



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

**Contraste Leiteiro: Ferramenta de Monitorização
para uma maior Eficiência das Explorações de
Bovinos Leiteiros**

Inês Mota Domingues

Orientação:

Professora Doutora Cristina Maria Conceição Pinheiro

Professor Doutor Paulo de Jesus Infante dos Santos

Mestrado em Engenharia Zootécnica

Dissertação

Évora, 2018



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

**Contraste Leiteiro: Ferramenta de Monitorização
para uma maior Eficiência das Explorações de
Bovinos Leiteiros**

Inês Mota Domingues

Orientação:

Professora Doutora Cristina Maria Conceição Pinheiro

Professor Doutor Paulo de Jesus Infante dos Santos

Mestrado em Engenharia Zootécnica

Dissertação

Évora, 2018

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero expressar um grande e especial agradecimento à Professora Cristina Conceição, por todo o tempo disponibilizado, por toda a ajuda prestada, e acima de tudo, por ter sido um grande apoio ao longo deste percurso.

Quero agradecer também ao Professor Paulo Infante, por todo o trabalho que teve e pelo tempo que dispensou. Sem dúvida, que sem o seu apoio, esta tese não seria tão completa.

À Associação para o Desenvolvimento da Estação de Apoio à Bovinicultura Leiteira (EABL), e em especial ao Eng. Pedro Vaz, pela disponibilização dos dados e de toda a informação necessária para a realização desta dissertação.

Um agradecimento especial à Professora Glória, pela disponibilidade e prontidão.

A todos os meus amigos da Universidade, que sempre me apoiaram e me acompanharam ao longo deste enorme e espetacular percurso na Muy Nobre e Sempre Leal Cidade de Évora. Um obrigada especial à Ana e à Tiffany.

Quero agradecer também aos meus amigos de Leiria, por aceitarem e compreenderem a minha falta de tempo, e mesmo assim, sempre me apoiarem.

Ao Beto, por toda a compreensão, paciência e apoio, inequivocamente foste um grande suporte ao longo desta caminhada.

Por último, mas sem dúvida o agradecimento mais importante, à minha família, por sempre me terem apoiado e incentivado, principalmente aos meus Pais e à minha Irmã, sem eles nada teria sido possível.

RESUMO

Os resultados do contraste leiteiro são uma ferramenta de gestão. Desequilíbrios nutricionais, metabólicos e infecciosos podem ser diagnosticados pela concentração de β -hidroxibutirato(BHB), azoto ureico(MUN), gordura, proteína, relação gordura/proteína e células somáticas(SCC) do leite. O objetivo é avaliar a variação destes parâmetros segundo fatores não-nutricionais e a inter-relação entre estes. Analisou-se 110461 amostras de 9523 vacas recolhidas mensalmente entre janeiro de 2015 e março de 2017 em 27 efetivos do sul de Portugal. Ajustou-se dois modelos lineares generalizados mistos para determinar os fatores associados à concentração de BHB e MUN serem superiores a 0,2mmol/L e 300mg/kg, respetivamente. Verificou-se um considerável efeito dos fatores não-nutricionais, embora variável consoante o fator e o parâmetro. Os modelos demonstraram que a produção de leite, fase e número de lactação e a relação gordura/proteína influenciam a concentração de BHB e MUN. A concentração de BHB também é influenciada pela SCC e gordura, a MUN pela proteína.

Palavras Chave: contraste leiteiro, β -hidroxibutirato, azoto ureico, fatores não-nutricionais

TITLE - MILK RECORDING: MONITORING TOOL FOR GREATER DAIRY FARMS EFFICIENCY

ABSTRACT

Milk recording results are a management tool. Nutritional, metabolic and infectious disorders can be diagnosed by β -hydroxybutyrate(BHB), milk urea nitrogen(MUN), fat, protein, relation fat/protein and somatic cells concentration in milk. The objective is analyzed the variation of these parameters according to non-nutritional factors and the interrelation between them. This study analyzed 110,461 samples of 9,523 cows collected monthly from January 2015 to March 2017 from 27 herds of South of Portugal. Two generalized linear mixed regression models were constructed to determine non-nutritional factors associated with concentration of BHB and MUN greater than 0,2mmol/L and 300mg/kg, respectively. There was a considerable effect of non-nutritional factors, although variable according to factor and parameter. Models show that milk production, stage and number of lactation, and relation fat/protein influenced BHB and MUN concentration. BHB concentration is also influenced by somatic cells and milk fat, MUN concentration by milk protein.

