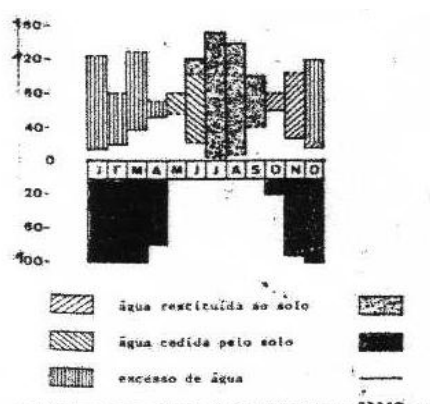
No clima, segundo Horta e Gomes (1984), no concelho de Castelo Branco, como se observa no diagrama ombrotérmico (1931-1960) (Figura 3), destaca-se um período seco e quente entre Junho e Setembro e outro húmido e frio que inclui os restantes meses do ano. Também se constata que a precipitação ocorre de forma irregular e concentra-se sobretudo no período de Inverno.

**Figura 3** – Diagrama Ombrotérmico de Castelo Branco (1931-1960)



Horta e Gomes (1984)

De acordo com os mesmos autores e em relação ao balanço hídrico (Figura 4), observa-se que entre Maio e Setembro existe um défice de água no solo. Durante as estações quentes ocorrem maiores perdas de água por evaporação (Horta, 1989).

**Figura 4** – Balanço Hídrico de Castelo Branco (1931-1960)

Horta e Gomes (1984)

A temperatura média mensal, durante o período 1931-1960, foi de 15,6°C verificando-se a menor média mensal em Janeiro (7,9°C) e a mais elevada em Julho (24,6°C). No mesmo período, a precipitação média anual foi de 827,3mm de chuva. A precipitação média mensal mais baixa foi em Julho (4,6mm) e a mais elevada foi no mês de Março (128,6mm) (Horta e Gomes, 1984).

### 3.2. DELINEAMENTO DA PARTE EXPERIMENTAL

Do total do efectivo bovino Holstein Friesian da instituição Escola Superior Agrária de Castelo Branco, foram escolhidas seis vacas na mesma fase de produção, com diferentes números de lactação e com partições em fim de Maio/ princípio de Julho de 2005.

O estudo decorreu num período de tempo em que as vacas (N=24) se encontravam na fase descendente da lactação (Setembro a Novembro 2005).

Utilizando o Sistema do NRC (2001) foram estimadas as necessidades dos animais em produção e formularam-se três regimes alimentares isoenergéticos (Quadro 2).

**Quadro 2** – Regimes alimentares formulados segundo o Sistema do NRC (2001)

	Pastagem	Silagem milho	Farinha milho	Feno luzerna	Feno aveia	Concentrado	MSI	Enet
<b>T1</b>			3kg*	8kg*	6kg*	7,5kg*	23,3kg	34,3Mcal
<b>T2</b>		40kg*		7kg*		7kg*	24,7kg	36,9Mcal
<b>T3</b>	40kg* <sup>a</sup>		1,5kg*		2,5kg*	9,5kg*	21,7kg	36,0Mcal

T1- regime base; T2- T1 com silagem de milho; T3- T1 com pastagem de regadio (festuca x trevo branco);

MSI- total de matéria seca ingerida; Enet- energia net; kg- kilograma; Mcal- megacaloria; g- grama;

\*- alimentos fornecidos em fresco; <sup>a</sup> estimativa de consumo.

Os animais tiveram como regime base feno de aveia e de luzerna, farinha de milho, palha (regada com melaço diluído com água) e alimento composto.

A variação do regime alimentar, durante o período de estudo, incidiu sobre a utilização base de silagem de milho ou, em substituição, de pastagem de regadio com consociação (gramínea x leguminosa). Assim sendo realizou-se um delineamento uni-factorial, para estudar o efeito de um único factor (regime alimentar) com três níveis, pastagem, feno e silagem de milho, sobre vários parâmetros (Anexo)(Montgomery, 2001).

Num período de catorze dias fez-se recolha de amostras de leite, antecedidas de um período de sete dias para habituação a cada um dos regimes alimentares.

### 3.3. ALIMENTAÇÃO, COLHEITA E ANÁLISES LABORATORIAIS

A recolha de amostras de silagem de milho, dos alimentos forrageiros e de alimento composto para análise laboratorial efectuou-se por duas vezes durante o período de tempo do estudo. Em relação à pastagem efectuou-se, antes de cada entrada e no dia seguinte à saída, um corte representativo por amostragem, para se estimar a quantidade disponível e a ingerida pelos animais em estudo.

No Laboratório de Nutrição da Escola Superior Agrária de Castelo Branco (ESACB) determinou-se: matéria seca (MS); cinzas; proteína bruta (PB); gordura bruta (GB); fibra bruta (FB) (alimento composto); NDF e ADF (alimentos forrageiros); pH (silagem milho) (Quadro 3).

**Quadro 3** – Composição analítica dos alimentos utilizados

	Pastagem	Silagem milho	Farinha milho	Feno luzerna	Feno aveia	Concentrado
<b>%MS</b>	20,42	28,44	98,57	90,58	94,32	91,27
<b>%MOMS</b>	89,51	94,91	97,88	89,97	93,98	87,32
<b>%NMS</b>		1,21	1,41	2,96	1,37	3,00
<b>%PBMS</b>	18,36	7,56	8,81	18,48	8,57	18,77
<b>%NDFMS</b>	42,65	50,18		36,58	63,48	
<b>%ADFMS</b>		25,68		28,73	37,70	
<b>%ADLMS</b>		2,39		7,44	4,54	
<b>%GBMS</b>	2,52		6,02	1,34	2,30	5,22
<b>%FBMS</b>			3,50			9,87
<b>%CinzasMS</b>	10,49	5,09	2,12	10,03	6,02	12,68

%- percentagem; MS- matéria seca; MOMS- matéria orgânica na matéria seca; NMS- azoto na matéria seca; PBMS- proteína bruta na matéria seca; NDFMS- fibra neutro detergente; ADFMS- fibra ácido detergente; ADLMS- lenhina ácido detergente; GBMS- gordura bruta na matéria seca; FBMS - fibra bruta na matéria seca; CinzasMS- cinzas na matéria seca.

### **3.4. COLHEITA E ANÁLISES LABORATORIAIS DO LEITE**

Efectuaram-se recolhas semanais de leite, quer do tanque de refrigeração quer individualmente das seis vacas seleccionadas para o estudo.

O leite foi recolhido na ordenha da manhã e da tarde, do mesmo dia, e a amostra do tanque foi recolhida do leite das duas ordenhas.

Na Estação Zootécnica Nacional efectuou-se a determinação dos ácido gordos, no Instituto Superior de Agronomia – Departamento de Agro-industrias e Agronomia Tropical – Secção de Ciência e Tecnologia de Alimentos quantificaram-se as caseínas por densitometria e nos laboratórios da ESACB realizaram-se utilizando os seguintes equipamentos e provas bioquímicas.

#### **3.4.1. DETERMINAÇÃO DOS SÓLIDOS TOTAIS (ST), DOS SÓLIDOS NÃO GORDOS (SNG), DO TEOR BUTIROSO (TB), PROTEICO (TP) E LACTOSE (TL)**

A determinação da percentagem dos parâmetros em simultâneo e com rapidez é realizada num aparelho que utiliza radiações infravermelhas nas suas leituras, o Milko-Scan (Milko-Scan Foss-Electric 133B),

O método de análise pelas radiações infravermelhas consiste no facto de que quase todas as substâncias orgânicas absorvem selectivamente certos comprimentos de onda da região infravermelha (IV) do espectro. Esta absorção é feita por intermédio de grupos funcionais de cada molécula de gordura, proteína, lactose e água.

Para aferir o Milko-Scan são realizadas, periodicamente, análises ao leite pelo método tradicional utilizando o Milko-Tester Gerber e Pro-Milk 29100 Gerber para determinação da gordura e da proteína do leite, respectivamente.

As amostras, antes de serem lidas, requerem termoestabilização, num banho-maria a 40°C, durante 30 minutos com agitação manual.

