



## Produção leiteira, composição do leite e perfil bioquímico sanguíneo de vacas lactantes sob suplementação com sal aniônico

Lúcia Treptow Marques<sup>1</sup>, Vivian Fischer<sup>2</sup>, Maira Balbinotti Zanela<sup>2</sup>, Maria Edi Rocha Ribeiro<sup>3</sup>, Waldyr Stumpf Junior<sup>3</sup>, Caroline Moreira Rodrigues<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas- Rua Anchieta, 3635/402 – 96015-420 – Pelotas, RS.

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Fernandes Vieira 181/601 – 90035091 – Porto Alegre, RS.

<sup>3</sup> Embrapa Clima Temperado, BR 392, Km 78, Caixa Postal 403 – 96001-970 – Pelotas, RS.

**RESUMO** - Objetivou-se avaliar os efeitos da inclusão de sal aniônico na dieta sobre as características físicas e a composição química do leite, o perfil bioquímico sanguíneo, a produção de leite, o peso e a condição corporal de vacas em lactação. Foram utilizadas 20 vacas da raça Jersey distribuídas em duas dietas, uma sem adição de sal aniônico e outra com adição de 0,25 kg/dia de cloreto de amônio. O delineamento empregado foi o completamente casualizado. As vacas sob suplementação com sal aniônico apresentaram menor pH urinário e aumento das concentrações sanguíneas de ureia, cálcio e magnésio. Com a dieta aniônica, o leite precipitou com menores concentrações de etanol, apresentou menor densidade, porcentagens de lactose, proteína e imunoglobulina, porém maior teor de cálcio iônico. O fornecimento de dieta aniônica durante a lactação resultou em acidose metabólica, o que alterou o perfil bioquímico sanguíneo e as características físico-químicas do leite.

Palavras-chave: acidose metabólica, dieta aniônica

## Milk yield, milk composition and biochemical blood profile of lactating cows supplemented with anionic salt

**ABSTRACT** - The objective of this work was to evaluate the inclusion of anionic salt in the diet on the physical characteristics and chemical composition of milk, biochemical blood profile, milk yield, body weight and condition. It was used 20 Jersey cows, distributed into two diets, a diet with no addition of anionic salt and one diet with addition of 0.25 kg/day of ammonium chloride. It was used a completely randomized design. Cows supplemented with anionic salt presented lower urinary pH and increase of blood contents of urea, calcium and magnesium. With the anionic diet, milk precipitated with lower ethanol concentration and it presented lower density, percentages of lactose, protein and immunoglobulin, but higher ionic calcium content. Supply of anionic diet during lactation resulted in metabolic acidosis, which altered the blood biochemical profile and milk physical-chemical characteristics.

Key Words: anionic diet, metabolic acidosis

### Introdução

O estado metabólico das vacas pode influenciar sua reserva corporal, a produtividade e as características físico-químicas do leite. Vacas com média a alta produtividade apresentam no início da lactação balanço negativo de energia (NRC, 2001) e podem ficar mais suscetíveis à acidose metabólica, em decorrência do consumo de quantidades expressivas de alimentos com carboidratos não-fibrosos, rapidamente fermentáveis (Mutswanga et al., 2004). Além disso, se também ocorrer estresse calórico, esse estresse pode provocar acidose metabólica, como uma resposta compensatória à alcalose respiratória (Schneider et al., 1988).

Vacas acidóticas podem apresentar redução da produção leiteira (Krause & Oetzel, 2006; Tucker et al., 1988), do percentual de gordura do leite (Plazier et al., 2008; Krause & Oetzel, 2006) e da estabilidade do leite no teste do álcool (Ponce & Hernández, 2005). Todavia, as dietas ministradas por Ponce & Hernández (2005) diferiram entre si quanto ao tipo e à proporção de volumoso e concentrado e essas características podem alterar a produção e composição do leite (Sutton, 1988), mesmo na ausência da acidose metabólica.

No entanto, nem sempre a acidose metabólica é prejudicial aos animais. O fornecimento de sais aniônicos no final do período seco aumenta a disponibilidade de cálcio e reduz a incidência e a prevalência de hipocalcemia

(Block, 1994; Corbellini, 1998). O fornecimento de carboidratos de rápida fermentação pode causar acidose metabólica por alterar o ambiente ruminal, propiciando, desta forma, a recuperação dos níveis séricos de cálcio no pós-parto imediato (Enemark, 2009; Mellau et al., 2004).

