

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

TESTE POSITIVO A ÁLCOOL NO LEITE E SUA RELAÇÃO COM ESTADOS
CETÓICOS EM VACAS LEITEIRAS

Cristian Olivio Nied

PORTO ALEGRE

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

TESTE POSITIVO A ÁLCOOL NO LEITE E SUA RELAÇÃO COM ESTADOS
CETÓICOS EM VACAS LEITEIRAS

Autor: Cristian Olívio Nied

Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre em
Ciências Veterinárias na área de Patobiologia
aplicada

Orientador: Félix González

PORTO ALEGRE

2018

Cristian Olivio Nied

TESTE POSITIVO A ÁLCOOL NO LEITE E SUA RELAÇÃO COM ESTADOS
CETÓICOS EM VACAS LEITEIRAS

Aprovado em 16 de março de 2018

APROVADO POR:

Prof. Dr. Félix González – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Carlos Bondan – Universidade de Passo Fundo
Membro da Comissão

Dr. Fabiano Barreto – Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul
Membro da Comissão

Prof. Dra. Vivian Fischer – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradecimento a minha família, em especial ao meu filho Arthur, que é a minha razão de viver! A minha namorada Lucilaine, que por muitas e muitas vezes abriu mão do nosso lazer, para eu me dedicar aos estudos. Aos meus pais por sempre me apoiarem nesta caminhada e sempre que precisei eles estavam dispostos a me ajudar, a minha querida avó Amanda, aos meus tios, primos e amigos, pelas estadias, pelas palavras de apoio.

Ao professor Dr. Félix González, pela orientação, confiança e oportunidade. Ao grande mestre e amigo professor Dr. Carlos Bondan, por haver sempre um tempo para conversarmos, pelos conselhos e por me reconduzir aos “trilhos”.

Ao prof. Dr. Luis Gustavo Corbellini, pelos ensinamentos estatísticos e por se dispor a executar a estatística da pesquisa.

Ao meu grande amigo MSc. Chester Patrique Batista, um amigo que o mestrado me deu, muito obrigado pelos ensinamentos, pelas conversas, pelos mates, pelas viagens, tenhas certeza que contribuístes muito para eu me tornar uma pessoa e um profissional melhor.

Ao amigo e colega Fabiano Terra, pela amizade, pelas inúmeras conversas, pelo aprendizado, pela ajuda nas análises e nos cálculos nutricionais.

Aos colegas do Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, muito obrigado pelo apoio e pela ajuda.

Ao Mauro Eduardo Aschebrock e a Michele Fangmeier, muito obrigado pelas inúmeras vezes que solicitei ajuda para a realização da pesquisa e vocês me estenderam a mão, bem como a equipe do Departamento Técnico e a equipe do laboratório. Também tenho que agradecer aos demais laticínios, que aceitaram contribuir para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Dr. Fabiano Barreto e a equipe do Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários (RPM), ao Fabrício Pedrotti e a equipe do Laboratório de Produtos de Origem Animal do Laboratório Nacional Agropecuário – Lanagro/RS, que foram pessoas fundamentais no sucesso desta pesquisa.

Ao Sindicato da Indústria de Laticínios e Produtos Derivados do Rio Grande do Sul, em especial ao Darlan Palharini, por viabilizar este trabalho.

Aos produtores que abriram as portas para que pudesse ser feita a coleta das amostras e a obtenção das informações necessárias.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci

TESTE POSITIVO A ÁLCOOL NO LEITE E SUA RELAÇÃO COM ESTADOS CETÓICOS EM VACAS LEITEIRAS

Autor: Cristian Olivio Nied

Orientador: Félix González

RESUMO

A produção de leite é uma importante atividade do agronegócio brasileiro, e principalmente para o estado do Rio Grande do Sul, onde a atividade está presente em 98,8% dos municípios gaúchos. Visando garantir a qualidade do leite recebido pelos laticínios, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento publicou no dia 12 de dezembro de 2006, a Instrução Normativa 68 que estabelece métodos analíticos físico-químicos. Dentre os métodos estabelecidos está o teste da solução sulfocrômica, que visa detectar a presença de álcool etílico no leite, evitando assim de a população consumir leite adulterado. Amostras de leite coletadas diretamente de vacas leiteiras e sem adição de álcool etílico têm apresentado positividade ao teste, o qual é inutilizado para o consumo e é descartado. O objetivo do presente estudo foi identificar metabólitos presentes nas amostras positivas para o teste do álcool etílico de vacas leiteiras em propriedades no estado do Rio Grande do Sul, relacionar a positividade do teste com a presença de corpos cetônicos no leite e no sangue e verificar a relação entre a positividade ao teste em amostras de leite de animais com balanço energético negativo. Foram estudados 2 rebanhos leiteiros, identificados com amostras positivas ao álcool. Em um rebanho de 29 vacas em produção, foram coletadas amostras de animais que estavam produzindo leite positivo à presença de álcool (N= 29). Após 6 dias de observação, quando as vacas apresentaram resultado negativo ao teste de álcool, foram novamente coletadas amostras nas mesmas condições da 1ª coleta. No segundo rebanho foi realizado um experimento induzindo balanço energético negativo (60% de restrição energética). Foram usadas 18 vacas, nove com restrição energética e nove com consumo energético adequado (controle). Os dias em lactação média do grupo com restrição foi de 114 dias enquanto que do grupo controle foi de 108 dias. Foram coletadas amostras de leite, soro sanguíneo e alimentação fornecida aos animais nos dias das coletas de leite de ambos rebanhos. Nas amostras de leite com resultado positivo ao álcool no

primeiro rebanho foi encontrada acetona em concentração mediana de 0,009% que foi superior ($p < 0,05$) à concentração mediana de acetona nas amostras de leite negativas (0,0008%). As concentrações de acetona e β -hidroxibutirato (BHB) no soro sanguíneo também foram maiores nos animais que produziram leite positivo ao álcool (mediana de 0,003% e 2,40 mmol/L, respectivamente) comparado aos animais que produziram leite negativo (mediana de acetona de 0,001% e de BHB de 1,0 mmol/L). No experimento com restrição energética o grupo com restrição, houve positividade ao teste do álcool etílico, tendo concentração mediana de acetona no leite de 0,004%, enquanto que os animais sem restrição energética tiveram concentração mediana de 0,001%. A concentração média de acetona e de BHB no soro sanguíneo nos animais com restrição também foi maior à das vacas sem restrição. Nos alimentos consumidos nos dois rebanhos estudados, foram encontradas substâncias voláteis naqueles alimentos que sofreram processo de fermentação antes de serem fornecidos aos animais. Em conclusão, amostras de leite positivas a álcool com o teste de solução sulfocrômica podem apresentar resultados falsos-positivos produzidos pela presença de corpos cetônicos.

Palavras-chave: Álcool etílico, acetona, balanço energético negativo.

*POSITIVE MILK TEST TO ALCOHOL AND ITS RELATION TO KETOTIC STATUS IN
DAIRY COWS*

Author: Cristian Olivio Nied

Advisor: Félix González

ABSTRACT

Milk production is an important activity of Brazilian agribusiness, and especially for the state of Rio Grande do Sul, where activity is present in 98.8% of the cities of Rio Grande do Sul. In order to guarantee the quality of milk received by dairy, the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply published on December 12, 2006, Normative Instruction 68 that establishes physical-chemical analytical methods. Among the established methods is the sulfocromic solution test, which aims to detect the presence of ethyl alcohol in the milk, thus avoiding the consumption of adulterated milk. Samples of milk collected directly from dairy cows and without addition of ethyl alcohol have been tested positively, which is unusable for consumption and is discarded. The objective of the present study was to identify metabolites present in the positive samples for the ethyl alcohol test of dairy cows in properties in the state of Rio Grande do Sul, to relate the test positivity with the presence of ketone bodies in milk and blood and to verify the relation between test positivity in milk samples from animals with negative energy balance. Two dairy herds, identified with alcohol-positive samples, were studied. In a herd of 29 cows in production, samples were collected from animals that were producing positive milk in the presence of alcohol (N=29). After 6 days of observation, when the cows presented negative results to the alcohol test, samples were again collected under the same conditions as the 1st collection. In the second herd, an experiment was carried out inducing negative energy balance (60% energy restriction). Eighteen cows were used, nine with energy restriction and nine with adequate energy consumption (control). The mean lactation days of the restricted group was 114 days whereas the control group was 108 days. Samples of milk, blood serum and feed supplied to the animals were collected on the days of milk collection from both herds. In the samples of milk with a positive result on alcohol in the first herd, acetone at a median concentration of 0.009% was found ($p < 0.05$) at the median acetone concentration in the negative milk samples (0.0008%). The concentrations of acetone

and β -hydroxybutyrate (BHB) in the blood serum were also higher in the animals that produced alcohol-positive milk (median 0.003% and 2.40mmol/L, respectively) compared to the animals that produced negative milk (median 0.001% acetone and 1.0 mmol/L BHB). In the experiment with energy restriction the group with restriction, there was positivity to the ethyl alcohol test, with a median concentration of acetone in the milk of 0.004%, while the animals without energy restriction had a median concentration of 0.001%. The mean concentration of acetone and BHB in blood serum in restricted animals was also higher than that of unrestrained cows. In the foods consumed in the two herds studied, volatile substances were found in those foods that had undergone fermentation process before being fed to the animals. In conclusion, alcohol-positive milk samples with the sulfocromic solution test may present false-positive results produced by the presence of ketone bodies.

Keywords: *alcohol test, acetone, negative energy balance.*

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1 – Produção de etanol a partir do piruvato, em microrganismos.....	18
Figura 2 – Metabolismo do BHB até acetil-CoA.....	20
Figura 1 – Cronologia do balanço energético do grupo com restrição energética..	28
Figura 2 – Cronologia do balanço energético do grupo sem restrição energética..	28
Figura 3 – Interpretação do resultado do teste de álcool etílico no leite pelo método descrito na IN 68.....	30
Figura 4 – Gráfico boxplot demonstrando a mediana da concentração de acetona em amostras de leite, detectada mediante cromatografia gasosa.....	33
Figura 5 – Gráfico boxplot demonstrando a mediana da concentração de acetona nas amostras de soro sanguíneo, detectada mediante cromatografia gasosa.....	34
Figura 6 – Gráfico boxplot demonstrando a mediana da concentração de beta-hidroxiacetato (BHB) no soro de vacas com amostras de leite positivas e negativas ao teste do álcool.....	35
Figura 7 – Presença de substâncias voláteis (acetona, metanol, etanol, propanol e ácido butírico) nos alimentos fornecidos as vacas. Silagem 1: silagem fornecida aos animais da propriedade quando o teste do álcool etílico era positivo. Silagem 2: silagem fornecida aos animais da propriedade quando o teste do álcool etílico era negativo.....	36
Figura 8 – Concentração mediana de acetona em amostras de leite em vacas com (caso) e sem (controle) restrição energética alimentar. Período de restrição energética: do dia 1 ao dia 4.....	37
Figura 9 – Concentração mediana de acetona nas amostras de soro sanguíneo coletadas de vacas com restrição e sem restrição energética alimentar. Período de restrição energética: do dia 1 ao dia 4.....	38
Figura 10 – Concentração mediana de BHB nas amostras de soro coletadas de vacas com restrição e sem restrição energética alimentar. Período de restrição energética: do dia 1 ao dia 4.....	39
Figura 11 – Presença de substâncias voláteis nos alimentos fornecidos aos animais.....	40
Figura 12 – Equilíbrio cetoenólico.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS:

AGNE – Ácidos Graxos Não Esterificados

AGV – Ácidos Graxos Voláteis

ATP – Adenosina Trifosfato

BHB – β -hidroxibutirato

DEL – Dias em Lactação

ECC – Escore de Condição Corporal

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IGL – Instituto Gaúcho do Leite

IN – Instrução Normativa

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

P. A. – Pura para Análise

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
1.1.	Objetivos.....	15
1.1.1.	Objetivos Gerais.....	15
1.1.2.	Objetivos Específicos.....	15
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1.	Teste do álcool etílico.....	16
2.2.	Presença de álcool na produção de leite.....	17
2.3.	Cetose.....	19
3.	ARTIGO.....	22
	TESTE POSITIVO DE ÁLCOOL NO LEITE E SUA RELAÇÃO COM	22
	ESTADOS CETÓSICOS EM VACAS LEITEIRAS.....	
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

1. INTRODUÇÃO

A produção brasileira de leite foi de 33,62 bilhões de litros em 2016, 2,9% menor comparada à de 2015. A região Sul está na liderança, com 37% do leite produzido no país, seguido da região Sudeste (34,3%), e das regiões Centro-Oeste (11,85%), Nordeste (11,2%) e Norte (5,6%) (IBGE, 2016).

Considerando a produção por unidade da Federação, Minas Gerais é o estado com a maior produção de leite, com 26,7% da produção nacional, seguido do Paraná, com 14,1% do leite produzido no país, Rio Grande do Sul com 13,7% e Santa Catarina, com 9,3% do leite brasileiro (IBGE, 2016).