### 3.4.2. SEPARAÇÃO DA GORDURA DO LEITE

O leite não refrigerado nem pasteurizado ao ser submetido a uma centrifugação faz com que as micelas das proteínas tendam a sedimentar e, simultaneamente, a gordura flutue (Danthine *et al.*, 2000).

Os tubos de centrífuga com 10ml de leite são colocados na Centrífuga Refrigerada (Heraeus Sepatech – Biofuge 28 RS) e centrifugados à velocidade de 14 000 rpm, durante 30 minutos a 10°C. Nestas condições a gordura existente na superfície no final da centrifugação é retirada com auxílio de uma espátula, e rejeitada.

### 3.4.3. PRECIPITAÇÃO DAS CASEÍNAS

O leite desnatado é decantado para provetas contendo 40 ml de água destilada. Adiciona-se 1,5ml ácido acético a 10%, homogeneiza-se utilizando papel parafilme e, deixa-se repousar durante 15 minutos. De seguida, adiciona-se 4,5ml de acetato de sódio 0,25M, homogeneiza-se colocam-se as provetas no frigorífico durante a noite (Rowland, 1938).

Na manhã seguinte o sobrenadante é decantado, lentamente, e coloca-se o sedimento em tudo de centrífuga. Preenche-se o volume do tudo com água destilada e foram submetidos a centrifugação à velocidade de 5 000 rpm, durante 7 minutos a 10°C. Após centrifugação, decanta-se o sobrenadante e adiciona-se acetato de sódio 0,01M, para lavagem das caseínas, e centrifugam-se nas mesmas condições. As caseínas lavadas são dissolvidas em tampão ureia e colocadas em tubo graduado. Perfaz-se o volume de 6ml com tampão ureia e agita-se durante alguns segundos com auxílio de um agitador (Labinco – L46), para que o sedimento seja bem dissolvido (Rowland, 1938).

#### **3.4.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA (MÉTODO DO BIURETO)**

É um método utilizado rotineiramente para a determinação da concentração de proteínas em diferentes extractos biológicos. Este método é colorimétrico, depende da reacção do cobre em meio alcalino com azoto das ligações pépticas, havendo a formação de um complexo de cor violeta, que pode ser quantificado após determinação da absorvância no espectrofotómetro a 540nm (Gornall *et al.*, 1948). Requer a determinação de uma curva padrão utilizando concentrações proteicas conhecidas, normalmente de albumina de soro bovino.

Regra geral utiliza-se 0,1ml de amostra, a misturar com 1,9ml de água destilada e 4ml de biureto. Procede-se à duplicação de todos os tubos para que os resultados obtidos por média sejam mais fiáveis. Através do gráfico da curva padrão foram determinadas as concentrações das caseínas das diferentes amostras (Gornall *et al.*, 1948).

#### **3.4.5. ELECTROFORESE (“PHARMACIA LKB - PHASTSYSTEM”)**

A electroforese utilizada na separação das caseínas de leite de vaca foi a electroforese em zona contínua, utilizando um gel de concentração uniforme (“PhastGel – Homogeneous 20”) e um tampão homogéneo. O tampão de lavagem do gel, o tampão em que as caseínas se encontravam dissolvidas e o tampão existente nos eléctrodos tinham o mesmo pH (Brown *et. al.*, 1995).

O tampão usado para lavagem do gel é o mesmo utilizado para a dissolução das caseínas – 4,5M de ureia, 0,6M de ácido fórmico e 1,5M de ácido acético (tampão ureia).

O gel é lavado em 30ml de tampão durante 15 minutos. Esta operação é efectuada por três vezes, colocando-o posteriormente a escorrer. A lavagem do gel efectua-se para que o seu pH se iguale ao das amostras e dos eléctrodos.

As esponjas dos eléctrodos (“PhastGel Electrode Strips”) são colocadas submersas em tampão de eléctrodos durante 30 minutos, por duas vezes.

O gel é colocado, sobre 70µl (uma gota) de água destilada, na placa de arrefecimento da unidade de separação do aparelho “PhastSystem”. Deve-se evitar a formação de bolhas de ar por baixo, para não prejudicar a transferência de calor para a placa de arrefecimento. Em seguida, o suporte das esponjas dos eléctrodos e o eléctrodo de titânio platinizado de polaridade invertida são colocados sobre o gel (Pharmacia, s/d).

Na placa de alvéolos (“PhastGel Sample - Well Stamp”), previamente moldada com parafilme, é colocada 1µl de amostra (6µg/ µl), com uma micropipeta Hamilton e, com ajuda do aplicador de amostras (“PhastGel Sample Aplicator”) estas são inseridas no suporte das esponjas dos eléctrodos, na posição mais catódica do eléctrodo de titânio.

As condições do processo de separação de cada gel, estão referidas no Quadro 4 (Pharmacia, s/d).

**Quadro 4** – Condições do processo de separação do aparelho “PhastSystem”

Condições	Voltagem (V)	Corrente (mA)	Potência (W)	Temperatura (°C)	Tempo (VH)
Aplicação das amostras	400	10.0	2.0	15	10
Separação	400	10.0	2.0	15	2
	400	10.0	2.0	15	125

Quando a separação do gel está concluída procede-se à coloração do gel.

O gel é retirado da unidade de separação e colocado na unidade de coloração, acoplado à unidade de programação e controlo das condições de separação e coloração do aparelho “PhastSystem” (Pharmacia, s/d).

Na coloração do gel, este é colocado na posição inferior com a superfície a colorar para cima. Caso se queira colorar dois géis, coloca-se um gel na posição superior do suporte com a superfície a colorar para baixo e outro na posição inferior com a superfície a colorar para cima.

As soluções de lavagem, coloração e preservação, previamente preparadas, são colocadas nos respectivos tubos de PVC devidamente identificados.

No Quadro 5, podem ser observadas as condições do método de coloração que revela indistintamente todas as proteínas (Pharmacia, s/d).

**Quadro 5** – Condições do método de coloração do aparelho “PhastSystem”

<b>Solução</b>	<b>Porta de entrada</b>	<b>Porta de saída</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo (minutos)</b>
<b>Coloração</b>	4	0	25	7
	2	0	25	1
<b>Lavagem</b>	2	0	25	10
	2	0	25	15
<b>Preservação</b>	3	0	25	15

Concluído o processo de coloração, deixa-se secar o gel e cobre-se com uma fina camada de glicerol colocando sobre ele uma película de polietileno (a película que acompanha o gel, depois de lavada e seca). O excedente é retirado com papel filtro.

O gel é armazenado numa Placa de Petri à temperatura ambiente.

### **3.4.6. QUANTIFICAÇÃO DAS CASEÍNAS**

Utiliza-se um densitómetro “Ultra Scan X Laser Densitometer” que, através de laser, realiza as medições densitométricas das diferentes bandas existentes em cada fraccionamento, das amostras de caseína submetidas à electroforese.

Os densitogramas obtidos a partir da leitura são processados e integrados pelo programa informático “GelScan XL 2.1”.

### **3.4.7. EXTRACÇÃO DA GORDURA PARA DETERMINAÇÃO DOS ÉSTERES METÍLICOS DOS ÁCIDOS GORDOS (FAME’S)**

Num tubo de centrifuga com tampa, adiciona-se a 12ml de leite, 10ml de etanol e 1ml de ácido sulfúrico 2,5M. Num erlenmeyer com tampa, que contém um íman, coloca-se o conteúdo do tubo e adiciona-se 15ml de éter:heptano (1:1 ou v/v). Deixa-se agitar, na placa agitadora, durante 10 minutos e coloca-se no tubo de centrifuga o conteúdo do erlenmeyer. Após centrifugação à velocidade de 1 000 rpm durante 5 minutos, o sobrenadante, contendo a gordura em solução, é retirado para um balão que contém 1g de sulfato de sódio anidro. À fase inferior o procedimento da extracção efectua-se por mais duas vezes. O conteúdo do balão após as três extracções é filtrado para balões de fundo cónico, previamente pesado para posterior evaporação (Badings e de Jong, 1990).

No Evaporador Rotativo (Heidolph VV 2002) procede-se à evaporação dos solventes. O balão de fundo cónico, após evaporação total, é novamente pesado, para calcular a quantidade de gordura existente em cada amostra.