Existem muitas evidências sobre o efeito positivo do fornecimento de dietas com elevada diferença cátion-anion durante a lactação: aumento da produção leiteira e do percentual de gordura do leite (Hu & Murphy, 2004; Block, 1994), embora isso nem sempre ocorra (Chan et al., 2005). Entretanto, o efeito das dietas com excesso de ânions sobre a composição do leite é menos estudado, mas tem sido observada redução da produção leiteira (Tucker et al., 1988). Todavia, os efeitos do excesso de cargas negativas na dieta sobre outras características do leite, como a estabilidade, não foram avaliados.

Objetivou-se verificar o efeito da acidose metabólica causada pela adição de sal aniônico em dietas ministradas a vacas lactantes sobre os aspectos físicos, a composição química e a produção de leite, o perfil bioquímico do sangue, o pH urinário, o peso, a condição corporal e as frações proteicas do leite.

## Material e Métodos

O experimento foi conduzido na Estação Experimental de Terras Baixas, da Embrapa Clima Temperado, Rio Grande do Sul, com aprovação do comitê de pesquisa da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Foram utilizadas 20 vacas Jersey lactantes com peso corporal médio de  $347 \pm 48,5$  kg, produção de leite  $13,4 \pm 3,99$  L/dia e  $177 \pm 121$  dias em lactação.

O estudo durou 62 dias e foi dividido em três etapas: pré-experimental, adaptação às dietas e coleta de medidas. No período pré-experimental, realizado no período de 21/7 a 15/8/2005 (26 dias), os animais receberam 6,4 kg de concentrado (Tabela 1) e foram mantidos em pastagem de azevém-anual (*Lolium multiflorum*) e aveia-preta (*Avena strigosa*), com disponibilidade de massa de forragem superior a 1.500 kg MS/ha. No período de adaptação às dietas, realizado de 16 a 31/8/2005 (15 dias), as vacas foram divididas em dois grupos, com mesma alimentação e manejo da fase anterior, diferindo apenas quanto à inclusão do sal aniônico no concentrado. O dia 16/8/2005 foi considerado o primeiro dia do estudo.

Na adaptação dos animais ao sal aniônico, o grupo sob suplementação recebeu progressivamente cloreto de amônio: iniciou-se com 125 g/vaca/dia, aumentando a cada três dias 25 g/vaca/dia até chegar a 250 g/vaca/dia.

Tabela 1 - Composição dos suplementos, em kg de matéria seca/animal/dia

	Dieta controle	Dieta aniônica
Concentrado (kg/MS/dia)		
Milho grão moído	2,75	2,75
Casca de soja	1,06	1,06
Farelo de trigo	1,23	1,23
Farelo de soja	0,46	0,46
Calcário calcítico	0,10	0,10
Sal mineral	0,06	0,06
Cloreto de amônio	-	0,25
Dieta <sup>1</sup>		
Proteína (%)	17,04	17,04
Nutrientes digestíveis totais (%)	69,60	69,60
Cálcio (%)	0,78	0,78
Fósforo (%)	0,50	0,50
Cloro (%)	0,50	0,50
Enxofre (%)	0,20	0,20
Potássio (%)	2,17	2,17
Sódio (%)	0,22	0,22
DCA (meq/100 g MS) <sup>2</sup>	+ 10,0	- 20,0

<sup>1</sup> Composição da dieta considerando consumo médio de 30 kg de pasto (*in natura*).

<sup>2</sup> DCA – diferença entre cátion e ânions da dieta (meq (Na + K) - Cl)/100 g MS dieta.

Esse nível foi mantido por mais 21 dias, entre 1 e 22/9/2005, considerado a fase de coleta de medidas ou experimental. A dieta ministrada durante todo o experimento foi calculada para vacas com produção de 15 L/dia e peso de 350 kg (NRC, 2001).

O concentrado foi fornecido individualmente, duas vezes ao dia, em galpão de confinamento. Os animais foram mantidos juntos em pastagem de azevém-anual (*Lolium multiflorum*) e aveia (*Avena strigosa*), manejada para manter oferta de pasto diária mínima de 10 kg de matéria seca/100 kg de peso corporal, a fim de aumentar o consumo do pasto, que foi estimado de acordo com o método agrônomico, como a diferença entre a quantidade de pasto na entrada e na saída dos animais. Semanalmente, a quantidade de pasto nos piquetes foi estimada mediante corte de seis amostras da pastagem, realizado rente ao solo, com tesoura de esquila manual, em área delimitada por um quadrado de ferro de 0,25 m<sup>2</sup>. A oferta de pasto foi calculada considerando o peso dos animais dos grupos ao início do experimento e, durante o experimento, seu ajuste foi realizado modificando a área dos piquetes. O concentrado e o pasto foram amostrados quinzenalmente e, ao final do experimento, as amostras de cada alimento foram misturadas para formar uma amostra composta por alimento.