Key Words: milk recording, β -hydroxybutyrate, milk urea nitrogen, non-nutritional factors

ÍNDICE

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract	v
Índice de Tabelas	viii
Índice de Figuras.....	xi
Índice de Anexos.....	xiv
Lista de Abreviaturas.....	xvi
1 Introdução	1
2 Revisão Bibliográfica	3
2.1 Contraste Leiteiro	3
2.2 Parâmetros Avaliados no Contraste Leiteiro e Fatores de Variação	5
2.2.1 Produção de Leite e Lactose.....	6
2.2.2 Gordura	12
2.2.3 Proteína.....	16
2.2.4 Relação Gordura / Proteína (G/P).....	18
2.2.5 Ureia.....	20
2.2.6 β -Hidroxiacetato (BHB)	30
2.2.7 Células Somáticas.....	38
2.2.8 Inter-Relação dos Parâmetros	42
3 Material e Métodos.....	51
3.1 Material.....	51
3.2 Métodos.....	51
3.2.1 Análise Estatística	52
4 Resultados e Discussão.....	56
4.1 Análise Descritiva da Amostra.....	56
4.2 Quantidade e Qualidade do Leite: variação por exploração, ao longo da lactação, número de lactação, número de ordenhas diárias e ao longo do ano	58
4.2.1 Produção de Leite Diária e Percentagem de Lactose.....	58
4.2.2 Percentagem de Gordura, Proteína e a Relação G/P.....	63
4.2.3 Concentração de Azoto Ureico no Leite (MUN)	70
4.2.4 Concentração de β -hidroxiacetato (BHB).....	72
4.2.5 Contagem de Células Somáticas (SCC).....	75
4.2.6 Modelos Lineares Generalizados Mistos (GLMM).....	77
5 Conclusão	86

6	Bibliografia.....	88
7	Anexos.....	100

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Intervalo de tempo em que ocorre o pico de lactação e o pico de ingestão em vacas de leite	7
Tabela 2 - Divisão da lactação em fases consoante o comportamento fisiológico e as estratégias alimentares e reprodutivas.	9
Tabela 3 -Variação da produção de leite consoante o número de ordenhas realizadas (Adaptado de Nunes, 2004).	11
Tabela 4 – Variação da produção de leite consoante o mês e a época do ano.....	11
Tabela 5 - Percentagem de lactose considerada normal para vacas de leite.	12
Tabela 6 – Variação da percentagem de gordura consoante o número de ordenhas realizadas (Adaptado de Nunes, 2004).....	14
Tabela 7 – Variação da percentagem de gordura consoante a época do ano.	14
Tabela 8 - Divisão da percentagem de gordura do leite a partir do qual se considera que o valor é baixo, normal ou alto.	15
Tabela 9 - Variação da percentagem de proteína consoante o número de ordenhas realizadas (Adaptado de Nunes, 2004).....	17
Tabela 10 - Divisão da percentagem de proteína do leite a partir do qual se considera que o valor é baixo ou normal.	18
Tabela 11 - Associação entre a relação G/P e o balanço energético (BE).	19
Tabela 12 - Divisão da relação G/P a partir do qual se considera que o valor é baixo, normal ou alto.	19
Tabela 13 - Associação entre a relação G/P e a ocorrência de transtornos metabólicos e/ou infecciosos.	20
Tabela 14 - Correlação entre a concentração de BUN e MUN.	22
Tabela 15 - Variação da concentração de MUN ao longo da lactação.....	23
Tabela 16 - Variação da concentração de MUN consoante o número de lactação.....	23
Tabela 17 - Variação da concentração de MUN ao longo do dia.....	24
Tabela 18 - Variação da concentração de MUN consoante a época do ano.....	24
Tabela 19 - Variação da concentração de MUN consoante o mês do ano.	24
Tabela 20 - Correlação entre a PB e a concentração de MUN.	25
Tabela 21 - Influência da composição da dieta alimentar na concentração de MUN.	25
Tabela 22 - Variação da concentração de amoníaco no rúmen e de BUN e MUN após a ingestão.	26