### **3.4.8. PREPARAÇÃO DOS ÉSTERES METÍLICOS DOS ÁCIDOS GORDOS (FAME'S)**

A gordura obtida após evaporação é dissolvida em 1ml de hexano (vortexar), adiciona-se 0,2ml de hidróxido de sódio (NaOH) 2N em metanol e agita-se durante 20 segundos num banho-maria a 50°C (Ryhänen *et al*, 2005). Assim, permite-se a hidrólise dos TAG (triacilglicerois).

A esterificação ou transmetilação dos ácidos gordos, realiza-se adicionando 0,4ml de ácido clorídrico (HCl) 1N em metanol, misturando no agitador vortex durante 10 segundos. Transfere-se a fase superior para copo de precipitação que contém 3g de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) anidro e agita-se em placa agitadora durante 30 minutos. Filtra-se a mistura em papel de filtro Whatman nº1 para tubo de cromatografia gasosa (GC) e armazena-se no frigorífico (Ryhänen *et al*, 2005) para posterior análise.

### **3.4.9. DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS GORDOS DO LEITE**

A cromatografia gasosa é uma técnica cromatográfica de coluna sendo o eluente (hidrogénio, diazoto, hélio, árgon) um gás (inerte relativamente à amostra e à fase estacionária) que atravessa a coluna, sob pressão (a qual contém a fase estacionária sólida ou líquida) arrastando consigo a amostra em estudo, pelo que é conhecido por gás arrastador (Pombeiro, 2003).

A separação dos ésteres metílicos dos ácidos gordos (FAME's) efectuou-se em dois cromatógrafos equipados com injector automático, detector de ionização de chama e como gás de arraste foi utilizado o Hélio.

No cromatógrafo da ESACB (“Hewlet Packard 3800”) com coluna (“Omegamax 250”) de 30m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m, “split ratio” 1/50, sendo temperatura do injector e do detector mantida a 250°C e 260°C, respectivamente. As condições de temperatura de separação dos ésteres metílicos dos ácidos gordos (FAME’s) são apresentadas no Quadro 6.

**Quadro 6** – Condições de separação dos ésteres metílicos dos ácidos gordos no cromatógrafo “Hewlet Packard 3800”

<b>Temperatura</b>	<b>Relação</b>	<b>Manter</b>	<b>Total</b>
(°C)	(°C/minutos)	(minutos)	(minutos)
50	0.0	2.00	2.00
165	15.0	22.00	31.67
195	2.0	12.00	58.67
230	10.0	5.00	67.17

No cromatógrafo “Hewlet Packard 5890” da EZN, com coluna (“CPSil 88”) de 100m x 0,25mm x 0,20 $\mu$ m, “split ratio” 1/20 e a temperatura do injector e do detector de 250°C e 280°C, respectivamente. As condições de temperatura de separação dos ésteres metílicos dos ácidos gordos (FAME’s) apresentam-se no Quadro 7.

**Quadro 7** – Condições de separação dos ésteres metílicos dos ácidos gordos no cromatógrafo “Hewlet Packard 5890”

<b>Temperatura</b>	<b>Relação</b>	<b>Manter</b>	<b>Total</b>
(°C)	(°C/minutos)	(minutos)	(minutos)
100	0.0	15.00	15.00
150	10.0	5.00	25.00
158	1.0	30.00	63.00
200	1.0	40.00	145.00

Segundo Kaushik e Agnihotri (1997), a cromatografia gasosa (GC) é um método excelente de separação dos ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME’s) pois apresenta elevada eficiência, selectividade, rapidez e simplicidade.

Porém Pombeiro (2003), refere que apresenta algumas limitações, tais como: exigência usual de amostras voláteis (ponto de ebulição inferior à temperatura de operação) e termicamente inertes.

### **3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Com os dados obtidos do ensaio e recorrendo ao programa estatístico SPSS realizou-se uma análise de variância para cada parâmetro, (Montgomery, 2001) tendo como objectivo estudar o efeito do factor regime alimentar sobre o parâmetro.

## 4. RESULTADOS

Analisando o Quadro 8 verificamos, que o regime alimentar influencia a composição do leite em relação ao ácido miristoléico (C14:1cis9) (pastagem 0,73% ( $\pm 0,28$ ), silagem milho 1,09% ( $\pm 0,22$ ), feno 0,91% ( $\pm 0,19$ )), ácido gordo isoC16:0 (pastagem 0,78% ( $\pm 0,08$ ), silagem milho 1,02% ( $\pm 0,21$ ), feno 0,89% ( $\pm 0,10$ )), ácido palmítico (C16:0) (pastagem 22,71% ( $\pm 1,76$ ), silagem milho 31,40% ( $\pm 2,93$ ), feno 25,84% ( $\pm 2,18$ )), ácido esteárico (C18:0) (pastagem 10,41% ( $\pm 1,81$ ), silagem milho 6,86% ( $\pm 1,38$ ), feno 8,21% ( $\pm 1,58$ )) e ácido oleico (C18:1cis9) (pastagem 20,94% ( $\pm 4,68$ )), silagem milho 14,56% ( $\pm 2,29$ ), feno 18,22% ( $\pm 3,35$ )) ( $p < 0,05$ ).

Pelo contrário, verificamos que não existem diferenças significativas entre os regime alimentares utilizados, em relação ao conteúdo do leite em: ácido butírico (C4:0) (pastagem 5,83% ( $\pm 1,72$ ), silagem milho 5,66% ( $\pm 1,61$ ), feno 6,13% ( $\pm 1,31$ )), ácido pentadecanóico (C15:0) (pastagem 0,44% ( $\pm 0,07$ ), silagem milho 0,49% ( $\pm 0,07$ ), feno 0,49% ( $\pm 0,06$ )) e ácido heptadecanóico (C17:0) (pastagem 0,47% ( $\pm 0,12$ ), silagem milho 0,48% ( $\pm 0,07$ ), feno 0,45% ( $\pm 0,04$ )) ( $p > 0,05$ ).

As percentagens de ácido cáprico (C10:0) (pastagem 2,99% ( $\pm 1,06$ ), silagem milho 3,63% ( $\pm 0,42$ )), ácido undecanóico (C11:0) (pastagem 0,34% ( $\pm 0,12$ ), silagem milho 0,43% ( $\pm 0,06$ )), ácido laúrico (C12:0) (pastagem 2,86% ( $\pm 0,97$ )), silagem milho 3,69% ( $\pm 0,47$ )) do regime alimentar pastagem são significativamente menores do que para a silagem milho ( $p < 0,05$ ).