Os dados de produção leiteira, peso corporal, escore de condição corporal, amostras de urina e do leite foram coletados nos dias 16/8/2005, 1/9/2005 e 22/9/2005 e as amostras de sangue nos dias 16/8/2005 e 22/9/2005. A

produção de leite, de cada vaca, foi medida por meio de medidores automáticos. Os animais foram pesados individualmente e tiveram suas condições corporais avaliadas em escala de 1 a 5 (Wildman et al., 1982). As coletas individuais de urina foram realizadas por meio de massagem na vulva seis horas após o fornecimento da alimentação e o pH foi imediatamente medido por potenciometria.

As amostras de leite provenientes das ordenhas da manhã e tarde foram extraídas utilizando-se coletor automático e mantidas sob refrigeração (em torno de 6°C), acondicionadas em frascos destampados por 12 horas, para permitir a liberação do dióxido de carbono dissolvido. Após 12 horas foram misturadas e realizadas as análises no leite. A instabilidade ao etanol (precipitação) foi avaliada pela prova do álcool nas seguintes graduações: 68, 70, 72, 74, 76, 78 e 80% v/v de etanol na solução alcoólica (Marques et al., 2010; Zanela et al., 2006). A técnica consiste em misturar 2 mL de leite e 2 mL de solução alcoólica, homogeneizar por alguns segundos e realizando a avaliação individual da presença ou não de coágulos sobre uma placa de Petri. O resultado foi apresentado como nível de instabilidade (ou precipitação), que correspondeu ao menor nível de álcool em que ocorreu a precipitação. Foram realizadas as determinações de densidade e temperatura por termolactodensímetro (Tronco, 1997), acidez titulável (°Dornic), pH cálcio iônico por potenciometria com eletrodo seletivo (Barros, 2001). As amostras de leite foram enviadas para a Clínica do Leite – ESALQ - USP, acondicionadas em frascos, contendo o conservante bronopol. Foram determinados os teores de sólidos totais, gordura, lactose, proteína bruta, pelo método de espectrofotometria por radiação infravermelha com o equipamento Bentley 2000® (Bentley Instruments, 1995a; Fonseca & Santos, 2000). A ureia do leite foi determinada pelo método enzimático-colorimétrico e o número de células somáticas (CCS) pela contagem eletrônica por citometria de fluxo (Somacount 300®) (Bentley Instruments, 1995b). A porcentagem de sólidos desengordurados foi calculada com base nos sólidos totais, subtraída a porcentagem de gordura. O monitoramento da mastite foi realizado durante todo o experimento sendo a mastite subclínica quinzenalmente através do CMT e a mastite clínica, diariamente (antes das ordenhas), com o auxílio da caneca telada. As frações proteicas do leite, coletadas nos dias 15/8 e 22/9/2005, foram avaliadas por eletroforese, com determinação das porcentagens de lactoferrina, albumina sérica bovina, imunoglobulinas, caseína alfa S2, caseína alfa S1, caseína beta, caseína kappa e lactoglobulina (Barros, 2002).

As amostras de sangue foram coletadas da veia coccígea e enviadas para laboratório de análises clínicas (humano) Leivas Leite em até 2 horas pós-coleta, onde foram centrifugadas (2.500 rpm por 15 minutos) e separado o soro. Foram determinados os teores de glicose (método colorimétrico-ANVISA 10009010003), ureia (método enzimático UV, ANVISA 10009010020), creatinina (método colorimétrico cinético, picrato alcalino – Jaffe, ANVISA 10009010090); potássio (método fotometria de chama, ANVISA 10126310066), sódio (método fotometria de chama, ANVISA 10126310066) e cloretos (método colorimétrico – tiocianato de mercúrio, ANVISA 100019010090, cálcio total (colorimétrico – Arsenazo III, ANVISA 10009010090), fósforo (método UV Day e Ertingshausen modificado, ANVISA 10009010090) e magnésio (método colorimétrico magon sulfonado, ANVISA 10009010090).