No *ranking* da produção de leite em litros/vaca/ano (produtividade), o Rio Grande do Sul ocupa o topo com uma produção de 3.157 litros/vaca/ano, seguido pelo Paraná com de 2.916 litros/vaca/ano e Santa Catarina com 2.787 litros/vaca/ano, enquanto que a média nacional foi de 1.709 litros/vaca/ano (IBGE, 2016). No Rio Grande do Sul, há 173,7 mil propriedades rurais de leite, distribuídos em 491 municípios, representando 98,8% dos municípios gaúchos (EMATER, 2017).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabeleceu instruções normativas, decretos e portarias que visam garantir a qualidade do leite consumido pela população. De acordo com dados apresentados por um laticínio do Rio Grande do Sul, no ano de 2015 foram inutilizados aproximadamente 480 mil litros de leite, por não estar de acordo com a normativa de qualidade exigida (Instrução Normativa nº 68 MAPA). Entre os motivos do descarte do leite estão principalmente a detecção de antibióticos (31,39%), positividade na prova do álcool alizarol (21,65%), alterações no índice de crioscopia (20,56%), detecção de sangue (13,94%), detecção de álcool etílico (11,98%) e presença de cloretos (0,48%). Somente por presença de álcool etílico foram descartados mais de 57 mil litros de leite nesse período. Outros dois laticínios apresentaram dados de janeiro a novembro de 2017, período em que deixaram de ser industrializados, cerca de 70 mil litros de leite devido a positividade para o teste do álcool etílico*.

A Instrução Normativa nº 68, do MAPA (12 de dezembro de 2006), oficializa os métodos analíticos físico-químicos para o controle de leite e produtos lácteos, dentre os quais está o teste qualitativo para detectar a presença de álcool etílico, baseado na

*Comunicação pessoal, recebida por correio eletrônico.

redução do Cr^{+6} a Cr^{+3} em uma solução sulfocrômica, constituída por dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) e ácido sulfúrico (H_2SO_4). Quando na presença de alguma substância oxidável ocorre a redução do Cr^{+6} , e a solução ácida muda da cor amarelo-alaranjada (Cr^{+6}) para a cor verde (Cr^{+3}), caracterizando a presença de álcool etílico (BRASIL, 2006).

Este teste tem por objetivo identificar a adição fraudulenta de álcool etílico no leite, a adição de álcool etílico visa reconstituir a crioscopia. Amostras de leite sem haver a contaminação ou a adição fraudulenta de álcool etílico, ao serem submetidas ao teste, apresentaram resultado positivo. A hipótese é de que o referido teste em estudo, apresenta resultados falsos-positivos.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo geral

Identificar metabólitos no leite positivo para o teste do álcool etílico de vacas leiteiras em propriedades no estado do Rio Grande do Sul.

1.1.2. Objetivos específicos

1. Identificar e quantificar a presença de substâncias voláteis, álcool etílico e outros álcoois no leite produzido, no sangue e nos alimentos que compõe a dieta dos animais.
2. Relacionar a positividade para o teste do álcool etílico e a presença de corpos cetônicos.
3. Verificar a relação entre positividade ao teste de álcool em amostras de leite em situação de balanço energético negativo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A intensificação da atividade leiteira ocasiona aumento dos riscos da ocorrência do aparecimento de transtornos metabólicos nos rebanhos leiteiros por haver aumento na produção e conseqüente aumento do desafio metabólico (GONZÁLEZ et al., 2000). Desordens metabólicas e doenças clínicas são acompanhadas por alterações nos fluídos como sangue, urina e leite em vacas leiteiras (OVERTON et al., 2017).

Desde 1970 tem sido empregado para diagnóstico de doenças metabólicas-nutricionais o estudo dos perfis metabólicos dos animais através de análises sanguíneas (PAYNE & PAYNE, 1987). Kelly (1996) afirma que os testes que avaliam o perfil metabólico são a melhor forma de identificar possíveis problemas nos animais antes de que ocorram perdas de produção ou transtornos de saúde e fertilidade.

Quando há algum desequilíbrio metabólico nas vacas, pode haver alterações nas características físico-químicas do leite principalmente em vacas de alta produção, provavelmente relacionado com desequilíbrios na dieta. É importante a análise da composição do leite uma vez que os precursores para sua síntese são filtrados a partir do sangue nas células alveolares da glândula mamária (GONZÁLEZ & CAMPOS, 2003).

Além da análise dos componentes sanguíneos, técnica utilizada por muitas décadas, nos últimos anos têm se somado ao diagnóstico as análises físico-químicas do leite para obter conhecimento do estado de saúde, associado ao estado metabólico de rebanhos leiteiros (CEBALLO & HERNÁNDEZ, 2001).

2.1. Teste do álcool etílico

O teste do álcool etílico, é um teste utilizado rotineiramente nos laticínios. O objetivo de utilização do mesmo, é detectar a presença de álcool etílico no leite cru, o teste é estabelecido e descrito na Instrução Normativa N° 68 de 12 de dezembro de 2006. Amostras de 100 mL de leite são colocadas para ferver em um kitassato onde é acoplado um cano de silicone que conecta o kitassato a uma pipeta de Pasteur e a uma solução sulfocrômica. As substâncias que volatilizam se condensam no cano de silicone acoplado ao kitassato e são levadas até a solução sulfocrômica. Os reagentes utilizados para formar a solução sulfocrômica são o ácido sulfúrico (H_2SO_4) e o dicromato de

potássio ($K_2Cr_2O_7$). Na presença de álcool etílico em meio ácido ocorre a redução do Cr^{+6} a Cr^{+3} , processo em que ocorre a modificação da coloração da solução sulfocrômica. Quando o resultado é negativo (não há a presença de álcool etílico) a coloração da solução não se altera e quando o resultado é positivo (há presença de álcool etílico) a solução muda de cor para um tom verde (BRASIL, 2006).

2.2. Presença de álcool na produção do leite

A presença de álcool etílico no leite cru, se deve pela adição proposital com o objetivo de mascarar a adição de água, restabelecendo o ponto de congelamento do leite (crioscopia), pode também estar presente no leite quando é utilizado soluções de limpeza contendo álcool etílico para a higienização do sistema de ordenha, álcoois também estão presentes no sistema produtivo através de alimentos fermentados.

Vários tipos de álcool podem ser formados durante a fermentação de forragens, sendo possível encontrar estes compostos em diferentes concentrações alcóolicas em silagens de milho que são utilizados para a alimentação das vacas (ROOKE et al., 1988). As silagens contêm variáveis quantidades de etanol, propanol, 2-butanol e ésteres (MORGAN & PEREIRA, 1962). Amostras de silagens com odor semelhante a vinagre ou acetona têm revelado consistentemente a presença de propanol e propilacetato, bem como toxinas de *Fusarium* spp. e *Penicillium*, animais que recebiam esta silagem apresentaram problemas relacionados à produtividade e à saúde (KRISTENSEN, 2007).

Os ruminantes possuem uma organização anatômica do trato digestivo que permite uma grande eficiência no aproveitamento das forragens, como resultado de um longo processo de adaptação (CONTRERAS, 2010). Os alimentos ingeridos pelos ruminantes sofrem um processo fermentativo no rúmen, através dos microrganismos que o habitam (fungos, bactérias e protozoários) (KOZLOSKI, 2011). Uma parte do álcool que chega ao rúmen pela dieta é transformado em ácidos graxos voláteis pelos microrganismos do rúmen (DURIX et al., 1991), sendo o restante absorvido pela parede ruminal (BRUNING & YOKOYAMA, 1988; JEAN-BLAIN et al., 1992). O álcool também pode ser sintetizado no rúmen por fungos (TEUNISSEN et al., 1992) e bactérias (LAUKOVA & MARAOUNECK, 1992).

O etanol absorvido pela parede ruminal é metabolizado pelo fígado (RAUN & KRISTENSEN, 2011), onde ocorre desidrogenação do etanol pela enzima álcool desidrogenase, processo em que o etanol é convertido em acetaldeído. Posteriormente, o acetaldeído sofre uma nova desidrogenação, sendo convertido em acetato pela enzima aldeído desidrogenase, e por fim, o acetato é metabolizado em acetil-CoA, processo que ocorre com gasto de um ATP (MIRA & MANSO, 1993). A partir dessas rotas pode-se inferir que o etanol, no final do seu metabolismo, pode gerar corpos cetônicos via acetil-CoA (CORRÊA et al., 2010).

Anrique (2010) afirma que a produção de álcool não é favorecida na fermentação ruminal, devido ao necessário gasto de ATP. O autor também afirma que as principais fontes de álcool são as silagens de milho, silagens de grão úmido e silagens de forragens em geral. Em alguns vegetais, em alguns invertebrados, em protistas e em microrganismos o piruvato (metabólito final do processo de glicólise) pode ser convertido em etanol e CO_2 em um ambiente anaeróbico. Esse processo de conversão do piruvato em etanol ocorre em dois passos, o primeiro passo consiste na descarboxilação do piruvato a acetaldeído pela enzima piruvato descarboxilase. Para que a enzima tenha ação é necessária a presença de Mg^{2+} e da coenzima tiamina pirofosfato. O segundo passo consiste na redução do acetaldeído em etanol, através da enzima álcool desidrogenase, em que o NADH fornece o poder redutor (Figura 1).

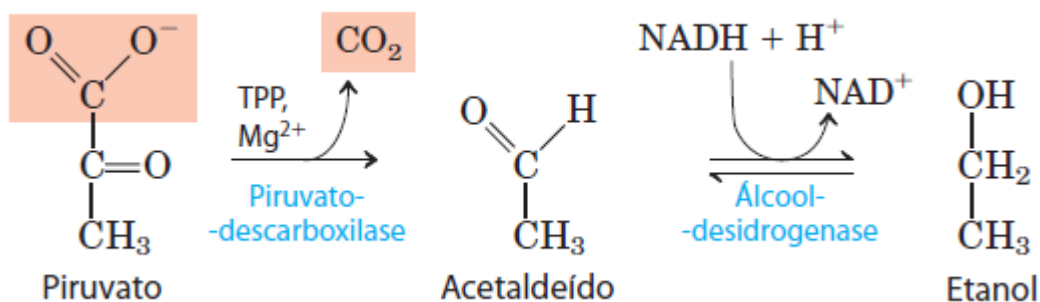


Figura 1 – Produção de etanol a partir do piruvato, por microrganismos. Fonte: NELSON & COX (2014).

2.3. Cetose

A cetose é uma enfermidade metabólica frequente em vacas de alta produção de leite e em recém-paridas (VANHOLDER et al., 2015). Esta enfermidade está relacionada com a energia requerida para a produção de leite e a quantidade de energia ingerida na alimentação, quando esta última não fornece a quantidade de energia necessária para a produção de leite, ocorrendo um balanço energético negativo (HERDT, 2000) e o estímulo da lipólise.

A lipólise consiste na oxidação dos ácidos graxos até acetil-CoA (β -oxidação), o qual tem destinos diferentes no organismo, podendo ser completamente oxidado até CO₂ através do ciclo do ácido cítrico ou convertido em corpos cetônicos no fígado (NELSON & COX, 2006).

Os corpos cetônicos (β -hidroxibutirato, acetoacetato e acetona) (MCGARRY & FOSTER, 1980) são transportados do fígado para outros tecidos pela circulação sanguínea. Os corpos cetônicos são usados em todos os tecidos como fonte de energia, exceto o fígado, o qual não possui a enzima β -cetoacil-CoA-transferase, também conhecida como tioforase, enzima que tem a função de converter o acetoacetato em acetoacetil-CoA (Figura 1).

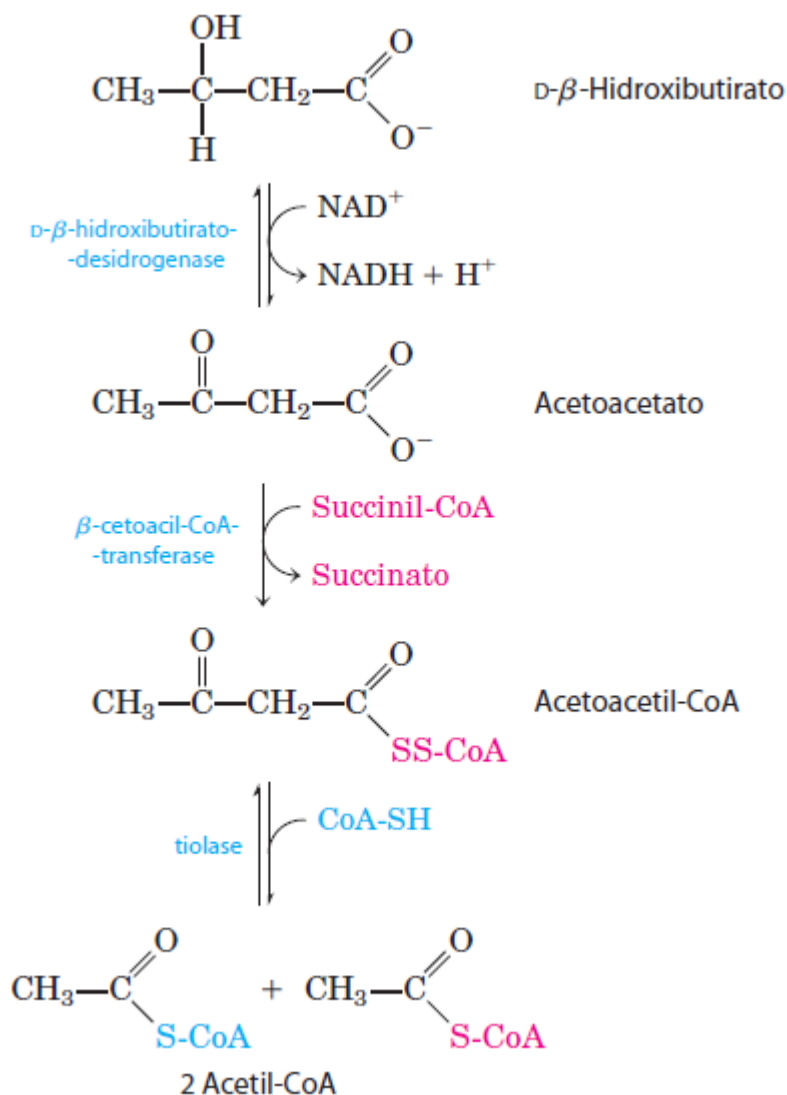


Figura 2 – Metabolismo do BHB até acetil-CoA. Fonte: NELSON & COX (2014).