**Quadro 8** – Influência dos diferentes regimes alimentares na composição em ácidos gordos do leite

	<b>N</b>	<b>Pastagem</b>	<b>Silagem milho</b>	<b>Feno</b>	<b>Sig</b>
<b>C4:0</b> (%)	24	5,83 ( $\pm 1,72$ )	5,66 ( $\pm 1,61$ )	6,13 ( $\pm 1,31$ )	NS
<b>C10:0</b> (%)	24	2,99 <sup>a</sup> ( $\pm 1,06$ )	3,63 <sup>b</sup> ( $\pm 0,42$ )	3,46 <sup>ab</sup> ( $\pm 0,74$ )	*
<b>C11:0</b> (%)	24	0,34 <sup>a</sup> ( $\pm 0,12$ )	0,43 <sup>b</sup> ( $\pm 0,06$ )	0,40 <sup>ab</sup> ( $\pm 0,09$ )	*
<b>C12:0</b> (%)	24	2,86 <sup>a</sup> ( $\pm 0,97$ )	3,69 <sup>b</sup> ( $\pm 0,47$ )	3,37 <sup>ab</sup> ( $\pm 0,65$ )	*
<b>C14:0</b> (%)	24	8,86 <sup>a</sup> ( $\pm 2,22$ )	11,88 <sup>b</sup> ( $\pm 1,07$ )	10,66 <sup>b</sup> ( $\pm 1,68$ )	*
<b>C14:1cis9</b> (%)	24	0,73 <sup>a</sup> ( $\pm 0,28$ )	1,09 <sup>b</sup> ( $\pm 0,22$ )	0,91 <sup>c</sup> ( $\pm 0,19$ )	*
<b>C15:0</b> (%)	24	0,44 ( $\pm 0,07$ )	0,49 ( $\pm 0,07$ )	0,49 ( $\pm 0,06$ )	NS
<b>isoC16:0</b> (%)	24	0,78 <sup>a</sup> ( $\pm 0,08$ )	1,02 <sup>b</sup> ( $\pm 0,21$ )	0,89 <sup>c</sup> ( $\pm 0,10$ )	*
<b>C16:0</b> (%)	24	22,71 <sup>a</sup> ( $\pm 1,76$ )	31,40 <sup>b</sup> ( $\pm 2,93$ )	25,84 <sup>c</sup> ( $\pm 2,18$ )	*
<b>C16:1cis9</b> (%)	24	1,40 <sup>ab</sup> ( $\pm 0,37$ )	1,58 <sup>a</sup> ( $\pm 0,30$ )	1,35 <sup>b</sup> ( $\pm 0,25$ )	*
<b>isoC17:0</b> (%)	24	0,45 <sup>a</sup> ( $\pm 0,05$ )	0,41 <sup>b</sup> ( $\pm 0,06$ )	0,42 <sup>ab</sup> ( $\pm 0,04$ )	*
<b>C17:0</b> (%)	24	0,47 ( $\pm 0,12$ )	0,48 ( $\pm 0,07$ )	0,45 ( $\pm 0,04$ )	NS
<b>C18:0</b> (%)	24	10,41 <sup>a</sup> ( $\pm 1,81$ )	6,86 <sup>b</sup> ( $\pm 1,38$ )	8,21 <sup>c</sup> ( $\pm 1,58$ )	*
<b>C18:1cis9</b> (%)	24	20,94 <sup>a</sup> ( $\pm 4,68$ )	14,56 <sup>b</sup> ( $\pm 2,29$ )	18,22 <sup>c</sup> ( $\pm 3,35$ )	*
<b>C18:2(n-6)</b> (%)	24	2,22 <sup>a</sup> ( $\pm 0,47$ )	1,73 <sup>b</sup> ( $\pm 0,39$ )	2,55 <sup>a</sup> ( $\pm 0,79$ )	*
<b>C18:3(n-3)</b> (%)	24	0,44 <sup>a</sup> ( $\pm 0,23$ )	0,38 <sup>ab</sup> ( $\pm 0,10$ )	0,33 <sup>b</sup> ( $\pm 0,15$ )	*
<b>CLA</b> (%)	24	1,03 <sup>a</sup> ( $\pm 0,33$ )	0,66 <sup>b</sup> ( $\pm 0,20$ )	0,88 <sup>a</sup> ( $\pm 0,21$ )	*

<sup>a,b,c</sup> notações diferentes na mesma linha correspondem a  $p < 0,05$  e são significativamente diferentes; NS – não existem diferenças significativas ( $p > 0,05$ ); \* $p < 0,05$ ; N – tamanho amostra; %- percentagem.

O leite obtido do regime alimentar à base de pastagem tem uma menor percentagem em ácido mirístico (C14:0) ( $8,86\% \pm 2,22$ ) comparativamente com os outros dois regimes alimentares, feno ( $10,66\% \pm 1,68$ ) e silagem milho ( $11,88\% \pm 1,07$ ) ( $p < 0,05$ ).

Com um regime alimentar à base pastagem, o leite produzido tem uma percentagem  $1,40\%$  ( $\pm 0,37$ ) em ácido palmitoléico (C16:1cis9) ( $p > 0,05$ ). Este valor intermédio está muito próximo dos resultados obtidos com os regimes alimentares à base de feno ( $1,35\% \pm 0,25$ ) e de silagem milho ( $1,58\% \pm 0,30$ ).

Uma alimentação à base de pastagem proporciona a presença de  $2,22\%$  ( $\pm 0,47$ ) de ácido linoleico (C18:2(n-6)) enquanto que com uma alimentação à base de feno, o leite, apresenta um valor ligeiramente superior  $2,55\%$  ( $\pm 0,79$ ) ( $p > 0,05$ ). A silagem de milho, como base do regime alimentar, não favorece a presença em ácido linoleico, pois o leite obtido é o que apresenta o valor mais baixo ( $1,73\% \pm 0,39$ ).

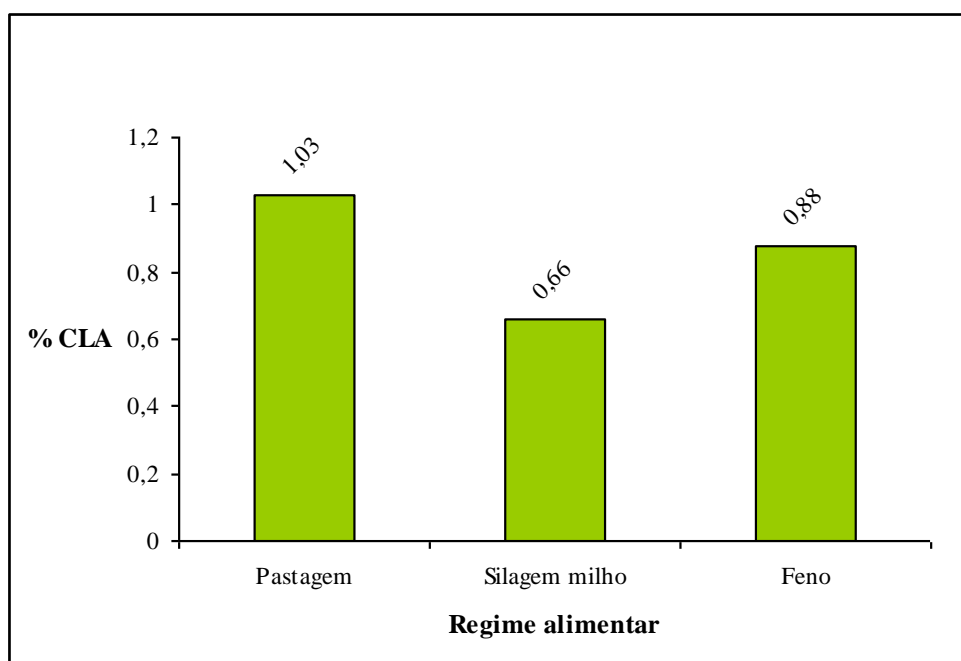
A percentagem do ácido linolénico (C18:3(n-3)) é significativamente mais elevada ( $p < 0,05$ ) no leite do regime alimentar pastagem ( $0,44\% \pm 0,23$ ) do que no leite produzido a partir dos regimes alimentares feno ( $0,33\% \pm 0,15$ ) e silagem milho ( $0,38\% \pm 0,10$ ) ( $p > 0,05$ ).

O valor em CLA (C18:2cis9trans11) no leite obtido com a alimentação base de pastagem é mais elevado ( $1,03\% \pm 0,33$ ) do que o obtido no leite produzido com base em silagem milho ( $0,66\% \pm 0,20$ ) ( $p < 0,05$ ) e feno ( $0,88\% \pm 0,21$ ).

Resumindo os resultados apresentados no Quadro 8, podemos verificar que a pastagem favorece a presença no leite de ácidos gordos de cadeia longa, tais como esteárico (C18:0) ( $10,41\% \pm 1,81$ ), o oleíco (C18:1cis9) ( $20,94\% \pm 4,68$ ), o linolénico (C18:3(n-3)) ( $0,44\% \pm 0,23$ ) e o CLA ( $1,03\% \pm 0,33$ ).

Pela observação do Gráfico 1 podemos confirmar que o leite obtido de um regime alimentar à base de pastagem tem 36% mais CLA do que o leite proveniente de um regime alimentar à base de silagem milho e 15% mais do que um leite obtido a partir de um regime alimentar onde predomina o feno.