Tabela 23 - Conversão da concentração de ureia em MUN e vice-versa (Adaptado de Márquez, 2006).	27
Tabela 24 - Divisão da concentração de MUN a partir do qual se considera que o valor é baixo, normal ou alto.	27
Tabela 25 - Número de animais por grupo de amostragem.	28
Tabela 26 – Associação entre a concentração de MUN e a percentagem de proteína no leite em que existe um equilíbrio da dieta alimentar.	28
Tabela 27 - Interpretação da concentração de MUN consoante a percentagem de proteína do leite.	29
Tabela 28 - Possíveis utilizações do valor de MUN.	29
Tabela 29 - Percentagem de animais com elevada concentração de BHB até aos 35 dias de lactação (Adaptado de Santschi et al., 2016).	32
Tabela 30 – Definição do intervalo de valores da concentração de BHB no leite, a partir dos quais se considera que o risco é baixo, moderado ou alto, de o animal estar sob a ocorrência de transtornos metabólicos	34
Tabela 31 – Definição do intervalo de valores da concentração de BHB no leite, a partir dos quais se considera que o risco é baixo, moderado ou alto, de o animal estar sob a ocorrência de transtornos metabólicos	35
Tabela 32 - Dimensão da amostra necessária para estimar a prevalência de animais com elevados metabolitos energéticos (Adaptado de Ospina et al., 2013).	36
Tabela 33 - Variação da SCC ao longo da lactação (Adaptado Sharma et al., 2011).	39
Tabela 34 - Variação da SCC consoante a idade do animal (Adaptado Sharma et al., 2011).	40
Tabela 35 – Variação da SCC consoante o mês do ano (Adaptado de Cinar et al., 2015).	41
Tabela 36 – Definição do intervalo de valores da SCC, a partir dos quais se considera que o risco é baixo ou alto, de o animal estar sob a ocorrência de transtornos infecciosos.	41
Tabela 37 - Diferença da produção de leite consoante a concentração de BHB no sangue e leite (Adaptado de Duffield et al., 1997, Jorge, 2009, LeBlanc, 2010, Raboisson et al., 2014, Schwarz et al., 2015 e Santschi et al., 2016)	43
Tabela 38 - Diminuição da produção de leite diária consoante a SCC.	44
Tabela 39 - Alterações na composição do leite consoante a concentração de BHB.	45
Tabela 40 - Alterações na composição do leite consoante a SCC (Adaptado de Sharma et al., 2011).	46
Tabela 41 - Relação entre a concentração de MUN e a percentagem de gordura do leite.	47
Tabela 42 - Grau de associação entre duas variáveis consoante o coeficiente de correlação (Adaptado de Almeida, 2012).	48

Tabela 43 - Coeficiente de correlação entre os parâmetros e fatores.	48
Tabela 44 - Definição do intervalo de valores da percentagem de gordura, proteína, da relação G/P e da concentração de MUN, a partir dos quais se considera que os valores são baixos, normais ou altos.	50
Tabela 45 - Definição do intervalo de valores da concentração de BHB e da SCC, a partir dos quais se considera que o risco é baixo, moderado ou alto de o animal estar sob a ocorrência de transtornos metabólicos e/ou infecciosos.....	50
Tabela 46 - Definição do intervalo de valores considerado aceitável para cada variável.	52
Tabela 47 - Definição das categorias e códigos das variáveis.	52
Tabela 48 – Variáveis explicativas, suas categorias, e categoria de referência do modelo A (BHB).	53
Tabela 49 - Variáveis explicativas, suas categorias, e categoria de referência do modelo B (MUN).	54
Tabela 50 - Análise descritiva da quantidade e qualidade do leite dos animais contrastados nas 4 regiões do Alentejo.	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Medidor de fluxo digital da produção de leite (a); Medidor volumétrico da produção de leite (b); Copo ou frasco de recolha da amostra (c) (Ruralbal, 2017).	4
Figura 2 - Equipamento voluntário de ordenha (DeLaval, 2017).....	5
Figura 3 - Descrição dos fatores nutricionais e não-nutricionais.....	6
Figura 4 –Variação da produção de leite (1a), da IMS (1a), da energia necessária e ingerida (1b), do balanço energético (1b), da condição corporal (1c) e da fertilidade (1d) das vacas de leite ao longo da lactação (Wattiaux, 2011; Kellogg et al., 1977 e NRC, 2001 citados por eXtension, 2012).	7
Figura 5 - Síntese das moléculas de gordura do leite nas células epiteliais da glândula mamária de bovino (Adaptado de Shingfield et al., 2012).	13
Figura 6 - Influência da composição da dieta alimentar na síntese de gordura na glândula mamária (Adaptado de Dias, 2006).	15
Figura 7 - Visão global do fluxo de azoto em ruminantes lactantes (Adaptado de Spek et al., 2013). (as setas representam os fluxos e as caixas delimitadas pela linha sólida representam as moléculas).	21
Figura 8 - Processo de oxidação dos NEFA no fígado de bovino (Adaptado de Allen & Piantoni, 2017).	31
Figura 9 - Interpretação da concentração de BHB no sangue, obtido através de amostras individuais, utilizando um intervalo de confiança de 75% e um nível de alarme de 10% (12 animais amostrados em 50) (Adaptado de Oetzel, 2004).....	37
Figura 10 - Probabilidade de classificar um efetivo como negativo (triângulo), no limite (círculo), ou positivo (quadrado) para a ocorrência de cetose subclínica utilizando um valor limite de $\geq 1,4$ mmol/L para a concentração de BHB (12 animais amostrados em 50, com um nível de alarme de 10% e um intervalo de confiança de 75%) (Adaptado de Oetzel, 2004).....	37
Figura 11 - Recomendações para a monitorização da concentração de BHB em efetivos de vacas de leite (Adaptado de Ospina et al., 2013).....	38
Figura 12 - Relação entre a SCC e o estado de infeção da glândula mamária (Adaptado de Sharm et al., 2011).....	39
Figura 13 – Localização das explorações nas 4 regiões do Alentejo (Adaptado de INE, 2015). ..	51
Figura 14 - Número de animais por exploração	56
Figura 15 – Número de animais por número de lactação (a) e por número de ordenhas diárias (b).....	56