Os resultados dos dados obtidos nos dias 16/8 e 22/9/2005 foram submetidos à análise de variância, considerando o efeito da dieta, e utilizando-se o valor inicial de cada atributo (medido no dia 16/8/2005) e o número de dias em lactação para ajustar os dados por co-variância, segundo o modelo:  $Y_{ij} = m + D_i + A_1 + L + e_{ij}$ , em que  $Y_{ij}$  = j-ésima observação recebendo o i-ésimo tratamento;  $m$  = média geral do experimento;  $D_i$  = i-ésimo tratamento (dieta controle ou dieta com sal aniônico);  $A_1$  = valor inicial observado do atributo;  $L$  = número de dias em lactação do animal; e  $e_{ij}$  = erro aleatório associado à j-ésima observação recebendo o i-ésimo tratamento. O nível máximo de probabilidade adotado foi de 0,05 (SAS, 2001). Considerou-se o leite negativo na prova do álcool na graduação 80%, como tendo precipitado em 80,1%. A contagem de células somáticas sofreu transformação logarítmica antes da análise estatística para normalizar a sua distribuição (Markus, 1973). A produção leiteira dos animais foi corrigida para 3,5% de gordura, segundo a fórmula:  $PLC\ 3,5\% = ((0.4324 \times PL) + (16.216 \times \% GB \times PL))$ .

## Resultados e Discussão

As vacas alimentadas com dieta aniônica apresentaram menores valores de pH urinário e peso corporal, valores semelhantes de produção de leite corrigida para 3,5% de gordura e tenderam a apresentar menor ECC em comparação ao grupo controle (Tabela 2). O peso corporal final do grupo controle foi mais elevado que o do grupo da dieta aniônica, parcialmente devido ao maior peso inicial do grupo controle (353,9 × 338,7 kg), mas efetivamente as vacas que receberam sal aniônico perderam peso. Autores como Block et al. (1994) e Jackson et al. (1992) verificaram que os animais que

Tabela 2 - Médias de peso corporal, escore de condição corporal, produção de leite e pH urinário, ajustados para o valor inicial de cada atributo e o número de dias em lactação

Atributos	Dieta		
	Controle	Aniônica	P>F
Peso corporal (kg)	358,39	333,15	0,0001
Varição de peso (kg/dia)	0,32	-0,33	0,0004
Escore de condição corporal	2,81	2,59	0,0587
Produção leite (L) <sup>1</sup>	19,48	19,04	0,8104
pH urina	7,51	5,17	0,0001

<sup>1</sup> Produção de leite corrigida para 3,5% de gordura.

receberam dietas com carga negativa consumiram menos e ganharam menos peso. No entanto, neste trabalho, não foi possível mensurar o consumo individual.

A ausência de efeito da suplementação com sal aniônico sobre a produção leiteira pode ser explicada pelo fornecimento de nutrientes, que foi semelhante entre os grupos, pois a dieta oferecida era semelhante em quantidade e composição, e pela capacidade das vacas leiteiras em compensar eventual redução do consumo de nutrientes com maior mobilização de reservas corporais, mantendo sua produção. Embora o consumo individual não tenha sido mensurado, o menor peso corporal final, maior perda de peso diária e tendência de redução do ECC das vacas, suplementadas com sal aniônico, indicam que isto possa ter ocorrido.

O pH urinário diminuiu de 7,89 para 5,17 nas vacas sob suplementação com sal aniônico, enquanto no grupo controle manteve-se dentro dos valores normais, ou seja, acima de 6,5 (Corbellini, 1998). Zanetti (2002) forneceu uma dieta aniônica a quatro novilhos holandeses, os quais inicialmente foram alimentados com dieta basal com balanço cátion-aniônico da dieta (BCAD) de +74,12 meq/kg de MS e, posteriormente, com dieta suplementada com sulfato de amônio, de maneira a diminuir o BCAD para -154,84 meq/kg de MS. Nessa dieta aniônica, o pH urinário decresceu, atingindo o valor de 5,56, comparável ao presente estudo.

Corbellini (1998) relata que o pH urinário animais alimentados com dietas acrescidas de cloretos ou sulfatos é menor que daqueles mantidos com dietas sem suplementação. Os rins são importantes na manutenção do equilíbrio ácido-base. Quando o pH sanguíneo tende a se tornar ácido, os rins respondem excretando íons amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) para aumentar o pH da urina. O acompanhamento do pH urinário é indicativo da eficiência da dieta aniônica e da ocorrência da acidose metabólica. Incrementando o ingresso de ânions fixos (Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>) na dieta, mediante administração dos chamados “sais aniônicos”, a concentração sistêmica do íon hidrogênio (H<sup>+</sup>) aumenta. O

maior impacto da dieta “aniônica” sobre o estado ácido-básico não reflete no pH sanguíneo, devido ao estreito controle através das funções renal e respiratória, mas no pH da urina, que diminui para valores menores de 7,5 (Corbellini, 1998). Mellau et al. (2004) forneceram dieta basal, com sal aniônico e com excesso de amido para vacas não lactantes e não prenhes. Os autores observaram valores de pH urinário de 5,8 a 5,96; 6,44 a 6,90 e 6,91 a 8,0, respectivamente para vacas recebendo dieta com sal aniônico, com excesso de amido e dieta basal.