**Gráfico 1** – Ácido linoleico conjugado (CLA).

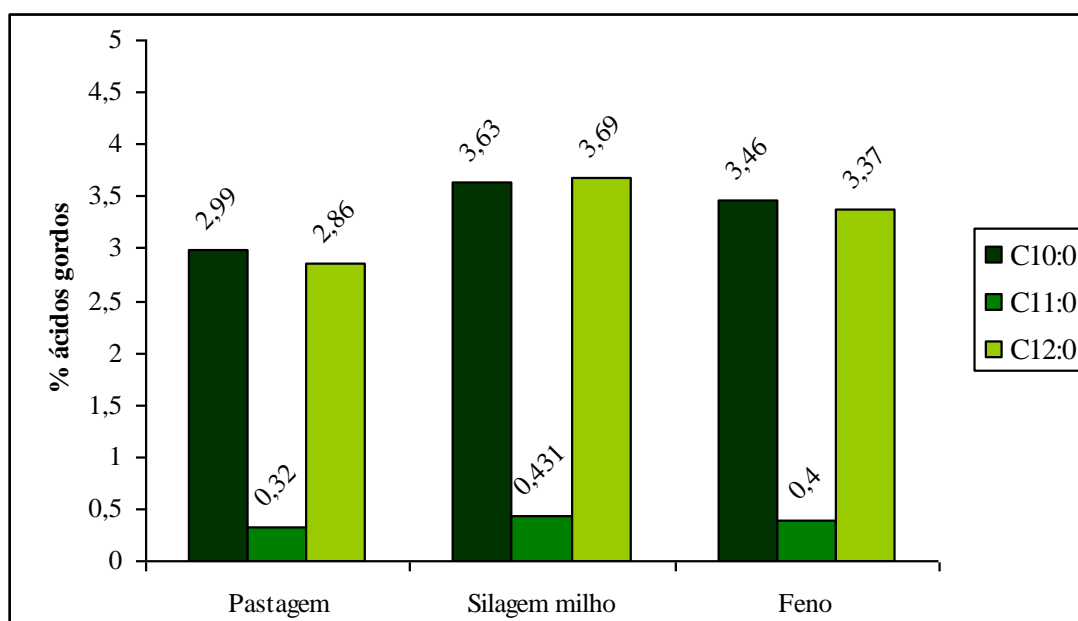


Entre os resultados obtidos, a percentagem do ácido gordo isoC17:0, é significativamente menores para a silagem milho ( $0,41\% \pm 0,06$ ) ( $p < 0,05$ ).

Relativamente aos ácidos gordos de cadeia curta, cáprico (C10:0) (2,99%  $\pm$ 1,06), undecanoico (C11:0) (0,34%  $\pm$ 0,12), laúrico (C12:0) (2,86%  $\pm$ 0,97), mirístico (C14:0) (8,86%  $\pm$ 2,22), miristoléico (C14:1cis9) (0,735  $\pm$ 0,28), pentadecanoico (C15:0) (0,44%  $\pm$ 0,07), isoC16:0 (0,78%  $\pm$ 0,08), palmítico (C16:0) (22,71%  $\pm$ 1,76), palmitoléico (C16:1cis9) (1,40%  $\pm$ 0,37), o leite proveniente da alimentação à base de pastagem contém uma menor percentagem. Quando a base da dieta é a silagem milho a percentagem em ácidos gordos de cadeia curta é mais elevada, comparativamente com a pastagem e o feno ( $p < 0,05$ ).

O Gráfico 2 ilustra o facto acima referido, isto é, comparando os diferentes regimes alimentares, verificamos que o leite proveniente de uma alimentação à base de pastagem apresenta uma percentagem menor de ácidos gordos de cadeia curta ( $p < 0,05$ ).

**Gráfico 2** – Ácidos gordos de cadeia curta (C10:0, C11:0 e C12:0).



No Quadro 9 podemos verificar que a silagem de milho favorece o teor butiroso (4,04%  $\pm$ 0,76) e o teor proteico do leite (3,18%  $\pm$ 0,20), enquanto que os valores de produção de leite (207,18kg  $\pm$ 28,86) e ureia (171,67ppm  $\pm$ 44,33) são mais baixos comparados com os do leite produzido com base noutra tipo de alimentação ( $p < 0,05$ ).

**Quadro 9** – Influência dos diferentes regimes alimentares nos parâmetros químicos (teor butiroso, teor proteico, produção de leite e ureia).

	N	Pastagem	Silagem milho	Feno	Sig
<b>Teor butiroso</b> (%)	24	3,81 ( $\pm$ 0,52)	4,04 ( $\pm$ 0,76)	3,66 ( $\pm$ 0,66)	NS
<b>Gordura</b> (kg)		8,75	8,37	8,15	
<b>Teor proteico</b> (%)	24	3,09 <sup>ab</sup> ( $\pm$ 0,28)	3,18 <sup>a</sup> ( $\pm$ 0,20)	2,98 <sup>b</sup> ( $\pm$ 0,21)	*
<b>Proteína</b> (kg)		7,09	6,58	6,63	
<b>Produção leite</b> (l)	24	229,69 <sup>a</sup> ( $\pm$ 25,03)	207,18 <sup>b</sup> ( $\pm$ 28,86)	222,69 <sup>ab</sup> ( $\pm$ 26,52)	*
<b>Ureia</b> (ppm)	24	225,92 <sup>a</sup> ( $\pm$ 74,95)	171,67 <sup>b</sup> ( $\pm$ 44,33)	194,58 <sup>ab</sup> ( $\pm$ 64,46)	*

<sup>a,b,c</sup> notações diferentes na mesma linha correspondem a  $p < 0,05$  e são significativamente diferentes; NS – não existem diferenças significativas ( $p > 0,05$ ); \* $p < 0,05$ ; N – tamanho amostra; ppm – parte por milhão; % - percentagem; l – litro; kg – kilograma.

Em relação ao teor proteico, os resultados obtidos no regime alimentar à base de feno (2,98%  $\pm$ 0,21) apresenta diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparada com o obtido com a silagem milho (3,18%  $\pm$ 0,20) e com a pastagem entre os quais não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ).

No quadro acima mencionado verificamos que não existem diferenças significativas entre diferentes regimes alimentares e o teor butiroso do leite (pastagem 3,81% ( $\pm$ 0,52), silagem milho 4,04% ( $\pm$ 0,76), feno 3,66% ( $\pm$ 0,66)) ( $p > 0,05$ ).

Visualizando o Quadro 9 podemos referir que um leite produzido com uma alimentação à base de pastagem contém, por litro, mais gordura e proteína do que um leite produzido com um regime alimentar base em silagem de milho e/ou feno.

Pela leitura do Quadro 10 verificamos que não existem diferenças significativas entre os diferentes regimes alimentares em relação ao conteúdo do leite em: caseína k (pastagem 8,90% ( $\pm 2,09$ ), silagem milho 8,24% ( $\pm 2,22$ ), feno 7,90% ( $\pm 2,80$ )), caseína  $\beta$  (pastagem 30,57% ( $\pm 7,36$ ), silagem milho 26,52% ( $\pm 9,63$ ), feno 26,41% ( $\pm 7,04$ )), caseína  $\alpha S1$  (pastagem 43,34% ( $\pm 7,94$ ), silagem milho 41,57% ( $\pm 6,03$ ), feno 39,40% ( $\pm 4,79$ )) e caseína  $\alpha S2$  (pastagem 8,64% ( $\pm 2,80$ ), silagem milho 7,23% ( $\pm 3,61$ ), feno 7,56% ( $\pm 2,56$ )) ( $p > 0,05$ ).