Figura 16 - Variação da produção de leite diária (a) e da percentagem de lactose (b), consoante a exploração.	59
Figura 17 - Variação da produção de leite diária (a) e da percentagem de lactose (b), consoante a fase de lactação.	60
Figura 18 - Variação da produção de leite diária (a) e da percentagem de lactose (b), consoante o número de lactação.	61
Figura 19 - Variação da produção de leite diária (a) e da percentagem de lactose (b), consoante o número de ordenhas diárias.....	62
Figura 20 - Variação da produção de leite diária (a) e da percentagem de lactose (b) ao longo do ano.	62
Figura 21 - Variação da percentagem de gordura (a), proteína (b) e da relação G/P (c), consoante a exploração.	64
Figura 22 - Variação da percentagem de gordura (a), proteína (b) e da relação G/P (c), consoante a fase de lactação.	65
Figura 23 - Variação da percentagem de gordura (a), proteína (b) e da relação G/P (c), consoante o número de lactação.	66
Figura 24 - Variação da percentagem de gordura (a) proteína (b) e da relação G/P (c), consoante o número de ordenhas diárias.....	68
Figura 25 - Variação da percentagem de gordura (a), proteína (a) e da relação G/P (b) ao longo do ano.	69
Figura 26 - Variação da concentração de MUN consoante a exploração.	71
Figura 27 – Variação da concentração de MUN consoante o número de ordenhas diárias (a) e ao longo do ano (b).....	71
Figura 28 - Variação da concentração de BHB consoante a exploração.	73
Figura 29 - Variação da concentração de BHB consoante o número de ordenhas diárias (a) e o mês do ano (b).	73
Figura 30 - Variação da SCC consoante a exploração.	75
Figura 31 - Variação da SCC ao longo da lactação (a) e consoante o número de lactação (b)....	75
Figura 32 - Variação da SCC consoante o número de ordenhas diárias (a) e ao longo do ano (b).	76
Figura 33 – Razão de possibilidades de uma vaca, que produz 10 ou 20kg de leite diário, ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L, e respetivas bandas de confiança a 95%, quando comparada com outra vaca com diferente produção.	78