As vacas alimentadas com dieta aniônica produziram leite com menor estabilidade à prova do álcool, valores menores de densidade, lactose, proteína bruta, extrato seco total e desengordurado e maiores teores de cálcio iônico (Tabela 3).

Entre os fatores que afetam a distribuição do cálcio iônico no leite, citam-se: pH, temperatura, adição ou remoção de cálcio, tempo de estocagem (Lewis, 2011). Embora o pH do leite não tenha diferido entre as dietas, o teor de cálcio iônico aumentou linearmente com a redução do pH urinário: teor de cálcio iônico = 0,65 - 0,086 × pH leite - 0,004 × pH urina + 0,01 × teor ureia no sangue (P < 0,01, R<sup>2</sup> = 0,68).

A estabilidade do leite na prova do álcool foi reduzida linearmente com o aumento do teor de cálcio iônico no leite: teor de etanol na mistura capaz de induzir a precipitação = 91,27 - 190,34 × teor de cálcio iônico (P < 0,01, R<sup>2</sup> = 0,34). Houve correlação negativa entre o teor de cálcio iônico e a concentração de álcool necessária para induzir a precipitação na prova do álcool (r = -0,59, P = 0,0082, n = 19), com o pH da urina (r = -0,75, P = 0,0002, n = 19) e com pH do leite (r = -0,62, P = 0,0042, n = 19). Quanto maiores os teores de cálcio iônico, menores são os valores de pH do leite e da urina e a concentração de etanol necessária para induzir à precipitação do leite na prova do álcool.

Tabela 3 - Aspectos físicos e composição química do leite, ajustados para o valor inicial de cada atributo e para o número de dias em lactação

Variável	Dieta		
	Controle	Aniônica	P>F
Precipitação (% álcool)	77,28	74,45	0,0175
Densidade (g/dL)	1030,61	1028,64	0,0002
Acidez titulável (°D)	17,36	16,77	0,1226
Lactose (%)	4,41	4,20	0,0059
Gordura (%)	5,64	5,24	0,1827
Proteína bruta (%)	3,79	3,60	0,0302
Extrato seco total (%)	15,07	14,29	0,0331
CCSt <sup>1</sup>	5,09	4,77	0,3504
N-ureico (mg/dL)	11,48	13,72	0,3010
Cálcio iônico (g/L)	0,074	0,087	0,0004
pH leite	6,63	6,61	0,2082

<sup>1</sup> Contagem de células somáticas corrigida por transformação logarítmica para análise de variância.

De acordo com Barros (2001), Molina et al. (2001), Negri et al. (2003) e Lin et al. (2003), leite com maior instabilidade à prova do álcool possui maior concentração de cálcio iônico. O cálcio livre diminui a repulsão entre as submicelas, o que fragiliza a estrutura micelar da caseína, deixando-a mais propensa à desestabilização e, conseqüentemente, à precipitação quando exposta à ação desidratante do etanol. Os teores de cálcio iônico foram 17% superiores em leites positivos: 0,110 vs 0,094 g/L comparados com amostras de leite estáveis ao teste do álcool (Barros, 2001). Esse percentual é semelhante ao encontrado no presente estudo de 18%.

A redução da densidade do leite do grupo que recebeu sal aniônico comparada com a do grupo controle pode ser explicada pelos menores teores de lactose e proteína observados. De acordo com Fonseca & Santos (2000), a densidade do leite é o peso específico do leite determinado por dois grupos de substâncias, de um lado a concentração de elementos em solução e em suspensão, e de outro a porcentagem de gordura. A redução da síntese de proteína e lactose, com seus reflexos sobre os teores de sólidos totais e desengordurados, pode estar relacionada à diminuição da síntese dos hormônios com ação anabolizante, como o hormônio do crescimento e o IGF-1 (Ballmer et al., 1995; Mutsuangwa et al., 2004).

Segundo Barros (2001), Ponce & Hernández (2005), Fischer et al. (2006), Zanela et al. (2006), Marques et al. (2007), o leite instável apresenta menores teores de lactose e proteína.