**Quadro 10** – Influência dos diferentes regimes alimentares na composição em caseínas

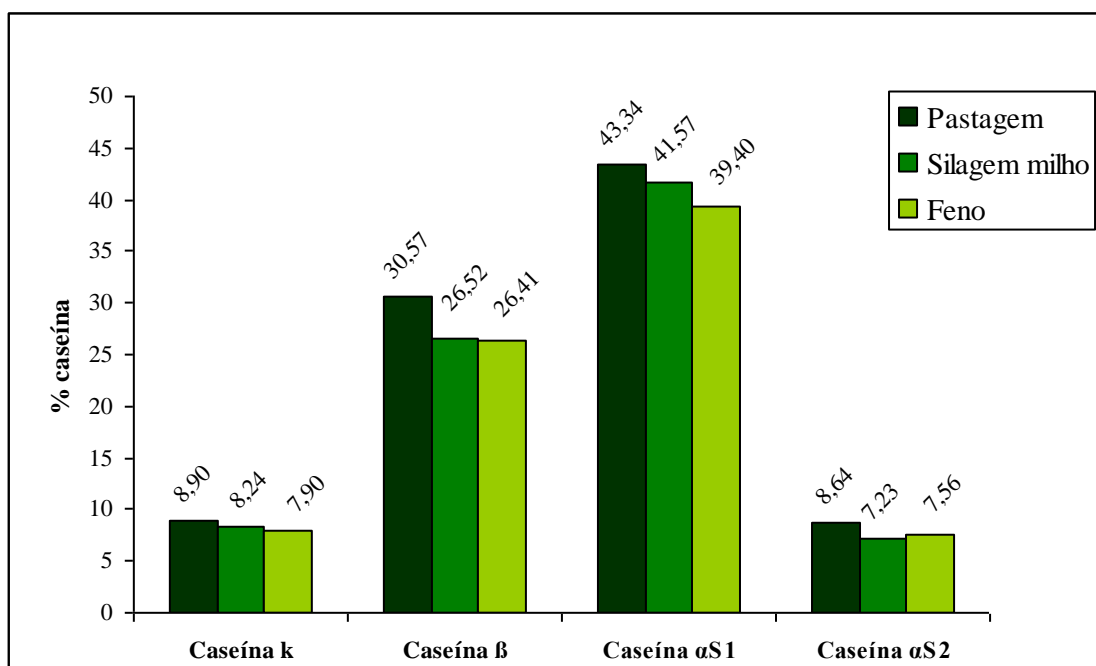
	N	Pastagem	Silagem milho	Feno	Sig
<b>Caseína k (%)</b>	24	8,90 ( $\pm 2,09$ )	8,24 ( $\pm 2,22$ )	7,90 ( $\pm 2,80$ )	NS
<b>Caseína <math>\beta</math> (%)</b>	24	30,57 ( $\pm 7,36$ )	26,52 ( $\pm 9,63$ )	26,41 ( $\pm 7,04$ )	NS
<b>Caseína <math>\alpha S1</math> (%)</b>	24	43,34 ( $\pm 7,94$ )	41,57 ( $\pm 6,03$ )	39,40 ( $\pm 4,79$ )	NS
<b>Caseína <math>\alpha S2</math> (%)</b>	24	8,64 ( $\pm 2,80$ )	7,23 ( $\pm 3,61$ )	7,56 ( $\pm 2,56$ )	NS
<b>Total (%)</b>		91,45 ( $\pm 20,19$ )	83,56 ( $\pm 21,49$ )	81,27 ( $\pm 17,19$ )	

<sup>a,b,c</sup> notações diferentes na mesma linha correspondem a  $p < 0,05$  e são significativamente diferentes; NS – não existem diferenças significativas ( $p > 0,05$ ); \* $p < 0,05$ ; N – tamanho amostra; % - percentagem

No Quadro 10 podemos perceber que, mesmo não existindo diferenças significativas entre os diferentes regimes alimentares na composição em caseínas, no total em percentagem o leite obtido com base na pastagem (91,45%  $\pm 20,19$ ) apresenta um valor mais elevado nas diferentes fracções caseínicas do que o da silagem milho (83,56%  $\pm 21,49$ ) e/ou feno (81,27%  $\pm 17,19$ ) ( $p > 0,05$ ). Esta situação permite-nos afirmar que o rendimento de transformação do leite em queijo ou iogurte é maior quando alimentamos os animais com pastagem.

No Gráfico 3 podemos visualizar o referido anteriormente, isto é, o leite obtido do regime alimentar à base de pastagem tem uma maior percentagem das diferentes fracções caseínicas analisadas, comparativamente com o leite dos outros regimes alimentares (silagem milho e feno).

**Gráfico 3** – Fracções caseínicas do leite



## 5. DISCUSSÃO

No presente trabalho os resultados obtidos confirmam o facto de que o leite produzido com uma alimentação à base de pastagem favorece o aumento de CLA (Ryhänen *et al.*, 2005). De acordo com vários autores, o CLA é considerado um potencial anti cancerígeno (Parodi, 1999; Kritchevsky, 2000 citado por Ryhänen *et al.*, 2005).

Para o ácido butírico (C4:0), que parece desempenhar um papel importante na prevenção do cancro cólon e se encontra unicamente no leite dos ruminantes (Doyle *et al.*, 2003), obtiveram-se valores que variam entre 5 a 6%, nos diferentes regimes alimentares.

Com o regime alimentar pastagem, verifica-se uma redução nos níveis dos ácidos gordos de cadeia curta e o aumento dos valores do ácido esteárico (C18:0) e oleico (C18:1cis9), tal como foi obtido em estudos realizados por Williams (2000).

Segundo Chilliard *et al.* (2001) um leite produzido com um regime alimentar à base silagem milho contém 12-14% ácido mirístico (C14:0), 30-34% ácido palmítico (C16:0), 6-11% ácido esteárico (C18:0) e 18-23% ácido oleico (C18:1cis9). Os resultados por nós obtidos com excepção do ácido oleico (C18:1cis9), estão dentro dos valores considerados aceitáveis para Chilliard *et al.* (2001).

Em relação ao nível proteico do leite obtido a partir dos diferentes regimes alimentares, verifica-se que o que tem por base silagem milho contém um valor mais elevado. No entanto, se este aspecto é importante, mais importante é as quantidades de caseína presentes no leite. Analisando os valores das diferentes fracções caseínicas, a pastagem é o alimento que proporciona valores mais elevados, tal como mencionaram Hoffman *et al.* (1991) e Puyol *et al.* (1995).

Verificou-se que, quando o regime alimentar incluía silagem de milho a produção de leite foi mais baixa e o teor butiroso mais elevado enquanto que no caso da alimentação ter por base pastagem a produção de leite foi mais elevada com um teor butiroso mais baixo. Segundo Sutton (1989) a silagem milho que, sendo rica em glúcidos facilmente fermentescíveis, tem um reflexo negativo no teor butiroso. Os nossos resultados não confirmam esta tendência provavelmente porque o regime alimentar incluía 26% feno luzerna e a silagem de milho utilizada com 50,18% NDF, correspondeu a 47% do total da matéria seca ingerida, perfazendo um total de 73% de alimentos forrageiros consumidos diariamente. Outra explicação, poderá ter sido a produção de leite mais baixa e, conseqüentemente, o teor butiroso mais elevado de entre os três regimes alimentares.

Kirst *et. al.* (1996) admite como intervalo fisiológico de ureia no leite valores entre 150 a 300 ppm. As quantidades por nós obtidas encontram-se dentro deste intervalo. Contudo verificamos que o valor obtido com o regime alimentar silagem milho é mais baixo que o obtido para pastagem. Como explicação, este facto deve-se à silagem milho ser rica em glúcidos facilmente fermentescíveis o que permite que a população microbiana do rúmen tenha à sua disposição energia sob a forma de ATP aproveitando, de forma mais eficiente, o amoníaco resultante da degradação da proteína alimentar.

Após análise dos resultados é pertinente referir que o estudo não se deveria ter realizado na fase decrescente da produção. Isto porque nesta fase as necessidades nutricionais diminuem e a capacidade de ingestão deixa de ser um factor limitante, passando a vaca a recuperar o peso que havia perdido. Deste modo, a fase inicial da lactação seria o período óptimo, pois caracteriza-se pela sua elevada receptividade e sensibilidade às alterações alimentares. Assim sendo, no início da lactação a melhoria quantitativa e qualitativa das dietas provoca claras melhorias na produção de leite de vaca, esta resposta deve-se ao facto dos animais mobilizarem reservas nesta fase.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS**

A composição e as propriedades funcionais do leite são de considerável importância quer para o produtor, transformador e consumidor.

Este facto deve-se a que o leite, no futuro e devido ao facto da Europa ser excedentária em gordura, a indústria transformadora de leite irá valorizar o produto não pelo seu teor butiroso, mas sim pelo seu teor proteico.

Sabe-se também há necessidade de cativar o consumidor. Então, o transformador terá de arranjar forma de o fazer. Assim sendo, a melhor forma é mostrando que o consumo dos seus produtos é benéfico para a sua saúde.

Hoje em dia o CLA é um dos ácidos gordos mais estudados devido a ser considerado anti cancerígeno.