Figura 34 - Razão de possibilidades de uma vaca, numa determinada fase de lactação, ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L, quando comparada com outra vaca na fase de referência (42 a 55 dias), tanto para primíparas como para multíparas.	79
Figura 35 - Razão de possibilidades de primípara ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L, quando comparada com uma multípara, tendo em conta a fase de lactação e a SCC.	80
Figura 36 - Razão de possibilidades de uma vaca com a SCC inferior a 200×10^3 células/mL ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L, quando comparada com outra vaca que tenha uma SCC entre 200 e 400×10^3 células/mL ou uma vaca que tenha uma SCC superior a 400×10^3 células/mL, tendo em conta o número de lactação.	81
Figura 37 – Razão de possibilidades de uma vaca ter uma concentração de MUN superior a 300mg/kg, consoante a diferença de produção de leite diária relativamente a outra vaca, e respetivas bandas de confiança a 95%.	82
Figura 38 - A razão de possibilidades de uma vaca, numa determinada fase de lactação, ter uma concentração de MUN superior a 300mg/kg, quando comparada com outra da mesma lactação, mas que se encontra na fase de referência (42 a 55 dias).	83
Figura 39 - Razão de possibilidades de uma vaca, com uma percentagem de proteína inferior a 3%, ter uma concentração de MUN superior a 300mg/kg, quando comparada com outra vaca com uma percentagem de proteína superior.	84

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 – Métodos internacionais de referência (Adaptado de ICAR, 2016).....	100
Anexo 2 - Métodos de rotina instrumentais (Adaptado de ICAR, 2016).....	100
Anexo 3 – Exemplo de um ficheiro de Excel (2013), por exploração, fornecidos pela EABL. ...	101
Anexo 4 - Ficheiro de Excel (2013) final com todos os dados filtrados compilados.....	101
Anexo 5 - Correlações de Spearman.....	102
Anexo 6 - Número de animais por exploração.....	103
Anexo 7 – Médias, desvios padrões e medianas da produção de leite diária e percentagem de lactose, consoante a exploração.	104
Anexo 8 - Médias, desvios padrões e medianas da percentagem de gordura e de proteína, consoante a exploração.	105
Anexo 9 – Médias, desvios padrões e medianas da relação G/P e da concentração de MUN, consoante a exploração.	106
Anexo 10 - Médias, desvios padrões e medianas da concentração de BHB e da SCC, consoante a exploração.....	107
Anexo 11 – Médias, desvios padrões e medianas da produção de leite diária e percentagem de lactose, consoante a fase de lactação.....	107
Anexo 12 - Médias, desvios padrões e medianas da percentagem de gordura e proteína, consoante a fase de lactação.	107
Anexo 13 – Médias, desvios padrões e medianas da relação G/P e da concentração de MUN, consoante a fase de lactação.	108
Anexo 14 - Médias, desvios padrões e medianas da concentração de BHB e da SCC, consoante a fase de lactação.	108
Anexo 15 – Médias, desvios padrões e medianas da produção de leite diária e percentagem de lactose, consoante o número de lactação.....	108
Anexo 16 - Médias, desvios padrões e medianas da percentagem de gordura e proteína, consoante o número de lactação.	108
Anexo 17 – Médias, desvios padrões e mediana da relação G/P e da concentração de MUN, consoante o número de lactação.	108
Anexo 18 - Médias, desvios padrões e mediana da concentração de BHB e da SCC, consoante o número de lactação.	109
Anexo 19 – Médias, desvios padrões e medianas da produção de leite diária e da percentagem de lactose, consoante o número de ordenhas diárias.....	109

Anexo 20 - Médias, desvios padrões e medianas da percentagem de gordura e proteína, consoante o número de ordenhas diárias.....	109
Anexo 21- Médias, desvios padrões e medianas da relação G/P e da concentração de MUN, consoante o número de ordenhas diárias.....	109
Anexo 22 - Médias, desvios padrões e medianas da concentração de BHB e da SCC, consoante o número de ordenhas diárias.	109
Anexo 23 – Médias, desvios padrões e medianas da produção de leite diária e da percentagem de lactose, consoante o mês do ano.....	110
Anexo 24 - Médias, desvios padrões e medianas da percentagem de gordura e proteína, consoante o mês do ano.	110
Anexo 25 – Médias, desvios padrões e medianas da relação G/P e da concentração de MUN, consoante o mês do ano.	110
Anexo 26 - Médias, desvios padrões e medianas da concentração de BHB e da SCC, consoante o mês do ano.	111
Anexo 27 - Coeficientes estimados do GLMM, ajustado com a concentração de BHB como variável dicotómica, respetivos desvios padrões, e valores p (teste de Wald) associados. Neste caso, à variável da produção de leite, foi aplicada a transformação inversa depois de uma mudança de escala.....	111
Anexo 28 – Coeficientes estimados do GLMM, ajustados com a concentração de MUN como variável dicotómica, respetivos desvios padrões, e valores P (teste de Wald) associados.	112
Anexo 29 - Razão de possibilidades de uma vaca, numa determinada fase de lactação, ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L, quando comparada com outra vaca na fase de referência (42 a 55 dias), tendo para primíparas como para múltíparas.	112
Anexo 30 - Razão de possibilidades de primípara ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L, quando comparada com uma múltípara, tendo em conta a fase de lactação e a SCC.	112
Anexo 31 - Razão de possibilidades de uma vaca com a SCC inferior a 200×10^3 células/mL ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L, quando comparada com outra vaca com a SCC superior a 200×10^3 células/mL, tendo em conta o número de lactação	113
Anexo 32 - Razão de possibilidades de uma vaca, numa determinada fase de lactação, ter uma concentração de MUN superior a 300mg/kg, quando comparada com outra da mesma lactação, mas que se encontra na fase de referência (42 a 55 dias).....	113
Anexo 33 –Razão de possibilidades de uma vaca de primeira lactação ter uma concentração de MUN superior a 300mg/kg, quando comparada com outra vaca de outra lactação, consoante a fase de lactação.	113