A contagem de células somáticas (CCS) não diferiu significativamente entre os grupos. O valor de CCS é influenciado por diversos fatores (Fonseca & Santos, 2000), que nesse estudo foram controlados e semelhantes nos dois grupos dietéticos, tais como a ocorrência de mastite, ordem e estágio de lactação.

Vacas alimentadas com dieta contendo sal aniônico apresentaram maiores valores de N-ureico, cálcio e magnésio no sangue (Tabela 4).

Tabela 4 - Composição química do sangue ajustada para o valor inicial e o número de dias em lactação

Variável	Dieta		
	Controle	Aniônica	P>F
Glicose (mg/dL)	64,49	66,81	0,3042
N-ureico (mg/dL)	9,67	11,77	0,0037
Creatinina (mg/dL)	0,91	0,89	0,4819
Potássio (meq/L)	4,21	4,26	0,7211
Sódio (meq/L)	133,03	132,28	0,7072
Cálcio (mg/dL)	8,20	8,88	0,0051
Fósforo (mg/dL)	4,85	5,00	0,6386
Magnésio (mg/dL)	2,17	2,60	0,0001
Cloreto (meq/L)	99,49	101,40	0,2454

Esse aumento do teor de N-ureico sanguíneo foi, possivelmente, relacionado à adição de cloreto de amônio, o qual contribuiu com o aporte de 0,07 kg de N e à maior degradação proteica do músculo, observada em outros estudos (Mutsuangwa et al., 2004; Ballmer et al., 1995). O fornecimento de cloreto de amônio a cabras leiteiras aumentou o teor de N-ureico no plasma (Fernández et al., 2001). A acidose metabólica induzida pelo fornecimento de sal aniônico pode ter reduzido a síntese proteica através de efeitos mediados pela redução das concentrações plasmáticas de IGF-1, tiroxina e triiodotiroxina em humanos (Ballmer et al., 1995) e, aumento da degradação proteica via rota proteolítica da ubiquitina, em vacas leiteiras (Mutsuangwa et al., 2004).

O aumento das concentrações de cálcio total e magnésio no plasma e cálcio iônico no leite nas vacas alimentadas com a dieta aniônica está relacionado a mecanismos de reabsorção óssea desses minerais, numa reação adaptativa dos animais a fim de evitar o decréscimo do pH sanguíneo (Moore et al., 2000). Zanetti (2002) relata que foram necessários 19 dias de consumo de uma dieta aniônica de -154,84 meq/kg de MS para aumentar os níveis séricos de cálcio total em bovinos em crescimento. Embora tenham sido detectadas diferenças nos teores de minerais sanguíneos entre os animais recebendo as duas dietas, seus valores se situam dentro ou próximos da faixa normal. Os valores dos minerais sanguíneos, considerados normais, segundo Gonzáles & Silva (2006), para alguns dos componentes sanguíneos são: glicose (45 a 75 mg/dL), N-ureico (7,91 a 20,93 mg/dL), potássio (3,9 a 5,8 meq/L), sódio (132 a 152 meq/L), cálcio (7,4 a 13 mg/dL), fósforo (3,4 a 7,1 mg/dL), magnésio (1,7 a 3 mg/dL) e cloretos (99 a 104 meq/L).

As concentrações de glicose e creatinina não diferiram entre si e se encontram dentro dos níveis reportados para animais bem nutridos. Em outros estudos, onde os animais sofreram restrição alimentar (Fischer et al., 2006) ou foram privados de alimento (Sobhani et al., 1998), a glicose sanguínea decresceu a valores inferiores a 50 mg/dL e a creatinina decresceu a valores abaixo de 0,80 mg/dL acompanhando a redução do peso dos animais.

Vacas recebendo a dieta com sal aniônico produziram leite com menor percentual de imunoglobulina (Tabela 5), provavelmente em decorrência da deficiência do sistema imune, observado em animais com acidose metabólica (Mutsuangwa et al., 2004). Não houve correlação entre o número de células somáticas e os valores de imunoglobulina, em concordância com os resultados de Caffin & Poutrel (1988). De acordo com Barros (2002), os valores das frações

Tabela 5 - Resultados das frações de proteína do leite analisadas por eletroforese, ajustados para as covariáveis: valor inicial de cada atributo e número de dias em lactação

Variável	Período experimental		
	Controle	Aniônica	P>F
Lactoferrina (%)	6,91	6,47	0,4292
Albumina sérica (%)	2,52	2,42	0,6836
Imunoglobulinas (%)	2,30	1,33	0,0461
Caseína alfa-S <sub>2</sub> (%)	5,48	5,41	0,8878
Caseína alfa-S <sub>1</sub> (%)	19,74	18,20	0,5241
Caseína beta (%)	28,66	25,23	0,3614
Caseína kappa (%)	1,99	2,45	0,0974
Lactoglobulina (%)	9,11	8,17	0,4230

proteicas deste estudo encontram-se dentro dos padrões normais para o leite bovino.