A acetona é produzida em menores quantidades do que o acetoacetato e BHB em vacas com cetose, é o único corpo cetônico volátil (CORRÊA et al., 2010), é exalado pela respiração (NELSON & COX, 2014), está presente no leite (ENJALBERT et al., 2001) e na urina (WOOD et al., 2004). Os demais corpos cetônicos também podem ser encontrados na urina e leite de animais acometidos por cetose (CORRÊA et al., 2010).

A cetose também está relacionada com o escore de condição corporal (ECC), uma vez que vacas com ECC acima de 3,5 no parto, possuem 2,5 vezes mais chances de desenvolver cetose, se comparado com vacas com ECC abaixo de 3,25 no momento do parto (GILLUND et al., 2001). Silagens com alta concentração de ácido butírico

também podem desencadear cetose nutricional em bovinos no período de pós-parto (ANDERSSON & LUNDSTRÖM, 1985).

Os primeiros trabalhos relacionados à cetose em bovinos datam da década de 1940. Trabalhos como de Duffield (2000), avaliaram 1.010 animais em 25 fazendas em Ontário (Canadá), onde a prevalência de cetose subclínica nas fazendas foi de 43% nos animais nas duas primeiras semanas pós-parto. Berge e Vertenten (2014) ao avaliar a concentração de corpos cetônicos no leite ($\geq 100 \mu\text{mol}$ de BHB/L) em animais até 35 dias pós-parto, afirmam que a ocorrência de cetose (subclínica e clínica) é de cerca 43% na Alemanha, 52% na França, 31% na Itália, 46% na Holanda e 31% no Reino Unido. McArt et al. (2012) citam uma incidência de 43% de cetose subclínica em vacas pós-parto no estado de Nova Iorque.

A cetose ocasiona perdas econômicas pela redução da produção de leite (MCART et al., 2012) e pelos animais acometidos possuem mais chances de ter concomitantemente outras enfermidades como o deslocamento de abomaso (MCART et al., 2012; SUTHAR et al., 2013, LEBLANC et al., 2005), problemas reprodutivos (WALSH et al., 2007), metrite (SUTHAR et al., 2013), maior intervalo entre o parto e a concepção levando a maior descarte de animais (COOK et al., 2001), e redução da imunidade inespecífica (SARTORELLI et al., 2000).

O animal acometido por cetose apresenta diminuição do glicogênio hepático (HOLTENIUS & HOLTENIUS, 1996), hipoglicemia (SAMPSON & HAYDEN, 1936), aumento dos corpos cetônicos no sangue, leite e urina (CORRÊA et al., 2010), além dos sinais clínicos que variam de acordo com a evolução da doença, como perda da condição corporal, diminuição da produção de leite, perda do apetite (BAIRD, 1982), dorso encurvado, movimentos circulares, pressão da cabeça contra objetos, tremores, incoordenação motora, hiperestesia, quedas e agressividade (CORRÊA et al., 2010).

O avanço da tecnologia permitiu o desenvolvimento de meios de diagnóstico de animais com cetose subclínica, através da detecção do metabólito β -hidroxibutirato no sangue (LEBLANC, 2010). De acordo com González e Silva (2006), a concentração de corpos cetônicos (β -hidroxibutirato) no sangue de vacas leiteiras sadias em produção deve ser menor de 1 mmol/L.

3. ARTIGO

TESTE POSITIVO A ÁLCOOL NO LEITE E SUA RELAÇÃO COM ESTADOS CETÓICOS EM VACAS LEITEIRAS

Resumo

O teste do álcool mediante solução sulfocrômica tem por finalidade detectar a presença de álcool etílico no leite cru recebido pelos laticínios. Recentemente, produtores e laticínios têm relatado a positividade de amostras de leite cru para o referido teste. O presente trabalho teve por objetivo detectar substâncias voláteis, incluindo corpos cetônicos, no leite positivo ao teste do álcool. Foram estudadas duas propriedades leiteiras: na primeira foram detectadas e analisadas amostras positivas ao teste do álcool e na segunda foi realizada indução de balanço energético negativo utilizando restrição de 60% da necessidade energética durante 4 dias. Nas duas propriedades foram coletadas amostras de leite, soro sanguíneo e alimento fornecido aos animais. Nas amostras dos fluídos corporais e na alimentação dos animais foi avaliada a presença e concentração de substâncias voláteis (acetona, etanol, metanol, propanol e ácido butírico), utilizando a técnica de cromatografia gasosa. No soro sanguíneo foi adicionalmente determinada a concentração de beta-hidroxiacetato (BHA) utilizando kit comercial baseado em metodologia cinética enzimática. Na primeira propriedade, as amostras de leite positivas para o teste do álcool foram detectadas a presença de acetona (mediana 0,009%) superior ($p < 0,05$) à concentração de acetona nas amostras de leite negativas (mediana 0,0008%). As concentrações de acetona e BHA no soro sanguíneo também foram maiores nos animais que produziram leite positivo ao álcool comparado aos animais que produziram leite negativo. A concentração mediana de acetona no soro sanguíneo dos animais positivos foi de 0,008% e nos animais negativos foi de 0,0007%, e a concentração mediana nos animais positivos foi de BHA foi de 1,07 mmol/L e nos animais negativos foi de 0,56 mmol/L. Nos animais submetidos a restrição energética houve positividade ao teste do álcool etílico no quarto dia, quando os animais com restrição tiveram concentração mediana de acetona de 0,004%, enquanto que os animais sem restrição energética tiveram neste mesmo dia concentração mediana de 0,001%. A concentração mediana de acetona no soro sanguíneo nos animais com restrição no quarto dia foi de 0,003%, enquanto que os animais sem restrição tiveram concentração

mediana de acetona no soro sanguíneo de 0,001%. A concentração mediana de BHB no quarto dia nos animais com restrição foi de 2,40 mmol/L, enquanto que neste dia os animais sem restrição apresentaram concentração mediana de 1,0 mmol/L. Nos alimentos consumidos pelas vacas nas duas propriedades somente foram encontradas substâncias voláteis naqueles alimentos que sofreram processo de fermentativo antes de serem fornecidos aos animais. Conclui-se que amostras de leite positivas a álcool com o teste de solução sulfocrômica podem estar tendo resultados falsos-positivos devido à presença de corpos cetônicos.

Palavras-chave: Teste do álcool etílico, acetona, balanço energético negativo.

Abstract

The test of alcohol by sulfocromic solution aims to detect the presence of ethyl alcohol in raw milk received by dairy products. Recently, producers and dairy farmers have reported the positivity of raw milk samples for the said test. The objective of the present study was to detect volatile substances, including ketone bodies, in milk positive to the alcohol test. Two dairy properties were studied: in the first one, positive samples were detected and analyzed in the alcohol test, and in the second, negative energy balance was induced using a 60% restriction of the energy requirement for 4 days. Samples of milk, blood serum and food supplied to the animals were collected at both properties. The presence and concentration of volatile substances (acetone, ethanol, methanol, propanol and butyric acid) were evaluated in the body fluids and animal feed samples using the gas chromatography technique. In blood serum the beta-hydroxybutyrate concentration (BHB) was also determined using commercial kit based on enzymatic kinetic methodology. On the first property, the positive samples for alcohol test were detected the presence of acetone (median 0.009%) superior ($p < 0,05$) to the concentration of acetone in the negative milk samples (median 0.0008%). The concentrations of acetone and BHB in the blood serum were also higher in the animals that produced alcohol-positive milk compared to the animals that produced negative milk. The median acetone concentration in the serum of the positive animals was 0.008% and in the negative animals was 0.0007%, and the median concentration in the positive animals was BHB was 1.07 mmol / L and in the negative animals it was 0.56 mmol / L. In the animals submitted to energy restriction there was a positive test for ethyl alcohol on the fourth day, when animals with restriction had a median acetone

concentration of 0.004%, while animals with no energy restriction had a median concentration of 0.001% at the same day. The median serum acetone concentration in the animals with restriction on the fourth day was 0.003%, while the animals without restriction had a mean acetone concentration in the blood serum of 0.001%. The median BHB concentration on the fourth day in the restricted animals was 2.40 mmol / L, whereas on this day the animals without restriction presented a median concentration of 1.0 mmol / L. In the foods consumed by the cows in both properties only volatile substances were found in those foods that had undergone fermentative process before being fed to the animals. It is concluded that alcohol-positive milk samples with the sulfocromic solution test may be having false-positive results due to the presence of ketone bodies.

Keywords: Ethyl alcohol test, acetone, negative energy balance.

1. Introdução

A Instrução Normativa nº 68, do MAPA (12 de dezembro de 2006), oficializa os métodos analíticos físico-químicos para o controle de leite e produtos lácteos, dentre os quais está o teste qualitativo para detectar a presença de álcool etílico, baseado na redução do Cr^{+6} a Cr^{+3} em uma solução sulfocrômica, constituída por dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) e ácido sulfúrico (H_2SO_4). Quando na presença de alguma substância oxidável ocorre a redução do Cr^{+6} , e a solução ácida muda da cor amarelo-alaranjada (Cr^{+6}) para a cor verde (Cr^{+3}), caracterizando a presença de álcool etílico (BRASIL, 2006). Este teste é utilizado rotineiramente nos laticínios com o objetivo de identificar a adição fraudulenta de álcool etílico no leite cru recebido para beneficiamento.

Álcoois estão presentes no processo de produção de leite pelos alimentos fermentáveis e no processo de higienização da ordenha. Diferentes tipos de álcoois podem estar presentes nos alimentos nos fermentáveis, um alimento fermentável muito utilizado é a silagem (MORGAN & PEREIRA, 1962). Os alimentos ingeridos pelas vacas são fermentados em ácidos graxos voláteis pelos microrganismos presentes no rúmen (RUSSEL, 2009). Os principais ácidos graxos voláteis de cadeia curta produzidos são o acetato, butirato e o propionato (LEEK, 2006). Além dos ácidos graxos voláteis também são produzidos etanol (ALLISON, 2006), metano, dióxido de

carbono (MCDONALD et al., 2011), ácido láctico e amônia (KOZLOSKI, 2011). Apesar de a produção ruminal de etanol ser desfavorecida pelo gasto de energia necessário (ANRIQUE, 2010), em casos de acidose subaguda, ocorre uma considerável produção de álcool a nível ruminal (KRISTENSEN et al., 2007).

A fermentação ruminal também pode desencadear a produção de corpos cetônicos através a produção de butirato e acetato (CORRÊA et al. 2010). Aproximadamente 20% do acetato pode ser convertida em corpos cetônicos, enquanto a maior parte (85 a 90%) do butirato é convertido em corpos cetônicos (KOZLOSKI, 2011). A conversão do acetato e butirato em corpos cetônicos ocorre na passagem destes ácidos graxos voláteis pelo epitélio ruminal (LEIGHTON et al., 1983).

Moio et al. (1993) avaliando a presença de substâncias voláteis em leite de bovinos, caprinos, ovinos e bubalinos encontraram em maior concentração corpos cetônicos, nas amostras analisadas. Os corpos cetônicos, são produzidos durante a cetogênese (GRABACKA, 2016), os mais importantes o β -hidroxibutirato (BHB), o acetoacetato e a acetona (LEBLANC, 2010), sendo a acetona o único corpo cetônico volátil (CORRÊA et al., 2010). A cetogênese também ocorre quando a energia requerida pelo animal não é ingerida suficientemente, ocorrendo assim balanço energético negativo, este processo metabólico ocorre principalmente no período de transição dos animais (CORRÊA et al., 2010; ALLEN & PIANTONI, 2013)

Alguns laticínios e produtores têm relatado nos últimos anos descarte de leite com resultado positivo para o teste de álcool etílico, não havendo a contaminação e adição fraudulenta de álcool etílico. Os objetivos foram identificar a composição de substâncias voláteis presentes no leite e no soro sanguíneo de amostras de leite com resultado positivo ao teste de álcool etílico, além de verificar se animais em balanço energético negativo pode induzir um resultado positivo para o teste do álcool etílico. A hipótese é de que o teste em estudo apresenta resultado positivo na presença de acetona.