Com este trabalho mostrou-se que a utilização da pastagem está associada ao bem estar animal.

A pastagem permite que se obtenha leite com valores mais elevados de CLA. Mesmo tendo teores proteicos mais baixos, apresenta uma fracção caseínica mais elevada com vantagem para a transformação.

No futuro será indispensável realizar mais estudos, principalmente em relação às diferentes fracções caseínicas tão importantes para a transformação do leite em queijo e iogurtes.

## 7. BIBLIOGRAFIA

Andrews, A. T. (1983). Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *Journal of Dairy Research*, **50**, 45:55.

Aslam, M., Hurley, W. L. (1997). Proteolysis of milk proteins during involution of bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*, **80**, 2004:2010.

Badings, H. T., de Jong, C. (1990). Determination of free fatty acids in milk and cheese. Procedures for extraction, clean up, and capillary gas chromatographic analysis. *Journal of High Resolution Chromatography*, **13**,94:98.

Baudet, H. M. (1991). Factors affecting the composition of cows milk. *Annales de Medecine Veterinaire*, **134** (7), 441:452.

Bencini, R., Pulina G. (1997). The quality of sheep milk: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, **37**, 485:504.

Brow, J. R., Law, A. J. R., Knight, C. H. (1995). Changes in casein composition of goat's milk during the course of lactation: physiological interfaces and technological implications. *Journal Dairy Research*, **62**, 431:439.

Chamberlain, A. T., Wilkinson, J. M., (1996). *Feeding the dairy cow*. 1ª edição. Lincoln. UK.

Chilliard, Y., Ferlay, A., Doreau, M. (2001). Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. Review. *Livestock Production Science*, **70**, 31:48.

CNA (1978). *Cartas de solos*. Comissão Nacional do Ambiente. Lisboa.

CNA (1980). *Acidez e alcalinidade dos solos*. Comissão Nacional do Ambiente. Lisboa.

Correia, A. A. D., Correia, J. H. R. D. (1985). *Bioquímica Animal*. 2ª edição. Fundação Calouste Gulbenkian.

Coulon, J. B., Verdier, I., Pradel, P., Almena, M. (1998). Effects of lactation stage on the cheesemaking properties of milk and the quality of Saint-Nectaire-type cheese. *Journal of Dairy Research*, **65**, 295:305.

Danthine, S., Blecker, C., Paquot, M., Innocente, N., Deroanne, C. (2000). Évolution des connaissances sur la membrane du globule gras du lait: synthèse bibliographique. *Lait*, **80**, 209:222.

DePeters, E. J., Cant, J. P. (1990). Factors influencing the nitrogen composition of milk. *Journal of Dairy Science*, **73**, 241.

Directiva 92/46/CEE do Conselho (1992). *JO n° L 268 de 14, 3* (Downloaded from [http://europa.eu.int/eur-lex/pt/lif/dat/1997/pt\\_397D0080.html](http://europa.eu.int/eur-lex/pt/lif/dat/1997/pt_397D0080.html)).

Doyle, P. T., Shen, Z., Birkett, A., Dalley, D. E., Wales, W. J., Walker, G. P., Stockdale, C. R. (2003). Influence of pasture and concentrates in diet of grazing dairy cows on the fatty acid composition of milk. *Journal of Dairy Research*, **70**, 267:276.

Emanuelson, M., Åkerlind, M., Holtenius, K., Bertilsson, J. (1999). Milk composition and feed intake in dairy cow selected for high or low milk fat percentage. *Livestock Production Science*, **59**, 1:11.

Fajardo-Lira, C. E., Nielsen, S. S. (1998). Effect of psychotropic microorganisms on the plasmin system of milk. *Journal of dairy Science*, **81**(4), 901:908.

Firkins, J. L., Eastridge, M. L., Qui, X. (2004). Effects of dry matter intake, addition of buffer, and source of fat on duodenal flow and concentration of conjugated linoleic acid and tran-11 C18:1 in milk. *Journal Dairy Science*, **87**, 4278:4286.

Gaynor, P. J., Waldo, D. R., Capuco, A. V., Erdman, R. A., Douglas, L. W., Teter, B. B. (1995). Milk fat depression, the glucogenic theory, and trans C18:1 fatty acids. *Journal Dairy Science*, **78**, 2008.

German, J. B., Morand, L., Dillard, C. J., Xu, R. (1997). Milk fat composition: targets for alteration of function and nutrition. *Milk composition, production and biotechnology in Biotechnology in Agriculture Series*, **18**, 39:72. Ed. Welch, R. A. S., Burns, D. J. W., Davis, S. R., Popay, A. I., Prosser, C. G.. CAB International.

Gornall, A. G., Bardawill, C. J., David, M. M. (1948). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. Department of Pathological Chemistry, University of Toronto, Toronto, Canada. *The Journal of Biological Chemical*, 751:766 (Downloaded from [www.jbc.org](http://www.jbc.org)).

Grummer, R. R. (1991). Effect of feed on the composition of milk fat. *Journal Dairy Science*, **74**, 3244:3257.

Hoffman, P. C., Gummer, R. R., Shaver, R. D. (1991). Feeding supplemental fat and undegraded intake protein to early lactation dairy cows. *Journal Dairy Science*, **74**, 3468:3474.

Horta, M. C., Gomes, M. F. (1984). *Caracterização climática de Castelo Branco*. Escola Superior Agrária. Instituto Politécnico Castelo Branco. Castelo Branco.

Horta, M. C. (1989). *Evaporação, estudo da evaporação e dos factores que a afectam para Castelo Branco no período de 1985/88*. Escola Superior Agrária. Instituto Politécnico de Castelo Branco. Castelo Branco.

Hullár, I., Brand, A. (1993). Nutritional factors affecting milk quality, with especial regard to milk protein: a review. *Acta Veterinaria Hungarica*, **41** (1-2), 11:32. Akadémiai Kiadó. Budapest.

Kaushik, N., Agnihotri, A. (1997). Evaluation of improved method for determination of rapeseed-mustard FAME's by GC. *Chromatographia*, **vol. 44**, nº 1/2, 97:99.

Kirst, E., Krenkel, K., Jacobi, U. (1996). Research on the urea content of milk for the evaluation of feedstuffs. *DMZ- Lebensmittelindustrie-und-Milchwirtschaft*, **117 (13)**, 601:610.

Juarez, M., Ramos, M. (2003). Sheep/ Milk. In: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*, 2ª edição (ed. Caballero, B., Trugo, L. C., Finglas, P. M.), **8**, 5198: 5203. Academic Press, Reino Unido.

Luquet, F. M. (1990). *O leite, do úbere à fábrica dos lacticínios*. Vol.1. Euroagro. Publicações Europa América.

Montgomery, D. C. (2001). *Design and analysis of experiments*. 5<sup>th</sup> edition. John Wiley Sons, Inc.. Arizona State University.

Murphy, J. J. (2000). Synthesis of milk fat and opportunities for nutritional manipulation. In: *Milk Composition*, 201:222. Occasional Publication N°25 of the British Society of Animal Science.

Murphy, J. J., O'Mara, F. (1993). Nutritional manipulation of milk protein concentration and its impact on dairy industry. *Livestock Production Science*, **35**, 117:134.

National Research Council (NRC) (2001). *Nutrient requirements of dairy cattle*. Seventh Revised Edition. National Academy Press, Washington, D. C., USA.

Norma Portuguesa – NP – 572 (1981). *Leite. Definição e classificação. Recolha de normas portuguesas. Leite e lacticínios*. Instituto Português de Qualidade. Lisboa. Portugal.

Nunes, A. F. (2004). *Leite mecanismos de produção*. FENALAC, Federação Nacional das Cooperativas de Produtores de Leite, Vila do Conde.

Parodi, W. W. (1999). Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, **82**, 1339:1349.

Pharmacia (s/d). *Users Manual- PhastSystem<sup>TM</sup>*.

Politis, I., Hang, K. F. (1989). Environmental factors affecting plasmin activity in milk. *Journal of Dairy Science*, **72**(7), 1713:1718.

Pombeiro, Armando J. Latourrette O. (2003). *Técnicas e operações unitárias em química laboratorial*. 4ª edição. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.