LISTA DE ABREVIATURAS

% - Percentagem

€ - Euros

> - Maior

< - Menor

↓ - Diminui

↑ - Aumenta

AA - Aminoácidos

ALIP - Associação Interprofissional do Leite e Lacticínios

ANABLE – Associação Nacional para o Melhoramento dos Bovinos Leiteiros

AGV – Ácidos Gordos Voláteis

BE - Balanço Energético

NEB – Negative Energy Balance (balanço energético negativo)

BHB – β -hidroxibutirato

BUN – Blood Urea Nitrogene (azoto ureico no sangue)

CV – Coeficiente de Variação

DGAV - Direção Geral de Alimentação e Veterinária

DEL – Dias em Lactação

dL – Decilitro

PD – Desvio Padrão

g – Grama

G/P – Relação entre a gordura e proteína

h - Horas

HC – Hidratos de Carbono

ICAR - Comité Internacional para o Controlo da Produtividade Animal

IMS – Ingestão de Matéria Seca

ISO – International Organization for Standardization (Organização Internacional de Normalização)

kg – Quilograma

L – Litro

Máx. – Máximo
mg – Miligramas
min. – Mínimo
mL – Mililitro
mmol – Milimol
MUN – Milk Urea Nitrogen (azoto ureico no leite)
NDF – Fibra Neutro Detergente
NEFA – Non Esterified Fatty Acids (ácidos gordos não esterificados)
NH₃ – Amoníaco
NNP – Nitrogénio Não-Proteico
Nº - Número
n.s. – Não Significativo
OR – *Odds Ratio*
PB – Proteína Bruta
PDR – Proteína Digestível no Rúmen
PNDR – Proteína Não Degradável no Rúmen
PS – Proteína Solúvel
SCC – Somatic Cells Count (contagem de células somáticas)
TMR – Total Mixed Ration (ração totalmente misturada)
UE – União Europeia
vs. – versus

1 INTRODUÇÃO

Em 2016, em Portugal, existiam 5 mil produtores de leite com 234 mil vacas, que produziam 1,867 milhões de litros de leite por ano. Este setor, a nível nacional, representava 712 milhões de euros na área da produção de leite, e 1,3 mil milhões de euros de volume de negócios na área da indústria de laticínios, garantindo um total de 50 mil postos de trabalho (Diogo, 2016).

Em 2015, as quotas leiteiras terminaram, o que, juntamente com o embargo da Federação Russa à União Europeia (UE), provocou uma descida acentuada do preço por litro de leite. Ao longo do ano de 2017, tem-se verificado um ligeiro aumento do preço pago aos produtores individuais em Portugal continental, dado que, em janeiro foi pago 0,288€/kg de leite (3,90% de gordura e 3,26% de proteína) e em agosto 0,309€/kg de leite (3,69% de gordura e 3,23% de proteína). Em agosto de 2017, o preço médio pago aos produtores na UE foi de 0,353€/kg de leite, este foi superior ao preço pago em Portugal continental (GPP, 2017). Relativamente à média produtiva, em 2016, em Portugal, os animais contrastados produziam em 305 dias de lactação, em média, 9497 kg de leite com 3,63% de gordura e 3,22% de proteína (ANABLE, 2016).