2. Material e métodos

Os procedimentos feitos com os animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, projeto de

pesquisa nº 31.756, e autorizados pelos proprietários mediante assinatura do termo de consentimento.

2.1 Identificação de substâncias voláteis no leite, no sangue e na alimentação de vacas com teste positivo a álcool etílico em amostras de leite

Propriedades particulares detectadas com positividade para álcool etílico por um laticínio do Rio Grande do Sul, foram convidadas a participar do estudo, foram coletadas amostras individuais de leite para o teste do álcool etílico. Para o estudo foi considerada uma propriedade.

A propriedade é localizada no município de Teutônia, com 29 animais em lactação, todos da raça Holandesa, em sistema de manejo semi-confinado. Os dias em lactação das vacas coletadas variou de 15 dias até 330 dias e a ordem de parto de primíparas até múltíparas com 7ª cria. A coleta na propriedade ocorreu no mês de abril de 2017.

A alimentação, na propriedade, foi constituída de silagem de milho (*Zea mays*) denominada “Silagem 1”, ração e feno de azevém (*Lolium sp.*), no momento da coleta quando o resultado era positivo para o teste do álcool etílico. A alimentação dos animais da propriedade, quando o teste do álcool etílico era negativo foi de silagem de milho (*Zea mays*) denominada “Silagem 2”, ração, feno de azevém (*Lolium sp.*), pastagem de aveia-preta (*Avena strigosa*) e milho (*Zea mays*) moído. A troca da silagem ocorreu pois não havia quantidade suficiente da silagem 1, a influência da alimentação sobre o resultado do teste, foi pela quantidade de energia fornecida aos animais, no primeiro momento, os animais recebiam 18,08 Mcal/dia, enquanto que no segundo momento, quando o resultado do teste foi negativo, a quantidade de energia fornecida aos animais foi de 23,15 Mcal/dia. Os resultados da energia foram obtidos através do programa MAX System for Dairy, através de análises bromatológicas dos alimentos.

Todos os 29 animais em lactação, estavam produzindo leite positivo para o teste do álcool etílico. Foram coletadas amostras de leite de uma fração da ordenha da tarde e amostras de sangue logo após, de todos os 29 animais. Foram coletadas amostras de leite de 300 mL/animal diretamente em frascos estéreis, refrigeradas a 4°C e enviadas imediatamente ao laticínio para confirmar o teste do álcool etílico. Imediatamente após

a realização do teste do álcool etílico no laticínio, as amostras foram congeladas a (-20°C) até serem analisadas por cromatografia gasosa para detecção de acetona, metanol, etanol, propanol e ácido butírico.

Testes de álcool eram realizados diariamente. Seis dias após a primeira coleta, quando as amostras de leite deram resultado negativo ao teste do álcool etílico na mesma propriedade, foram coletadas amostras de leite e sangue dos mesmos 29 animais, nas mesmas condições e horário da primeira coleta.

No momento das coletas de sangue e leite, também foi realizada a coleta de todos os alimentos que os animais receberam, imediatamente retirado o excesso de ar e congelados a -20°C, até serem analisados por cromatografia gasosa para detecção de acetona, metanol, etanol, propanol e ácido butírico.

2.2 Balanço energético negativo e sua influência no teste de álcool no leite

Vacas sem alterações clínicas foram selecionadas em uma propriedade leiteira no município de Travesseiro, no estado do Rio Grande do Sul. Foram selecionados 18 animais em lactação da raça Holandesa, com peso médio de 600 kg. Os animais foram separados em dois grupos, com 9 animais em cada grupo, um grupo recebeu a quantidade de energia adequada, e o outro grupo recebeu restrição energética.

A ordem de parto dos animais variou da primeira até a quinta lactação com variação de dias em lactação de 57 até 165 dias. Os dias em lactação média do grupo com restrição energética foram de 114 dias enquanto que do grupo sem restrição foi de 108 dias. Para cada animal selecionado para o grupo com restrição energética, havia outro animal com ordem de parto e dias em lactação igual ou similar no grupo sem restrição.

As necessidades de energia foram calculadas pelo programa MAX System for Dairy. Os parâmetros considerados para o cálculo da energia, além das necessidades fisiológicas do animal, foram peso corporal, a produção média, quantidade de gordura (3,4%) e proteína do leite (3,1%), resultando em uma necessidade energética calculada de 26,06 Mcal/dia. Inicialmente, todas as vacas (de ambos grupos) foram alimentadas com 110% do requerimento de energia do primeiro ao quarto dia, quando foi realizado

um período de adaptação dos animais ao manejo a ser realizado. A alimentação dos grupos era composta de silagem de milho, pasto de azevém (*Lolium* spp.), ração, farelo de soja e sal mineral. Foi realizada a análise bromatológica de todos os ingredientes da alimentação.

O grupo sem restrição permaneceu recebendo água e 110% das necessidades energéticas diárias durante todos os dias do experimento, enquanto o grupo com restrição, após o período adaptação, recebeu água e silagem de milho, pasto de azevém (*Lolium* spp.), ração, farelo de soja e sal mineral na quantidade de 10,4 Mcal/dia, representando 40% da necessidade energética diária, até o quarto dia do início da restrição energética, recebendo após os mesmos alimentos e nas mesmas quantidades do grupo sem restrição. Levando em consideração somente a silagem (único alimento fermentado), a quantidade de silagem recebida pelo grupo com restrição durante o período de restrição energética foi de 35% inferior a quantidade recebida de silagem pelo grupo sem restrição. Neste experimento, todas as amostragens e análises foram realizadas durante os 9 dias de observação (4 de adaptação e 5 com alterações no manejo alimentar).

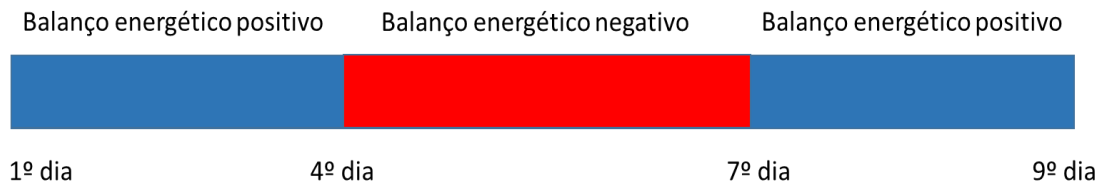


Figura 1 – Cronologia do balanço energético do grupo com restrição energética.

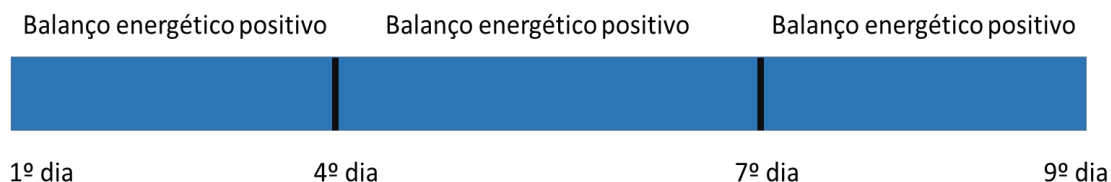


Figura 2 – Cronologia do balanço energético do grupo sem restrição energética.

As amostras de leite foram coletadas por ocasião da ordenha, em frascos plásticos estéreis e o volume coletado foi de 300 mL/ animal refrigeradas a 4°C até ser realizado o teste do álcool etílico no laticínio, imediatamente congeladas (-20°C) até

serem analisadas por cromatografia gasosa. As amostras de leite foram obtidas do volume total da ordenha da manhã, primeiramente o leite foi ordenhado em recipientes higienizados previamente com água fervida e em seguida secos. Antes de obter a amostra de 300 mL o leite foi homogeneizado.

No momento das coletas de sangue e leite, também foi realizada a coleta de todos os alimentos que os animais receberam, os quais foram embalados a vácuo e congelados a -20°C , até serem analisados por cromatografia gasosa.

Coleta de sangue de ambos estudos

Foram coletadas amostras de sangue por meio da punção da veia jugular em tubos *vacutainer* de 10 mL sem anticoagulante contendo gel SST (BD VacutainerAdvance), centrifugadas a 4.121,6 g, por 10 minutos para obtenção de soro, alíquotadas em tubos do tipo *ependorf* e conservadas a (-40°C) até suas análises. As amostras de sangue foram coletadas entre duas a quatro horas após a ordenha. Nas amostras de sangue também foram analisadas para presença e concentração de acetona, metanol, etanol, propanol e ácido butírico e a concentração de BHB.

Análises das amostras de ambos estudos

Nas amostras de leite foi realizado o teste do álcool etílico, pelo método da solução sulfocrômica, descrito na Instrução Normativa N° 68 de 12 de dezembro de 2006, que é classificado como um teste qualitativo (BRASIL, 2006). Uma amostra de 100 mL de leite foi colocada para ferver em um kitassato. As substâncias voláteis se condensam no cano de silicone acoplado ao kitassato e são levadas até uma solução sulfocrômica. Os reagentes utilizados para formar a solução sulfocrômica são o ácido sulfúrico (H_2SO_4) e o dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Na presença de álcool etílico em meio ácido ocorre a redução do Cr^{+6} a Cr^{+3} , processo em que ocorre a modificação da coloração da solução sulfocrômica. Quando o resultado é negativo a coloração da solução fica levemente amarelo-acinzentada e quando o resultado é positivo a solução muda de cor para um tom verde (Figura 3).



Figura 3 – Interpretação do resultado do teste do álcool no leite pelo método descrito na IN 68. Esquerda, amostra negativa; direita, amostra positiva.

Instrumentação

Foi utilizado um sistema de cromatografia a gás multidimensional (MDGC-MS) com detector por ionização em chama (Shimadzu GC-2010Plus/FID). Foi empregada uma coluna polar de sílica fundida com cobertura de polietilenoglicol (Varian CP-Wax 57CB 50 m x 0,25 mm x 0,2 μ m). As temperaturas utilizadas foram de 200°C e 250°C no inlet e detector, respectivamente. A rampa de aquecimento iniciou em 50°C por 04 minutos, indo a 110°C, com aumento de 5°C por minuto, chegando a 180°C, permanecendo por 03 minutos e 30 segundos e por fim 190°C, por 06 minutos para ocorrer a limpeza da coluna (sistema). Terminado o processo de limpeza a temperatura retornou aos 50°C para a próxima injeção. Como gás de arraste e make-up foi utilizado gás hélio, e no detector de ionização em chama foram utilizados hidrogênio e ar sintético. Posteriormente, os compostos detectados foram analisados em uma segunda dimensão pra fins de confirmação, utilizando um espectrômetro de massas (Shimadzu GC-2010Plus/MS_QP2010Ultra), com coluna de sílica fundida de alta polaridade com cobertura de polietilenoglicol Crossbond Carbowax (RestekStabilwax 60 m x 0,25 mm x 0,25 mm).

Análises das amostras de ambos estudos

A detecção dos compostos voláteis nas amostras de leite e de soro sanguíneo (acetona, metanol, etanol, propanol e ácido butírico) foi realizada no Laboratório Nacional Agropecuário (Lanagro-RS) utilizando sistema de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (FID, *Flame Ionization Detector*) com confirmação por espectrometria de massas (GC-MS). As amostras foram alíquotadas (2 mL) e adicionado 4 mL de acetonitrila para extração dos compostos,. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4.121,6 g, por 10 minutos, seguido da retirada de 1 mL de sobrenadante para vials para análise no sistema de cromatografia gasosa.

Em todas as vezes que as amostras de leite, soro sanguíneo e os alimentos foram submetidas a análise por cromatografia gasosa, foram adicionadas amostras de controle negativo (somente com água ultrapura e acetonitrila (branco)), amostras de controle positivo com as substâncias pesquisadas (acetona, metanol, etanol, propanol e ácido butírico) nas concentrações de 0,005%, 0,01% e 0,05%.

Após a análise das amostras por cromatografia a gás multidimensional, foi realizado a adição de 0,005% e 0,01% de acetona P.A. em amostras distintas de leite, com sete repetições cada concentração, todas amostras foram previamente testadas para o teste do álcool etílico, após a adição as amostras foram novamente submetidas ao teste, também foi realizado a adição de 5 µL de acetona P.A. diretamente na solução sulfocrômica, com sete repetições. A adição de acetona P.A. teve como objetivo confirmar se a substância detectada pela cromatografia a gás multidimensional é capaz de influenciar no resultado do teste do álcool etílico, teste descrito pela IN 68 de 12 de dezembro de 2006. Em todas as amostras de leite que foram adicionadas acetona nas concentrações de 0,005% e 0,01% tiveram resultado positivo para o teste do álcool etílico, como também o resultado é positivo quando adicionado 05 µL de acetona P.A. diretamente na solução sulfocrômica.

No soro sanguíneo também foi medida a concentração de beta-hidroxibutirato (BHB) através de kit comercial (Ranbut, Randox), utilizando um analisador automático para bioquímica (CM 200, Wiener). O método é cinético enzimático, baseado na oxidação do D-3-hidroxibutirato em acetoacetato pela enzima 3-hidroxibutirato desidrogenase.