### Conclusões

O fornecimento de sal aniônico na dieta de vacas lactantes induz a acidose metabólica, reduz os teores dos sólidos lácteos e sua estabilidade ao teste do álcool, mas aumenta a concentração de cátions no leite e no sangue. Esse protocolo permite estudar o efeito da acidose metabólica sem o confundimento de diferentes proporções de volumoso:concentrado ou tipos de carboidratos.

### Agradecimentos

Ao CNPq, pelos recursos financeiros provenientes do edital universal 2003 e pela bolsa de produtividade em pesquisa. À CAPES, pelo concessão de bolsa de estudo, nível de doutorado. Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFPel, pela oportunidade de realização do doutorado. À EMBRAPA Clima Temperado, pelo convênio de pesquisa e pela cessão de instalações, animais experimentais e funcionários e pelo apoio logístico. À Universidade de Montevideo, Faculdade de Veterinária, pelo convênio de pesquisa e pela colaboração atuante de professor Luis Eduardo Barros Vidal e Gonzalo Bono. Aos bolsistas de iniciação científica e alunos de graduação, pelo trabalho durante o experimento.

### Referências

- BALLMER, P.E.; NIURLAMN, M.A.; HULTER, H.N. et al. Chronic metabolic acidosis decreases albumin synthesis and indices negative nitrogen balance in humans. *Journal of Clinical Investigation*, v.95, n.1, p.39-45, 1995.
- BARROS, L. Transtornos metabólicos que afetam a qualidade do leite. In: GONZÁLES, F.H.D.; DURR, J.W.; FONTANELLI, R.S. (Eds.). *Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras*. Porto Alegre: 2001. p.44-57.
- BARROS, L. Avaliação metabólico-nutricional de vacas leiteiras por meio de fluidos corporais (sangue, leite e urina). In: CONGRESSO NACIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29., 2002, Gramado. *Anais...* Gramado, 2002. p.18-26.
- BENTLEY INSTRUMENTS. *Bentley 2000: operator's manual*. Chaska, 1995a. 77p.
- BENTLEY INSTRUMENTS. *Somacount 300: operator's manual*. Chaska, 1995b. 12p.
- BLOCK, E. Manipulation of dietary cation-anion difference on nutritionally related production diseases, productivity, and metabolic responses of dairy cows. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO DE RUMINANTES, 1., 1994, Maringá. *Anais...* Maringá: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1994. p.21-48.
- CAFFIN, J.P.; POUTREL, B. Physiological factors influencing bovine immunoglobulin G2 concentrations in milk. *Journal of Dairy Science*, v.71, p.2035-2043, 1988.
- CHAN, P.S.; WEST, J.W.; BERNARD, J.K. et al. Effects of dietary cation-anion difference on intake, milk yield, and blood components of the early lactation cow. *Journal of Dairy Science*, v.88, p.4384-4392, 2005.
- COBELLINI, C.N. Etiopatogenia e controle da hipocalcemia e hipomagnesemia em vacas leiteiras. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE DEFICIÊNCIAS MINERAIS EM RUMINANTES, 1998, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1998. p.28.
- ENEMARK, J.M.D. The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): a review. *The Veterinary Journal*, v.176, p.32-43, 2009.
- FERNANDEZ, J.; SAHLU, T.; POTCHOIBA, M.J. et al. Subclinical hyperammonemia in dairy goats. *Small Ruminants Research*, v.42, n.1, p.5-20, 2001.
- FISCHER, V.; MARQUES, L.T.; ZANELA, M.B. et al. Chemical composition of unstable non-acid milk. *Revista de Ciências Veterinárias*, v.4, n.4, s.1, p.52, 2006.
- FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. *Qualidade do leite e controle da mastite*. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.
- GONZALES, F.H.D.; SILVA, S.G. *Introdução à bioquímica clínica veterinária*. 2.ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2006. 358p.
- HU, W.; MURPHY, M.R. Dietary cation-anion difference effects on performance and acid-base status of lactating dairy cows: a meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, v.87, p.2222-2229, 2004.
- JACKSON, J.A.; HOPKINS, D.M.; XIN, Z. et al. Influence of cation-anion balance on feed intake, body weight gain, and humoral responses of dairy calves. *Journal of Dairy Science*, v.75, p.1281, 1992.
- KRAUSE, K.M.; OETZEL, G.R. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Animal Feed Science and Technology*, v.126, p.215-236, 2006.
- LEWIS, M.J. The measurement and significance of ionic calcium in milk – a review. *International Journal of Dairy Technology*, v.64, n.1, p.1-13, 2011.
- MARKUS, R. *Elementos da estatística aplicada*. Porto Alegre: Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Diretório Acadêmico Leopoldo Cortês, 1973. 329p.
- MARQUES, L.T.; ZANELA M.B.; RIBEIRO M.E.R. et al. Ocorrência do Leite Instável ao álcool 76% e Não Ácido(LINA) e efeitos sobre os aspectos físico-químicos do leite. *Revista Brasileira de Agrociência*, v.13, n.1, p.91-97, 2007.
- MELLAU, L.S.B.; JORGENSEN, R.J.; BARLETT, P.C. et al. Effect of anionic salt and highly fermentable carbohydrate supplementation on urine pH and on experimentally induced hypocalcaemia in cows. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.139-147, 2004.
- MOLINA L.H.; GONZÁLEZ R.; BRITO, C. et al. Correlacion entre la termoestabilidad y prueba de alcohol de la leche a nivel de un centro de acopio lechero. *Archivos de Medicina Veterinaria*, v.33, n.2, p.233-240, 2001.