Puyol, P., Pérez, M. D., Mata, L., Calvo, M. (1995). Study on interaction between  $\beta$ -lactoglobulin and other bovine whey proteins with ascorbic acid. *Milchwissenschaft*, **49**, 25:27.

Rook, A. J., Fisher, W. J., Sutton, J. D. (1992). Sources of variation in yields and concentration of milk solids in dairy cows. *Animal Production*, **54**, 169:173.

Rowland, S. J. (1938). The precipitation of protein in milk: I- casein, II- total protein, III- globulin, IV- albumin and proteose- peptone. *Journal dairy Research*, **9**, 30:41.

Ryhänen, E.- L., Tallavaara, K., Griinari, J. M., Jaakkola, S., Mantere-Alhonen, S., Shingfield, K. J. (2005). Production of conjugated linoleic acid enriched milk and dairy products from cows receiving grass silage supplemented with a cereal-based concentrate containing rapeseed oil. *International Dairy Journal*, **15**, 207:217.

Sá, F. V., Barbosa, M. (1990). *O leite e os seus produtos*. 5ªedição. Clássica Editora.

Swaisgood, H. E., Ng-Kwai- Hang, K. F., Hollar, C. M., Hicks, C. L., Creamer, L. K., Butler, J. E., Brown, E. M., Bleck, G. T., Jimenez-Flores, R., Farrel Jr., H. M. (2004). Nomenclature of proteins of cows' milk- sixth revision. *Journal Dairy Science*, **87**, 1641:1674.

Sutton, J. D. (1989). Altering milk composition by feeding. *Journal of Dairy Science*, **72**, 2801:2814.

Walker, G. P., Dunshea, F. R., Doyle, P. T. (2004). Effects of nutrition and management on the production and composition of milk fat and protein: a review. *Australian Journal of Agricultural Research*, **55**, 1009:1028.

Williams, C. M. (2000). Dietary fatty acids and human health. *Annales de Zootechnie*, **49**, 165:180.

Wu, Y. M., Ye, J. A., Ye, H. W., Yan, Q., Yao, J. H., Liu, J. X., Zheng, H. C. (2005). Effects of dietary sources of vegetable oils on performance of high- yielding lactation cows and conjugated linoleic acids in milk. *Journal Dairy Science*, **88**, 2037:2042.

**ANEXO - TRATAMENTO ESTATÍSTICO (TABELAS)**

## Homogeneous Subsets

**C4:0**

Scheffé<sup>a</sup>

Alimento fornecido	N	Subset for alpha = .05
		1
Silagem	24	5,66425
Pastagem	24	5,83175
Fenos	24	6,13267
Sig.		,567

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24,000.

**C10:0**

Scheffé<sup>a</sup>

Alimento fornecido	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Pastagem	24	2,99250	
Fenos	24	3,46000	3,46000
Silagem	24		3,62754
Sig.		,119	,755

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24,000.

**C11:0**

Scheffé<sup>a</sup>

Alimento fornecido	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Pastagem	24	,34183	
Fenos	24	,39746	,39746
Silagem	24		,43138
Sig.		,127	,457

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24,000.

**C12:0**Scheffé<sup>a</sup>

Alimento fornecido	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Pastagem	24	2,85529	
Fenos	24	3,37204	3,37204
Silagem	24		3,69450
Sig.		,056	,317

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24,000.

**C14:0**Scheffé<sup>a</sup>

Alimento fornecido	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Pastagem	24	8,86338	
Fenos	24		10,66438
Silagem	24		11,87538
Sig.		1,000	,062

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24,000.

**C14:1cis9**Scheffé<sup>a</sup>

Alimento fornecido	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Pastagem	24	,72675		
Fenos	24		,91458	
Silagem	24			1,08650
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24,000.

**C15:0**Scheffé<sup>a</sup>

Alimento fornecido	N	Subset for alpha = .05
		1
Pastagem	24	,44121
Silagem	24	,48575
Fenos	24	,48608
Sig.		,066

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24,000.

**isoC16:0**Scheffé<sup>a</sup>

Alimento fornecido	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Pastagem	24	,77658		
Fenos	24		,88904	
Silagem	24			1,02017
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24,000.

**C16:0**Scheffé<sup>a</sup>

Alimento fornecido	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Pastagem	24	22,70571		
Fenos	24		25,84150	
Silagem	24			31,39858
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24,000.

**C16:1cis9**

Scheffé<sup>a</sup>

Alimento fornecido	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Fenos	24	1,35088	
Pastagem	24	1,40204	1,40204
Silagem	24		1,57929
Sig.		,851	,152

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24,000.

**isoC17:0**

Scheffé<sup>a</sup>

Alimento fornecido	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Silagem	24	,40983	
Fenos	24	,41600	,41600
Pastagem	24		,44754
Sig.		,917	,111

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24,000.

**C17:0**

Scheffé<sup>a</sup>

Alimento fornecido	N	Subset for alpha = .05
		1
Fenos	24	,44871
Pastagem	24	,46546
Silagem	24	,48392
Sig.		,369

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24,000.

**C18:0**

Scheffé<sup>a</sup>

Alimento fornecido	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Silagem	24	6,85638		
Fenos	24		8,21238	
Pastagem	24			10,40600
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24,000.

**C18:1cis9**

Scheffé<sup>a</sup>

Alimento fornecido	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
Silagem	24	14,56175		
Fenos	24		18,21654	
Pastagem	24			20,93775
Sig.		1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24,000.

**C18:2(n-6)**

Scheffé<sup>a</sup>

Alimento fornecido	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Silagem	24	1,72800	
Pastagem	24		2,21846
Fenos	24		2,55283
Sig.		1,000	,148

Means for groups in homogeneous subsets are display ed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24,000.

**C18:3(n-3)**

Scheffé<sup>a</sup>

Alimento fornecido	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Fenos	24	,32683	
Silagem	24	,37717	,37717
Pastagem	24		,44358
Sig.		,544	,349

Means for groups in homogeneous subsets are display ed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24,000.

**C18:2cis9trans11**

Scheffé<sup>a</sup>

Alimento fornecido	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Silagem	24	,65858	
Fenos	24		,88296
Pastagem	24		1,02883
Sig.		1,000	,204

Means for groups in homogeneous subsets are display ed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24,000.

### Teor butiroso

Scheffé<sup>a</sup>

Alimento fornecido	N	Subset for alpha = .05
		1
Fenos	24	3,6592
Pastagem	24	3,8067
Silagem	24	4,0350
Sig.		,145

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24,000.

### Teor proteico

Scheffé<sup>a</sup>

Alimento fornecido	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Fenos	24	2,9796	
Pastagem	24	3,0917	3,0917
Silagem	24		3,1813
Sig.		,266	,427

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24,000.

### Produção leite (kg)

Scheffé<sup>a</sup>

Alimento fornecido	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Silagem	24	207,1792	
Fenos	24	222,6917	222,6917
Pastagem	24		229,6875
Sig.		,142	,666

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24,000.

### Ureia (ppm)

Scheffé<sup>a</sup>

Alimento fornecido	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Silagem	24	171,67	
Fenos	24	194,58	194,58
Pastagem	24		225,92
Sig.		,405	,188

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24,000.

### Caseina k

Scheffé<sup>a,b</sup>

Alimento fornecido	N	Subset for alpha = .05
		1
Fenos	23	7,904
Silagem	24	8,242
Pastagem	23	8,896
Sig.		,434

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 23,324.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

### Caseina beta

Scheffé<sup>a</sup>

Alimento fornecido	N	Subset for alpha = .05
		1
Fenos	24	26,413
Silagem	24	26,521
Pastagem	24	30,571
Sig.		,238

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24,000.

### Caseina alfa-s1

Scheffé<sup>a</sup>

Alimento fornecido	N	Subset for alpha = .05
		1
Fenos	24	39,396
Silagem	24	41,567
Pastagem	24	43,338
Sig.		,143

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 24,000.

### Caseina alfa-s2

Scheffé<sup>a,b</sup>

Alimento fornecido	N	Subset for alpha = .05
		1
Silagem	24	7,229
Fenos	24	7,563
Pastagem	18	8,644
Sig.		,317

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 21,600.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.