Análise estatística

No estudo da identificação de substâncias voláteis no leite e no sangue de vacas com teste positivo a álcool etílico em amostras de leite, os resultados obtidos da concentração de acetona pela cromatografia gasosa no leite e no soro sanguíneo, como também da concentração de BHB no soro sanguíneo foram computados em planilha Excel, considerando o resultado do teste do álcool etílico (positivo ou negativo) com a concentração dos metabólitos nos fluídos corpóreos. Posteriormente os dados foram exportados para o programa SAS (Free Statistical Software). A análise estatística foi realizada através do teste de Wilcoxon não paramétrico, pois os resultados obtidos não tiveram distribuição normal. O intervalo de confiança foi 95%. Foram avaliadas as concentrações medianas, médias e desvio padrão de acetona no leite e soro sanguíneo, bem como a mediana, média e desvio padrão de BHB no soro sanguíneo comparando com os resultados obtidos (positivo ou negativo) no teste do álcool etílico. Foi considerada probabilidade $< 0,05$.

No estudo de balanço energético negativo, os resultados obtidos da concentração de acetona pela cromatografia gasosa e da concentração de BHB no soro sanguíneo foram computados em planilha Excel. Foi considerado nesta análise os resultados obtidos conforme o grupo que o animal pertencia e o dia do experimento, e posteriormente os dados foram exportados para o programa SAS (Free Statistical Software). Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e os resíduos foram considerados na análise. O intervalo de confiança considerado foi de 95% ($p < 0,05$). Os resultados obtidos foram comparados entre os grupos nos dias do experimento. Foram avaliadas as concentrações medianas, médias e desvio padrão de acetona no leite e soro sanguíneo, bem como a mediana, média e desvio padrão de BHB no soro sanguíneo.

3. Resultados e discussão

Identificação de substâncias voláteis no leite e no sangue de vacas com teste positivo a álcool etílico em amostras de leite

A concentração de acetona nas amostras de leite é mostrada na Figura 4 e a concentração de acetona no soro na Figura 5. Nas amostras positivas para o teste do álcool etílico (N= 29), foram encontradas concentrações de acetona no leite superiores ($p < 0,05$) às concentrações encontradas nas amostras de leite negativas (N=29). A concentração mediana de acetona encontrada no leite dos animais positivos foi de 0,009% e nos animais negativos a concentração mediana foi de 0,0008%. Nas amostras de leite tanto positivas como negativas, não foi detectada presença de álcool etílico, metanol, propanol e ácido butírico.

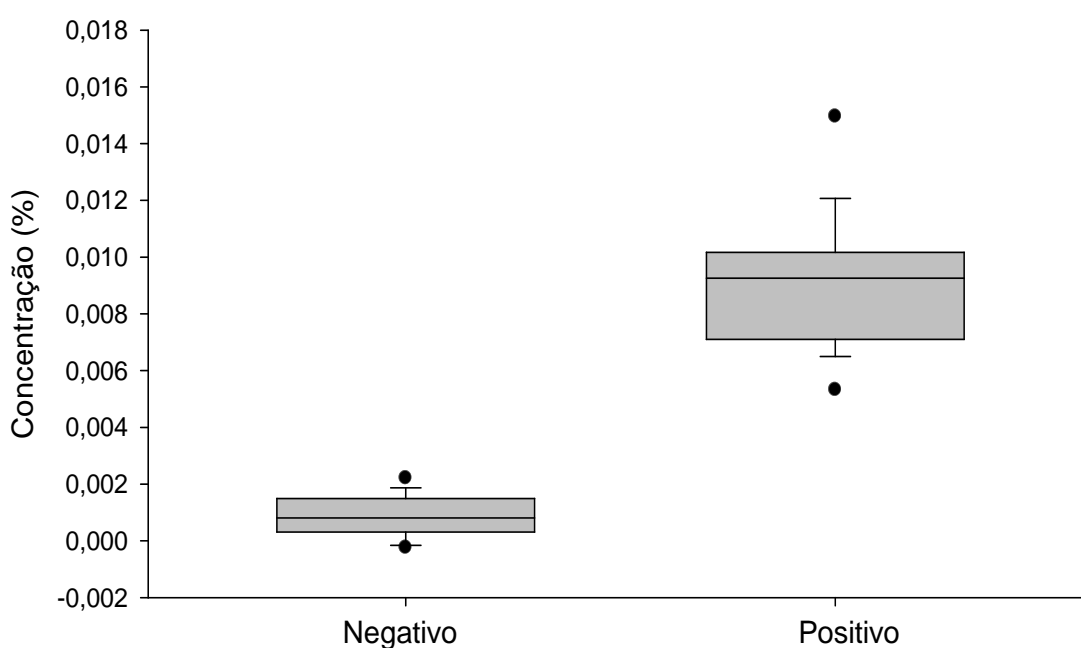


Figura 4 – Gráfico boxplot demonstrando a mediana da concentração de acetona em amostras de leite (N= 29 positivos; N= 29 negativos), detectada mediante cromatografia gasosa.

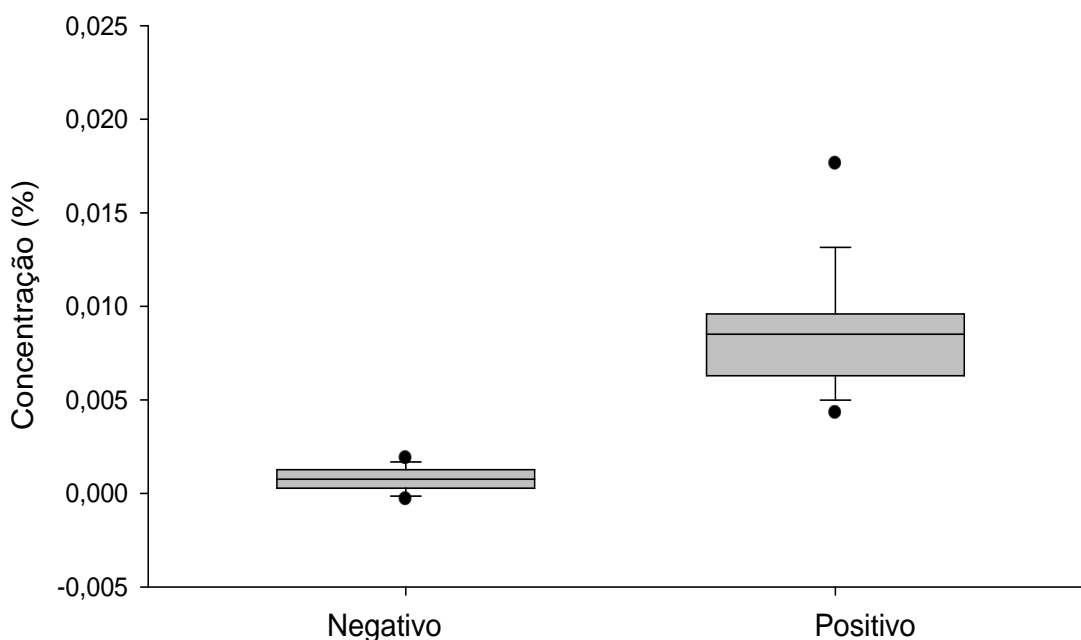


Figura 5 – Gráfico boxplot demonstrando a mediana da concentração de acetona nas amostras de soro sanguíneo (N= 29 positivos; N= 29 negativos), detectada mediante cromatografia gasosa.

A concentração de acetona no soro dos animais que produziram leite considerado positivo, também foi maior ($p < 0,05$) comparado aos animais que produziram leite considerado negativo. A concentração mediana de acetona no soro dos animais positivos para o teste foi de 0,008% e concentração mediana de acetona nos animais negativos foi de 0,0007%. Também não foi encontrado álcool etílico, nem a presença das demais substâncias voláteis pesquisadas (metanol, propanol e ácido butírico) no soro.

Os animais que tiveram o resultado do teste do álcool etílico positivo tiveram a concentração de BHB no soro maior ($p < 0,05$) comparado aos animais com resultado negativo. A concentração mediana de BHB sérico nos animais positivos ao teste de álcool foi de 1,07 mmol/L, enquanto que nos animais negativos a mediana foi de 0,56 mmol/L (Figura 6).

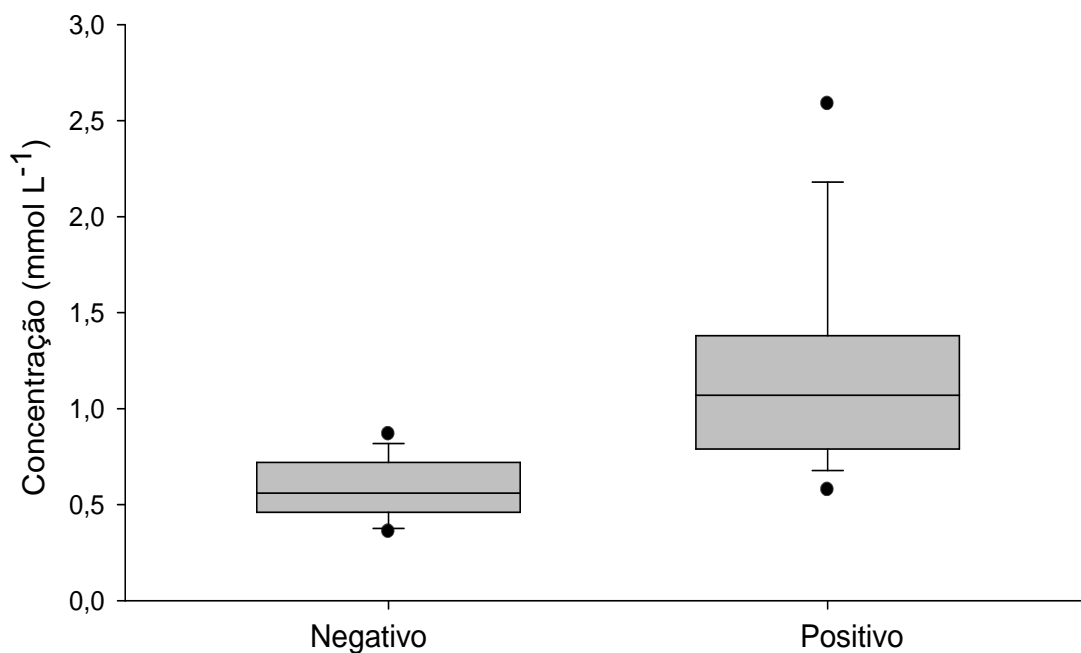


Figura 6 – Gráfico boxplot demonstrando a mediana da concentração de beta-hidroxibutirato (BHB) no soro de vacas com amostras de leite positivas (N= 29 positivos) e negativas (N= 29 negativos) ao teste do álcool.

A presença de substâncias voláteis (acetona, metanol, etanol, propanol e ácido butírico) nos alimentos fornecidos aos animais é apresentada na Figura 7. Somente nos alimentos que sofreram processo fermentativo foi detectada a presença de substâncias voláteis, sendo a substância em maior concentração o etanol seguido do isopropanol.

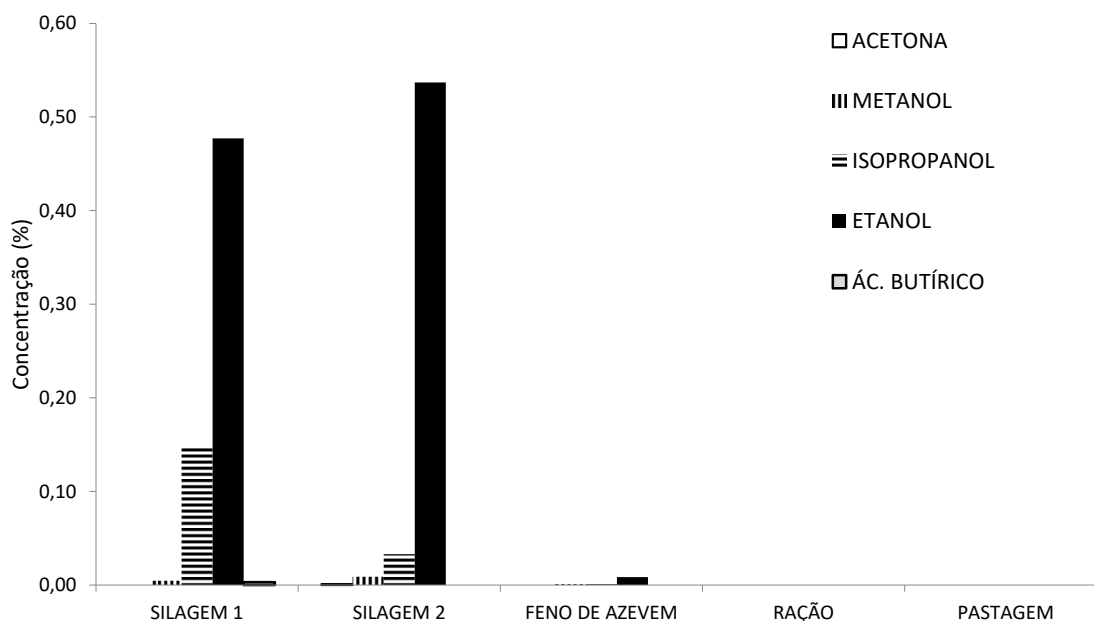


Figura 7 – Presença de substâncias voláteis (acetona, metanol, etanol, propanol e ácido butírico) nos alimentos fornecidos as vacas. Silagem 1: silagem fornecida aos animais da propriedade quando o teste do álcool etílico era positivo; Silagem 2: silagem fornecida aos animais da propriedade quando o teste do álcool etílico era negativo.