Para os produtores de leite serem competitivos, tanto a nível nacional, como internacional, as explorações têm de ser rentáveis e eficientes. A rendibilidade da exploração é influenciada de forma determinante: (1) pela quantidade e qualidade do leite produzido, uma vez que o preço pago ao produtor, e possíveis bonificações, são influenciadas pela sua composição, nomeadamente a percentagem de gordura, proteína e contagem de células somáticas (SCC); (2) pelo custo das matérias-primas consumidas (dieta alimentar), que corresponde a 67,3% do total das despesas; (3) pelo custo dos serviços externos, nomeadamente os serviços veterinários, a eletricidade, a água, os seguros e as rendas, que são responsáveis por 29,3% das despesas; (4) pelo custo dos ativos biológicos (aquisição de animais), que representa 1,8% das despesas da exploração (Rodrigues *et al.*, 2012; INE, 2016). Desta forma, a monitorização e interpretação dos dados produtivos e reprodutivos, da dieta alimentar, da saúde e do bem-estar dos animais são essenciais para a gestão das explorações, otimizando a sua eficiência e rentabilidade.

Um dos métodos que pode ser utilizado para monitorizar os dados produtivos, a dieta alimentar e a saúde dos animais, é a realização do contraste leiteiro, que consiste na avaliação da quantidade (produção de leite) e qualidade (concentração de lactose, gordura, proteína, azoto ureico (MUN), β -hidroxibutirato (BHB) e células somáticas) do leite produzido por uma fêmea, ao longo de sucessivas lactações (Portaria nº 1066/91 de 22 de outubro; ICAR, 2016). Este pode ser realizado de forma rotineira, uma vez que a recolha da amostra de leite é simples, fácil e não é invasiva (Arunvipas *et al.*, 2007; Fatehi *et al.*, 2012; Hristova *et al.*, 2014).

Os resultados obtidos através do contraste leiteiro são uma ferramenta de gestão técnico-económica das explorações, porque a análise da composição do leite e o conhecimento das relações entre os componentes, podem ser utilizadas para definir e identificar, de forma precoce, a presença de desequilíbrios nutricionais e possíveis problemas de saúde e bem-estar animal, nomeadamente de transtornos metabólicos e infecciosos em indivíduos e efetivos (Nielsen *et al.*, 2005; Márquez, 2006; Meyer *et al.*, 2006).

Particularmente, e de forma sucinta, a concentração de β -hidroxibutirato é considerada por alguns autores um bioindicador da diferença entre a energia que o animal necessita e a que ingere (balanço energético), desta forma, pode ser utilizada para identificar quais são as vacas e efetivos mais suscetíveis à ocorrência de balanço energético negativo (NEB), hipercetonémia, cetose subclínica e clínica (Leblanc *et al.*, 2010; Koeck *et al.*, 2014). A concentração de MUN também é considerada um bioindicador da composição da dieta alimentar, refletindo a eficiência da utilização do azoto pelo animal, e é indicativo da quantidade de azoto excretada para o meio ambiente (Doska *et al.*, 2012; Salamończyk & Guliński, 2015; Albaaj *et al.*, 2017b). Por sua vez, a existência de células somáticas no leite indica que há uma necessidade de haver células de defesa na glândula mamária e que a glândula está sob a ocorrência de uma infeção / inflamação (Queiroga, 2016). Por último, a relação gordura/proteína, que substitui a análise parcelar da percentagem de gordura e proteína, pode permitir a avaliação da quantidade e composição da dieta alimentar, indicando a possível ocorrência de transtornos metabólicos, como a acidose ruminal subaguda e a cetose (Zoche-Golob *et al.*, 2015; Albaaj *et al.*, 2017b).

Os resultados do contraste leiteiro também possibilitam que os produtores tenham conhecimento da média produtiva da sua exploração, do seu posicionamento em relação às explorações da região onde se inserem e do país (Salvador, 2014). Estes também são importantes para o setor leiteiro a nível nacional, uma vez que a realização do contraste permite a caracterização do efetivo nacional e a sua comparação com outros países (Pacheco, 2013).

Por fim, o contraste leiteiro é considerado a base para o melhoramento genético de bovinos leiteiros, porque permite a correta avaliação dos animais e, desta forma, existe uma escolha objetiva dos futuros reprodutores (Portaria nº 1066/91 de 22 de outubro; Almeida, 2012; Salvador, 2014; ICAR, 2016; Vaz, 2016).