- MOORE, S.J.; VANDEHAAR, M.J.; SHARMA, B.K. et al. Effects of altering dietary cation-anion difference on calcium and energy metabolism in peripartum cows. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.2095-2104, 2000.
- MUTSVANGWA, T.; GILMORE, J.; SQUIRES, J.E. et al. Chronic metabolic acidosis increases mrna levels for components of the ubiquitin-mediated proteolytic pathway in skeletal muscle of dairy cows. **Journal of Nutrition**, v.134, p.558-561, 2004.
- NEGRI, L.; CHAVEZ M.; TAVERNA, M. et al. Determinación de las variables que afectan la estabilidad térmica de la leche utilizando un método capilar para evaluar el tiempo de coagulación por calor. **Revista Argentina de Lactología**, n.22, p.33-44, 2003.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. Washington, D.C.: National Academy Press, 2001. 381p.
- PLAIZIER, J.C.; KRAUSE, D.O.; GOZHO, G.N. et al. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences. **Veterinary Journal**, v.176, p.21-31, 2008.
- PONCE, P.C.; HERNÁNDEZ, R. Efecto de tres tipos de dieta sobre la aparición de trastornos metabólicos y su relación con alteraciones en la composición de la leche en vacas Holstein Friesian. **Zootecnia Tropical**, v.23, n.3, p.295-310, 2005.
- SCHNEIDER, P.L.; BEEDE, D.K.; WILCOX, C.J. Nycterohemeral patterns of acid-base status, mineral concentrations and digestive function of lactating cows in natural or chamber heat stress environments. **Journal of Animal Science**, v.66, p.112-125, 1988.
- SOBHANI, S.; VALIZADEH, R.; NASERIAN, A. Alcohol stability of milk and its relation to milk and blood composition in Holstein dairy cows. **Journal of Animal Science**, v.80, Suppl. 1/J. v.85, Suppl. 1, 1998.
- STATISTICAL ANALYSES SYSTEM - SAS. **SAS/STAT User's guide**, version 6. 4.ed. Cary: SAS Institute, 1989. 750p.
- SUTTON, J. Altering Milk composition by feeding. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.2801-2814, 1988.
- TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: Universidade de Santa Maria, 1997. 166p.
- TUCKER, W.B.; HARRISON, G.A.; HEMKEN, R.W. Influence of dietary cation-anion balance on milk, blood, urine and rumen fluid in lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.346-354, 1988.
- WILDMAN, E.E.; JONES, G.M.; WAGNER, P.E. et al. A dairy condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. **Journal of Dairy Science**, v.65, n.3, p.495-501, 1982.
- ZANELA, M.B.; FISCHER, V.; RIBEIRO, M.E.R. et al. Leite instável não-ácido e composição do leite de vacas Jersey sob restrição alimentar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.5, p.835-840, 2006.
- ZANETTI, M.A. Influência da dieta aniônica no balanço macromineral em novilhos holandeses. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n.3, p.283-289, 2002.