Balanço energético negativo e teste de álcool no leite (estudo de restrição de energia)

A Figura 8 demonstra a concentração mediana de acetona nas amostras de leite nos diferentes dias do experimento no grupo de vacas com restrição energética e no grupo das vacas sem restrição energética. As amostras tiveram resultados positivos e negativos para o teste do álcool etílico.

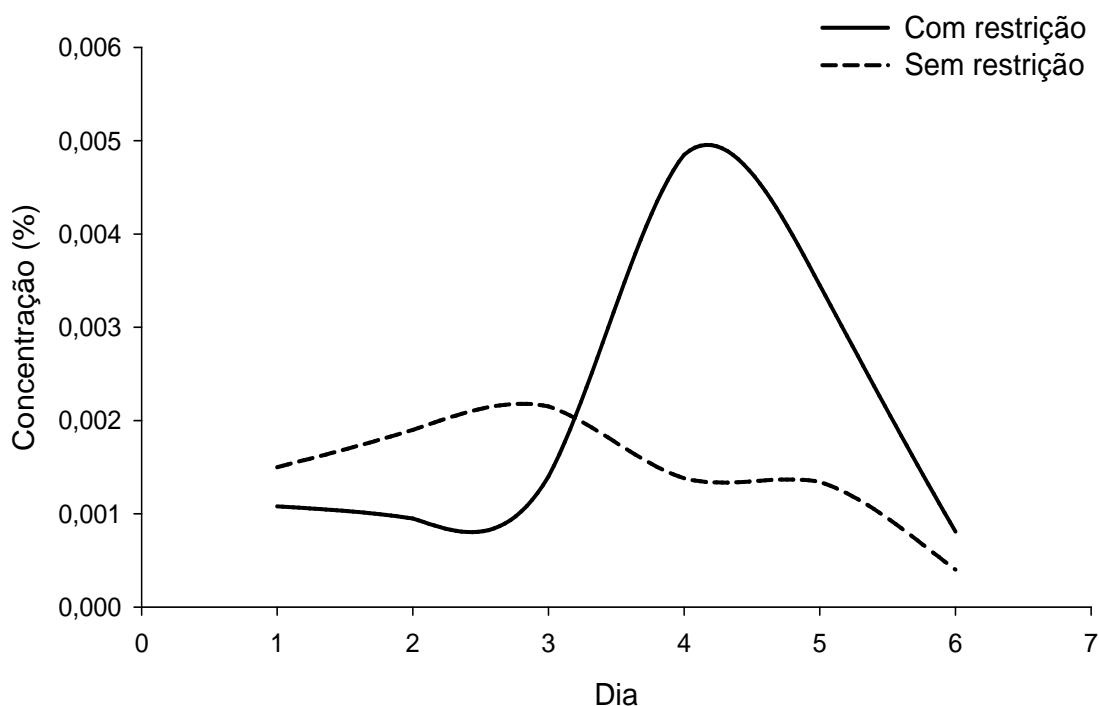


Figura 8 – Concentração mediana de acetona em amostras de leite em vacas com restrição (N= 9) e sem restrição (N= 9) energética alimentar. Período de restrição energética: do dia 1 ao dia 4.

A concentração de acetona no leite do primeiro dia ao terceiro foi similar, não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos nestes três dias. Neste mesmo período todos os animais do grupo com restrição energética apresentaram resultado negativo para o teste do álcool etílico. Já no grupo sem restrição energética neste período, somente dois animais apresentaram positividade para o teste, os demais animais apresentaram resultado negativo. Ao avaliar a concentração de acetona no leite dos animais positivos do grupo sem restrição, os resultados obtidos foram de 0,003% e 0,00305%, foram coletadas amostras de sangue destes animais para avaliar a concentração de BHB, as concentrações de BHB foram de 1,58 mmol/L e 2,18 mmol/L, respectivamente.

No dia 4, todos os animais do grupo com restrição energética apresentaram positividade ao teste do álcool etílico, ao mesmo tempo que a concentração de acetona no leite apresentava uma concentração maior ($p < 0,05$) comparado aos animais do grupo sem restrição. A concentração mediana de 0,004% nos animais positivos e concentração mediana de 0,001% nos animais do grupo sem restrição.

Nos dias 5 e 6 todos os animais do grupo sem restrição tiveram resultado negativo para o teste do álcool etílico, enquanto que para o grupo com restrição, no quinto dia, cinco animais tiveram resultado positivo para o teste do álcool etílico, já no sexto dia, todos os animais do grupo com restrição tiveram resultado negativo. Em ambos os dias ao ser comparado a concentração de acetona no leite entre os grupos, não houve diferença estatística ($p > 0,05$).

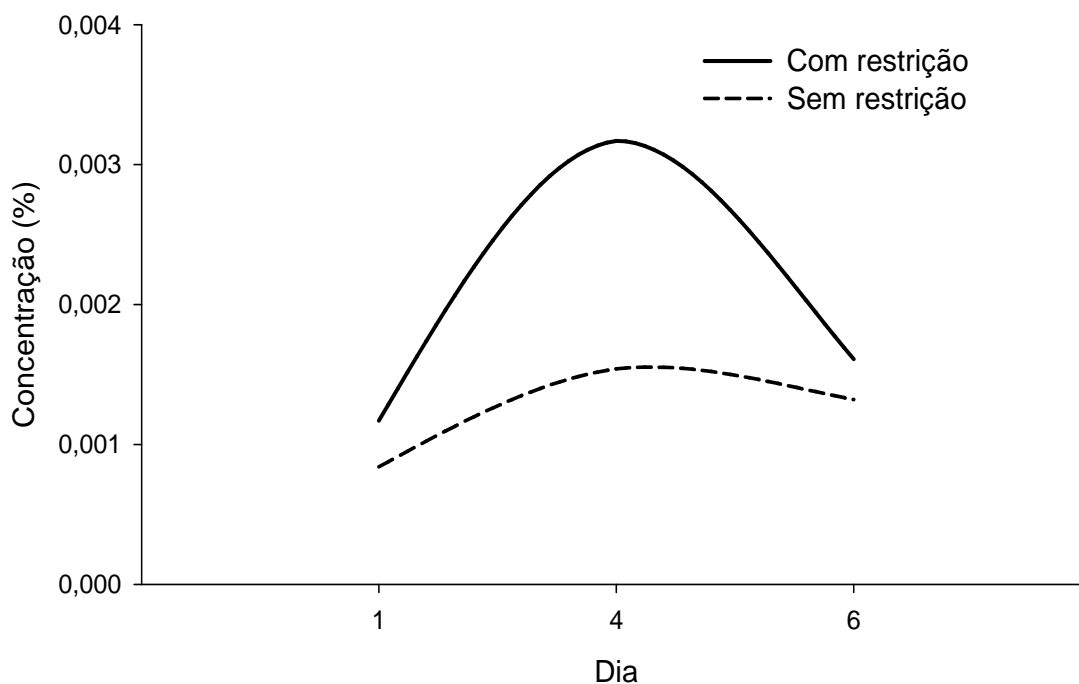


Figura 9 – Concentração mediana de acetona nas amostras de soro sanguíneo coletadas de vacas com restrição (N= 9) e sem restrição (N= 9) energética alimentar. Período de restrição energética: do dia 1 ao dia 4.

A concentração de acetona no soro sanguíneo (Figura 9) foi avaliada nos dias 1, 4 e 6. A concentração de acetona no soro foi maior no dia 4 nos animais do grupo com restrição comparado aos animais do grupo sem restrição, a mediana encontrada nos animais do grupo com restrição foi de 0,003%, no grupo sem restrição a concentração mediana foram de 0,001%, havendo diferença estatística ($P < 0,05$). Todos os animais do grupo com restrição apresentaram positividade para o teste do álcool etílico no quarto dia. Nos demais dias não houve diferença estatística na concentração de acetona no soro sanguíneo entre os grupos.

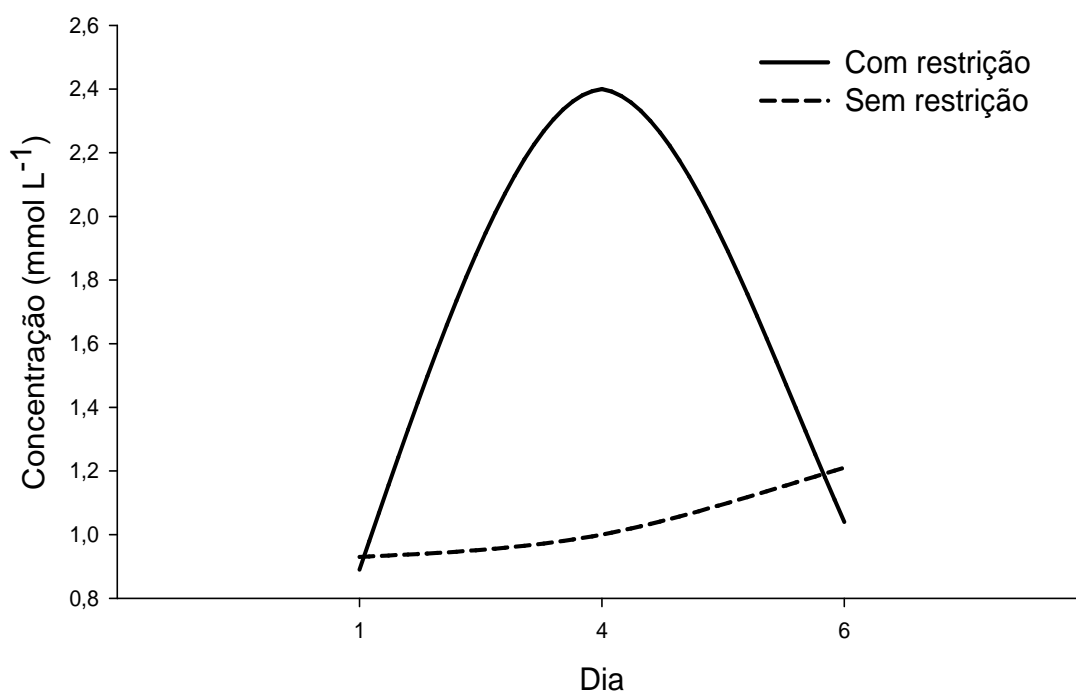


Figura 10 – Concentração mediana de BHB nas amostras de soro coletadas de vacas com restrição (N= 9) e sem restrição (N= 9) energética alimentar. Período de restrição energética: do dia 1 ao dia 4.

A concentração de BHB no soro (Figura 10) também foi avaliada nos dias 1, 4 e 6. A concentração de BHB também foi maior ($p < 0,05$) no dia 4, a concentração mediana foi de 2,40 mmol/L para o grupo com restrição e a concentração mediana de 1,0 mmol/L para o grupo sem restrição. O dia 4, coincide com a maior concentração de acetona no soro e no leite e com o momento em que os animais do grupo com restrição energética apresentaram positividade para o teste do álcool etílico.

Somente na silagem, único ingrediente fermentável da alimentação, foi encontrado a presença de substâncias voláteis. As substâncias voláteis encontradas foram ácido butírico, etanol, isopropanol e em menor concentração metanol. Nos demais alimentos e na água consumida pelos animais no momento das coletas não foi encontrada a presença de nenhuma substância volátil (Figura 11).

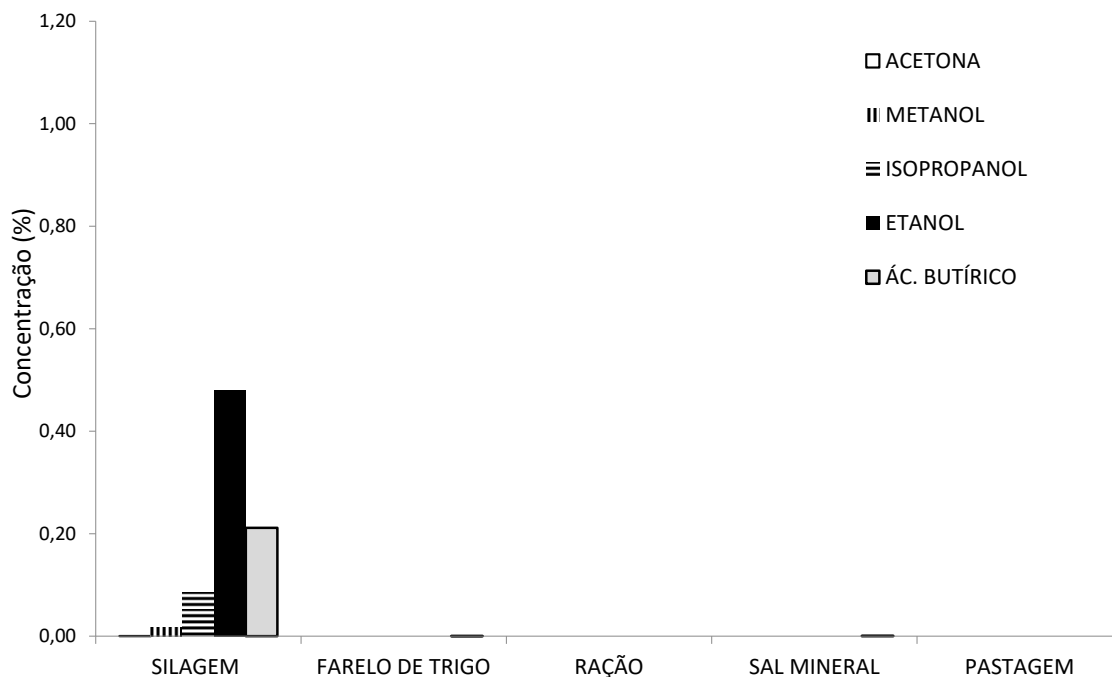


Figura 11 – Presença de substâncias voláteis nos alimentos fornecidos aos animais.

O resultado do teste em estudo, diante dos resultados analisados, foi influenciado pelo balanceamento energético da alimentação e não pela concentração das substâncias voláteis presentes nos alimentos, pelo fato de nenhuma amostra, com resultado positivo ou negativo, foi detectada a presença das substâncias pesquisadas nos alimentos, nas amostras de leite e sangue. Isso é justificado pelo metabolismo dos ruminantes, o etanol ingerido, no rúmen, é metabolizado pelos microrganismos presentes em acetato (CHALUPA et al., 1964; DURIX et al., 1991) e metano (CZERKAWSKI & BRECKENBRIDGE, 1972). Estudos demonstraram que infusões ruminais de etanol aumentaram a concentração ruminal de acetato e diminuíram a concentração de propionato (ORSKOV et al., 1967) e butirato (PRADHAN & HEMKEN, 1970).

Parte do etanol que não é metabolizado pelos microrganismos, é absorvido pela parede ruminal (BRUNING & YOKOYAMA, 1988). O etanol absorvido é metabolizado no fígado até a produção de acetil-CoA (MIRA & MANSO, 1993). De acordo com Raun e Kristensen (2011) as vacas possuem capacidade hepática suficiente de metabolizar os álcoois que são absorvidos pela parede ruminal.

Os resultados de acetona no soro sanguíneo (Figura 9), vão de acordo com os resultados encontrados por Gross et al. (2011) onde vacas com restrição alimentar apresentavam um aumento significativo na concentração dos corpos cetônicos no sangue. A concentração de acetona no leite é maior se comparado ao sangue (Figuras 4, 5, 8 e 9). Resultados similares foram encontrados por Winterbach (1993), que encontrou resultados da concentração de acetona no leite maiores do que a concentração de acetona encontrada no sangue dos animais. Andersson e Lundström (1985), avaliaram a variação diária da concentração de acetona no sangue e no leite a cada 4 horas, encontrando variações significativas nas concentrações de acetona durante o dia. No presente experimento a coleta de leite antecedeu a coleta de sangue entre 2 a 4 horas.

A acetona foi a substância mais abundante encontrada nas 360 amostras de leite analisadas por Toso et al. (2002) no norte da Itália, onde aproximadamente metade das amostras eram oriundas de vacas entre 4 e 16 semanas em lactação. A presença de acetona no leite está relacionada à ocorrência de cetose clínica ou subclínica (GUSTAFSSON & HEMANUELSON, 1996), é produzida a partir do acetoacetato por ação da enzima acetoacetato descarboxilase (GONZÁLEZ & SILVA, 2006).

Assim como a detecção de acetona é indicativo da ocorrência de cetose, o BHB é outro corpo cetônico mensurado para determinar a ocorrência de cetose subclínica ou clínica (OETZEL, 2004). No primeiro estudo não houve uma boa correlação entre a concentração de BHB e de acetona no sangue, este achado pode ser explicado pela variação diária de BHB e pelo metabolismo de cada substância.

Meier (2010) coletou diversas amostras de sangue no mesmo dia de 28 vacas para mensurar a variação diária de BHB, o autor afirma que a concentração diária de BHB variou significativamente. O resultado encontrado por Sutton et al. (1988), ao avaliar a concentração de BHB de 16 vacas, no período de 24 h, também indica que há uma variação diária significativa de BHB no sangue dos animais, sendo a variação maior quanto menos vezes os animais são alimentados durante o dia. As maiores concentrações de BHB encontradas no trabalho de Sutton et al. (1988) foram observadas na coleta das 10:30 e das 18:30 e as menores concentrações de BHB na coleta das 14:30 e na coleta das 06:30, sendo o resultado das 06:30 o menor de todas as coletas.

Enjalbert et al. (2001) analisaram a concentração de BHB, acetona e acetoacetato em 60 vacas multíparas, indicando um coeficiente de correlação baixo entre a concentração de BHB e acetona no sangue, porém o autor encontrou um coeficiente de correlação alto entre a concentração de acetona no sangue e no leite, corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho.

Duffield et al. (2009) (Figuras 5, 6, 9 e 10), afirmam que o aumento dos corpos cetônicos no sangue é devido os animais estarem em balanço energético negativo. Wood et al. (2004), citam que somente são gerados corpos cetônicos em situações em que é mobilizado o tecido adiposo para a geração de energia, quando o oxalacetato está no seu limite de utilização no ciclo de Krebs, em uma situação de balanço energético negativo. A cetose é uma doença metabólica relevante, Gonçalves (2015) cita que a prevalência de cetose subclínica é de 35,65% e de cetose clínica de 13,17% em 129 animais avaliados na região da Serra, no estado do Rio Grande do Sul. Fiorentin (2016), cita a incidência de 9% de cetose subclínica ao avaliar 299 animais de 15 rebanhos diferentes, em diferentes sistemas de manejo na região Oeste de Santa Catarina.

Nas Figuras 7 e 11, mostram-se as concentrações das substâncias voláteis encontradas somente nos alimentos fermentados. As substâncias em maior concentração foram o etanol e o isopropanol. Esperava-se a ausência das substâncias voláteis pesquisadas nos alimentos não fermentados. Não foi encontrada acetona. Porter e Murray (2001), afirmam que as substâncias como o etanol e o isopropanol são comuns de serem encontradas em amostras de silagens.

O resultado positivo no teste do álcool no leite, na ausência dos álcoois pesquisados, e na presença de acetona, pode ser devido que a acetona possui três regiões de reatividade, no oxigênio, no carbono da carbonila e no carbono adjacente a carbonila (VOLLHARDT & SCHORE, 2013). Solomons (2012), afirma que cetonas são suscetíveis a adição nucleofílica devido as características estruturais da molécula. Uma das reações possíveis é com a água, ocorrendo a hidratação da acetona por catálise ácida, nesta reação duas hidroxilas ficam ligadas a carbonila funcional, formando diol geminal (VOLLHARDT & SCHORE, 2013).

A acetona possui um isômero, o enol. A conversão da acetona em enol ocorre rapidamente em meios ácidos, esta isomeria é denominada de tautomeria cetoenólica. Da mesma forma que a acetona se converte em enol, o enol também pode se converter

em acetona, ocorrendo uma interconversão (Figura 12) (SOLOMONS, 2012; VOLLHARDT & SCHORE, 2013).

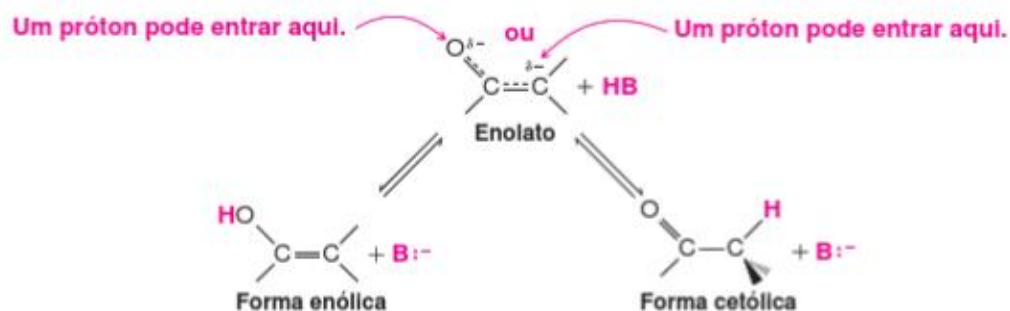


Figura 12 – Equilíbrio cetoenólico (SOLOMONS, 2012).

O enol correspondente a acetona é o 2-propenol, ele é caracterizado por possuir uma hidroxila ligada a carbonila funcional e por haver uma ligação insaturada entre carbonos. A ligação saturada entre os carbonos é uma ligação fraca, podendo haver adição de reagentes formando composto saturado (VOLLHARDT & SCHORE, 2013).

A oxidação de uma substância é caracterizada pelo recebimento de oxigênio ou doação de elétrons, enquanto que a redução é caracterizada pela remoção de oxigênio, ou pelo recebimento de elétrons. (VOLLHARDT & SCHORE, 2013). O dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) utilizado é um agente redutor, o cromo hexavalente (Cr^{+6}) possui coloração amarelo-alaranjada, quando ele é reduzido a cromo trivalente (Cr^{+3}), ele possui coloração verde. No teste do álcool etílico ocorre a redução do cromo hexavalente a trivalente, sendo a coloração esverdeada do cromo trivalente interpretada como positiva no teste do álcool etílico (BRASIL, 2006).

Jaky et al. (2000) afirma que cetonas são oxidáveis diante de soluções ácidas com permanganato, e são oxidáveis em primeira ordem, ou seja, a acetona oxida diretamente pelo ataque ao carbono da carbonila, o qual é suscetível ao ataque dos átomos de oxigênio que são de caráter nucleofílico, uma vez que cetonas são suscetíveis ao ataque nucleofílico (SOLOMONS, 2012; JAKY et al., 2000). O ataque nucleofílico do carbono da carbonila gera éster de permanganato, o qual é rapidamente oxidado, sendo o produto final da oxidação da acetona o ácido acético, o qual foi detectado por HPLC (JAKY et al., 2000). Evans e Sefton (1922) ao estudarem o processo de oxidação da acetona também encontraram como produto resultante da oxidação da acetona ácido acético, além do ácido acético também dióxido de carbono e ácido etanodióico, sendo que as

condições do teste eram as mesmas para a oxidação dos álcoois. Autores como Pechal et al. (1982) afirmam que cetonas são oxidáveis via enolização. As afirmações dos autores corroboram com os achados encontrados neste estudo, levando a crer que a produção do resultado falso positivo no teste do álcool etílico tenha ocorrido a partir de agentes cetogênicos oriundos do metabolismo dos animais.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas condições do presente experimento, nas amostras de leite com resultado positivo para o teste do álcool etílico não foi detectado etanol nem os demais álcoois pesquisados pela cromatografia gasosa, as vacas com amostras de leite positivas para o teste do álcool etílico continham concentrações de acetona no leite e no soro sanguíneo e de beta-hidroxibutirato sérico maiores do que as vacas com amostras de leite negativas ao teste de álcool. Os resultados sugerem que a presença desses corpos cetônicos no leite seja de origem endógena.

Os animais submetidos a balanço energético negativo produzem leite positivo para o teste do álcool etílico. Essa positividade está ligada à concentração de acetona presente no leite. A acetona presente no leite pode ser de origem endógena uma vez que ela também foi encontrada no soro dos animais, em maior concentração nos animais positivos. A acetona endógena pode estar ligada a ocorrência de cetose subclínica uma vez que os animais positivos tinham a concentração de BHB de 2,42 mmol/L.

A concentração das diferentes substâncias voláteis pesquisadas nos alimentos não foi capaz de influenciar no resultado do teste em estudo.

Sugere-se que, ao serem detectadas amostras positivas ao teste do álcool, sejam feitas análises complementares ou que se utilizem outros métodos com maior especificidade para a identificação de álcool etílico nas amostras de leite.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, M. S.; PIANTONI, P. Metabolic control of feed intake: implications for metabolic disease of fresh cows. **Veterinary clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 29, p. 279-297, 2013.
- ALLISON, M. J. Microbiologia da Digestão Fermentativa no Rúmen e no Intestino Grosso. In: REECE, W. O. **Fisiologia dos animais domésticos**. 12ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 438- 449.
- ANDERSSON, L.; LUNDSTRÖM, K. Effect of Feeding Silage with High Butyric Acid Content on Ketone Body Formation and Milk Yield in Postparturient Dairy Cows. **Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A**, [s. l.], v. 32, n. 1–10, p. 15–23, 1985.
- ANRIQUE, R. Metabolismo Ruminal de los Hidratos de Carbono. In: CONTRERAS, P.A.; NORO, M. **Rumen: morfofisiología, trastornos y modulación de la actividad fermentativa**. 3ª ed. Valdivia: América, 2010. p. 25-36.
- BAIRD, G. D. Primary Ketosis in the High-Producing Dairy Cow: Clinical and Subclinical Disorders, Treatment, Prevention, and Outlook. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 65, n. 1, p. 1–10, 1982.
- BERGE, A. C.; VERTENTEN, G. A field study to determine the prevalence, dairy herd management systems, and fresh cow clinical conditions associated with ketosis in western European dairy herds. **Journal of Dairy Science**, 2014. v. 97, n. 4, p. 2145–2154.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº. 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. Brasília: **Diário Oficial da União**, 14 de dez. 2006, Seção 1, p. 8.
- BRUNING, C. L.; YOKOYAMA, M. T. Characteristics of live and killed brewer's yeast slurries and intoxication by intraruminal administration to cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 66, p. 585-591, 1988.
- CEBALLO, P. P.; HERNÁNDEZ, R. Propriedades físico-químicas do leite e sua associação com transtornos metabólicos e alterações na glândula mamária. In: **Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001. p. 61-72.
- CHAGAS, L. M. et al. Insulin resistance in divergent strains of Holstein-Friesian dairy cows offered fresh pasture and increasing amounts of concentrate in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 216-222, 2009.
- CHALUPA, W., EVANS, J. L.; STILLIONS, M. C. Influence of ethanol on rumen fermentation and nitrogen metabolism. **Journal Animal. Science**, v. 23, p. 802–807, 1964.
- CONTRERAS, P.A. Ambiente Ruminal y Microorganismos. In: CONTRERAS, P.A.; NORO, M. **Rumen: morfofisiología, trastornos y modulación de la actividad fermentativa**. 3ª ed. Valdivia: América, p. 13-36, 2010.
- COOK, N. B.; WARD, W. R.; DOBSON, H. Concentrations of ketones in milk in early lactation, and reproductive performance of dairy cows. **Veterinary Record**, v. 148, p. 769–772, 2001.
- CORRÊA, M. N.; GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. (Org.). **Transtornos metabólicos nos animais domésticos**. Pelotas: Editora Universitária PREC/UFPEL, 2010. cap. 4, 520 p.
- CZERKAWSKI, J. w.; BRECKENRIDGE, G. Fermentation of various glycolytic intermediates

- and other compounds by rumen micro-organisms, with particular reference to methane production. **British Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 27, p. 131–146, 1972.
- DRACKLEY, J. K. Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final Frontier? **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 11, p. 2259–2273, 1999.
- DUFFIELD, T. F. Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. **Veterinary clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 16, p. 231-253, 2000.
- DUFFIELD, T. F. et al. Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 92, n. 2, p. 571–580, 2009.
- DURIX, A.; JEAN-BLAIN, C.; SALLMANN, H. P.; JOUNAY, J. P. Use of semicontinuous culture system (RUSITEC) to study the metabolism of ethanol in the rumen and its effects on ruminal digestion. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 71, p. 115-123, 1991.
- EMATER. Rio Grande do Sul/ASCAR. **Relatório socioeconômico da cadeia produtiva do leite no Rio Grande do Sul - 2017**. Porto Alegre, RS: Emater/RS – Ascar, 2017, p. 68.
- ENJALBERT, F. et al. Ketone Bodies in Milk and Blood of Dairy Cows: Relationship between Concentrations and Utilization for Detection of Subclinical Ketosis. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 84, n. 3, p. 583–589, 2001.
- EVANS, W. L.; SEFTON, L. B. The oxidation of acetone with Potassium Permanganate. **Journal American Chemical Society**, v. 44, p. 2276-2283, 1922.
- FIORENTIN, E. L. Incidência de transtornos metabólicos subclínicos em bovinos leiteiros na região Oeste de Santa Catarina. **Dissertação de Mestrado**. Porto Alegre: UFRGS, PPGCV, 2016. 62 p.
- GILLUND, P. et al. Body Condition Related to Ketosis and Reproductive Performance in Norwegian Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 84, n. 6, p. 1390–1396, 2001.
- GONÇALVES, R. S. Eficácia da administração de drench em vacas recém-paridas na prevenção de cetose, hipocalcemia subclínica, e seu efeito sobre a qualidade do leite. **Dissertação de Mestrado**. Porto Alegre: UFRGS, PPGCV, 2015. 37 p.
- GONZÁLEZ, F. H. D.; BARCELLOS, J.; PATIÑO, H. O.; RIBEIRO, L. A. **Perfil Metabólico em Ruminantes**: seu uso em nutrição e doenças nutricionais. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000. p. 7-8.
- GONZÁLEZ, F. H. D.; CAMPOS, R. Indicadores metabólico-nutricionais do leite. In: I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil, 2003, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003. p. 31-47.
- GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. Bioquímica clínica de glicídeos. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2006. p. 153-210.
- GRABACKA, Maja et al. Regulation of ketone body metabolism and the role of PPAR α . **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 17, n. 12, 2016.
- GROSS, J; DORLAND, H. A.; BRUCKMAIER, R. M.; SCHWARZ, F. J. Performance and metabolic profile of dairy cows during a lactational and deliberately induced negative energy balance with subsequent realimentation. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 1820-1830, 2011.
- GUSTAFSSON, A. H.; EMANUELSON, U. Milk acetone concentration as an indicator of hyperketonaemia in dairy cows: the critical value revised. **Animal Science**, [s. l.], v. 63, n. 2, p. 183–188, 1996.
- HERDT, T. H. Ruminant Adaptation to Negative Energy Balance. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, 2000. v. 16, n. 2, p. 215–230.

- HOLTENIUS, P.; HOLTENIUS, K. New aspects of ketone bodies in energy metabolism of dairy cows: a review. **Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A**, [s. l.], v. 43, n. 10, p. 579–587, 1996.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção da pecuária municipal 2016**. Rio de Janeiro. v. 44, 2016, 51 p.
- JEAN-BLAIN, C.; DURIX, A.; TRANCHANT, B. Kinetics of ethanol metabolism in sheep. **Reproduction Nutrition Development**, Les Ulis, v. 32, p. 83-90, 1992.
- KELLY, J. M. The use of metabolic profiles in dairy cows. **Cattle Practice**, Quedgeley, v. 18, p. 46-48, 1996.
- KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos Ruminantes**. 3ª ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2011, p. 212.
- KRISTENSEN, N. B.; STORM, A.; RAUN, B. M. L.; ROJEN, B. A. HARMON, D. L. Metabolism of Silage Alcohols in Lactating Dairy Cows. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 90, p. 1364-1377, 2007.
- LAUKOVÁ, A.; MAROUNEK, M. Physiological and biochemical characteristics of staphylococci isolated from the rumen of young calves and lambs. **Zentralblatt für Mikrobiologie**, v. 147, p. 489-494, 1992.
- LEBLANC, S. J.; LESLIE, K. E.; DUFFIELD, T. F. Metabolic Predictors of Displaced Abomasum in Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 88, n. 1, p. 159–170, 2005.
- LEBLANC, Stephen. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. **The Journal of reproduction and development**, [s. l.], v. 56 Suppl, p. S29-35, 2010.
- LEEK, B. Digestão no Estômago do Ruminante. In: REECE, W. O. **Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabarra Koogan, 12ª ed., 2006, p. 404- 437.
- LEIGHTON, B.; NICHOLAS, A R.; POGSON, C. I. The pathway of ketogenesis in rumen epithelium of the sheep. **The Biochemical Journal**, [s. l.], v. 216, n. 3, p. 769–772, 1983.
- LIN, Yan; TANAKA, Shuzo. Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 69, n. 6, p. 627–642, 2006.
- MCART, J. A. A.; NYDAM, D. V.; OETZEL, G. R. Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, 2012. v. 95, n. 9, p. 5056–5066.a
- MCDONALD, P. et al. Animal nutrition. **Animal nutrition**, [s. l.], p. 365, 2011.
- MCGARRY, J. D.; FOSTER, D. W. Regulation of Hepatic Fatty Acid Oxidation and Ketone Body Production. **Annual Review of Biochemistry**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 395–420, 1980.
- MEIER, S.; KOLVER, E. S.; VERKERK, G. A.; ROCHE, J. R. Effects of divergent Holstein-Friesian strain and diet on diurnal patterns of plasma metabolites and hormones. **Journal of Dairy Research**, 2010, v. 77, p. 432-437.
- MIRA, M. L.; MANSO, C. F. Alcool e radicais livres de oxigênio. **Acta medica portuguesa**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 193–198, 1993.
- MOIO, L. et al. Neutral Volatile Compounds in the Raw Milks from Different Species. **Journal of Dairy Research**, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 199–213, 1993.
- MORGAN, M. E.; PEREIRA, R. L. Volatile constituents of grass and corn silage. II. Gas-entrained aroma. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 45, p. 467– 471, 1962.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Catabolismo dos Ácidos Graxos. In: NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 4ª ed., 2006, p. 624 – 649.

- NELSON, D.L.; COX, M. M. Catabolismo de Ácidos Graxos. In: NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 6ª ed., 2014, p. 667 – 694.
- OETZEL, Garrett R. Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 651–674, 2004.
- ORSKOV, E. R.; HEMKEN, R. W.; MOORE, L. a. Effect of ethanol infusion on milk fat content and composition and on volatile fatty acids in the rumen liquor. **Journal of dairy science**, [s. l.], v. 50, n. 5, p. 692–5, 1967.
- OVERTON, T. R.; MCART, J. A. A.; NYDAM, D. V. A 100-Year Review: Metabolic health indicators and management of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 100, n. 12, p. 10398–10417, 2017.
- PAYNE, J. M.; PAYNE, S. **The Metabolic Profile Test**. Oxford University Press, 1987.
- PECHAL, M.; VOJTKO, J.; KUBENA, J.; HRUSOVSKY. Kinetics of the oxidation of aliphatic ketones by thallic salts in sulfuric acid medium. **React. Kinet. Catal. Lett.**, vol. 20, p. 151-155, 1982.
- PORTER, M. G.; MURRAY, R. S. The volatility of components of grass silage on oven drying and the inter-relationship between dry-matter content estimated by different analytical methods. **Grass and Forage Science**, [s. l.], v. 56, n. 4, p. 405–411, 2001.
- PRADHAN, K.; HEMKEN, R. W. Utilization of Ethanol and Its Effect on Fatty Acid Patterns in Ruminants. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 53, n. 12, p. 1739–1746, 1970.
- RAUN, B. M. L.; KRISTENSEN, N. B. Metabolic effects of feeding ethanol or propanol to postpartum transition Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 94, n. 5, p. 2566–2580, 2011.
- ROOKE, J. A.; MAYA, F. M.; ARNOLD, J. A.; ARMSTRONG, D. G. The chemical composition and nutritive value of grass silages prepared with no additive or with the application of additives containing either lactobacillus plantarum or formic acid. **Grass and Forage Science**, Malden, v. 43, p. 87-95, 1988.
- RUSSELL, J. B. Rumen. **Encyclopedia of Microbiology**, [s. l.], p. 163–174, 2009.
- SAMPSON, J.; HAYDEN, C. E. Physiological aspects of ketosis in cows and ewes with special reference to carbohydrate metabolism. **Cornell Vet**. 26, 183-199, 1936.
- SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. Aldeídos e Cetonas: Adição Nucleofílica ao Grupo Carbonila. In : SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. **Química Orgânica**. 10ª ed. Rio de Janeiro: GEN, v. 2, 2012, p. 146-193.
- SUTHAR, V. S. *et al.* Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 2013. v. 96, n. 5, p. 2925–2938.
- SUTTON, J. D. *et al.* Feeding frequency for lactating cows: diurnal patterns of hormones and metabolites in peripheral blood in relation to milk-fat concentration. **British Journal of Nutrition**. [s. l.], v. 60, n. 2, p. 265, 1988.
- TEUNISSEN, M. J.; KETS, E. P. W.; OP DEN CAMP, H. J. M.; HUIS IN'T VELD, J. H. J.; VOLGELS, G. D. Effect of coculture of anaerobic fungi isolated from ruminants and non-ruminants with methanogenic bacteria on cellulytic and xylanolytic enzyme activities. **Archives of Microbiology**, Gewerbestrasse, v. 157, p. 176-182, 1992.
- TOSO, B.; PROCIDA, G.; STEFANON, B. Determination of volatile compounds in cows' milk using headspace GC-MS. **The Journal of dairy research**, [s. l.], v. 69, p. 569–577, 2002.

- VANHOLDER, T. et al. Risk factors for subclinical and clinical ketosis and association with production parameters in dairy cows in the Netherlands. **Journal of Dairy Science**, 2015. v. 98, n. 2, p. 880–888.
- VOLLHARDT, P.; SCHORE, N. Grupo Funcional Hidroxila: Álcoois. In: VOLLHARDT, P.; SCHORE, N. **Química Orgânica: estrutura e função**. Porto Alegre: Bookman, 6ª ed., 2013, p. 287-386.
- WALSH, R. B. et al. The Effect of Subclinical Ketosis in Early Lactation on Reproductive Performance of Postpartum Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 90, n. 6, p. 2788–2796, 2007.
- WINTERBACH, Hanlie E. K. et al. Cyclic fluctuations in acetone concentrations in the blood and milk of clinically healthy dairy cows. [s. l.], v. 255, n. July, p. 247–255, 1993.
- WOOD, G. M. et al. Phenotypic and Genetic Influences on Test-Day Measures of Acetone Concentration in Milk. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 87, n. 4, p. 1108–1114, 2004.
- ZHANG, Chunhui et al. Current progress on butyric acid production by fermentation. **Current Microbiology**, [s. l.], v. 59, n. 6, p. 656–663, 2009.