Tendo em conta os pressupostos atrás mencionados, este trabalho tem como objetivo avaliar a variação dos parâmetros do leite medido em amostras provenientes do contraste (produção de leite, lactose, gordura, proteína, relação G/P, MUN, BHB e SCC), de acordo com os fatores não-nutricionais (exploração, fase da lactação, número de lactação, número de ordenhas e mês do ano em que é realizado o contraste), assim como a inter-relação entre os parâmetros.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONTRASTE LEITEIRO

O contraste leiteiro é regulado e regulamentado, a nível nacional, pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), através da Portaria nº 1066/91 de 22 de outubro, e a nível internacional pelo Comité Internacional para o Controlo da Produtividade Animal (ICAR).

O contraste leiteiro pode ser efetuado pelo método A, B e C. No método A, todos os registos são efetuados por um técnico especializado. No método B, todos os registos são efetuados pelo criador. No método C, os registos são efetuados tanto por um técnico especializado, como pelo criador. Existem diversos intervalos de tempo entre contrastes que podem ser aplicáveis, o intervalo de referência é 4 semanas (ICAR, 2016).

Em Portugal, o contraste é realizado por técnicos especializados denominados contrastadores (método A). O contraste pode ser realizado em todas as ordenhas diárias efetuadas na exploração (tipo A₄), sendo este o método de referência, ou apenas a uma ordenha num período de vinte e quatro horas (tipo AT₄). Quando se utiliza o tipo AT₄, existem duas metodologias possíveis: contrastar diferentes ordenhas, de forma alternada, em cada visita, ou contrastar sempre a mesma ordenha, a cada visita. Em cada exploração apenas se pode utilizar um dos métodos mencionados (Portaria nº 1066/91 de 22 de outubro; ICAR; 2016). As estimativas da produção leiteira obtidas através do tipo A₄ e AT₄ não apresentam diferenças significativas, desta forma pode-se considerar que ambos os tipos são eficazes (Almeida, 2012).

Os contrastadores deslocam-se às explorações conforme uma calendarização pré-definida. De acordo com as normas do ICAR (2016), o intervalo entre dois contrastes consecutivos deve-se situar entre os 22 e os 37 dias. Embora, em Portugal, de acordo com a Portaria nº 1066/91 de 22 de outubro, este não possa ser inferior a 26 dias, nem superior a 33. Em situações devidamente justificadas, este intervalo pode ser de 52 a 66 dias.

O primeiro contraste deve ser realizado entre o 5º e o 38º dia após o parto, caso haja uma razão devidamente justificada, este pode ser efetuado até ao 71º após o parto. Caso ocorra um aborto após 210 dias de gestação, ou após 240 dias de lactação, quando a data de fecundação não é conhecida, considera-se que a lactação tem início no dia do aborto (Portaria nº 1066/91 de 22 de outubro; ICAR, 2016).

De acordo com o ICAR (2016), considera-se uma vaca seca quando esta produz menos de 3 kg de leite por dia, ou menos de 1 kg de leite por ordenha, embora em Portugal, de acordo com a Portaria nº 1066/91 de 22 de outubro se considere que a vaca seca quando produz menos

de 2 kg de leite por dia. Para efeitos de cálculo da produção, considera-se que a lactação termina 14 dias após o último contraste.

Caso uma fêmea não seja contrastada em dois meses consecutivos é considerada seca, e caso tenha três ou mais contrastes em falta, o apuramento de resultados não se efetua. (Portaria n.º 1066/91 de 22 de outubro).

São considerados valores ausentes quando um animal se encontra doente, ou a ser submetido a um tratamento, quando a amostra de leite não é viável para análise, quando os valores obtidos estão fora do intervalo de valores aceitáveis, quando o contrastador está de férias, ou quando existe um acontecimento devidamente justificado para que os animais não sejam contrastados (ICAR, 2016).

A medição da produção de leite de cada vaca pode ser efetuada através de medidores de fluxo digital ou por medidores volumétricos (vaso graduado) (Figura 1). Quando os medidores de fluxo digital estão conectados a um computador e este registo é utilizado no contraste leiteiro, os ficheiros existentes devem conter a identificação da fêmea e a quantidade de leite produzido de todas as ordenhas realizadas num período de 24h (ICAR, 2016). A amostra representativa da produção de leite pode ser recolhida através de copos ou frasco de amostra (Figura 1). Nenhum equipamento pode afetar, de forma significativa, o procedimento normal de ordenha e a qualidade das amostras. Estes têm de ser aprovados pelo ICAR, tendo em conta as normas estabelecidas nas ISO 3918 / 5707 / 20966 (ICAR, 2016).

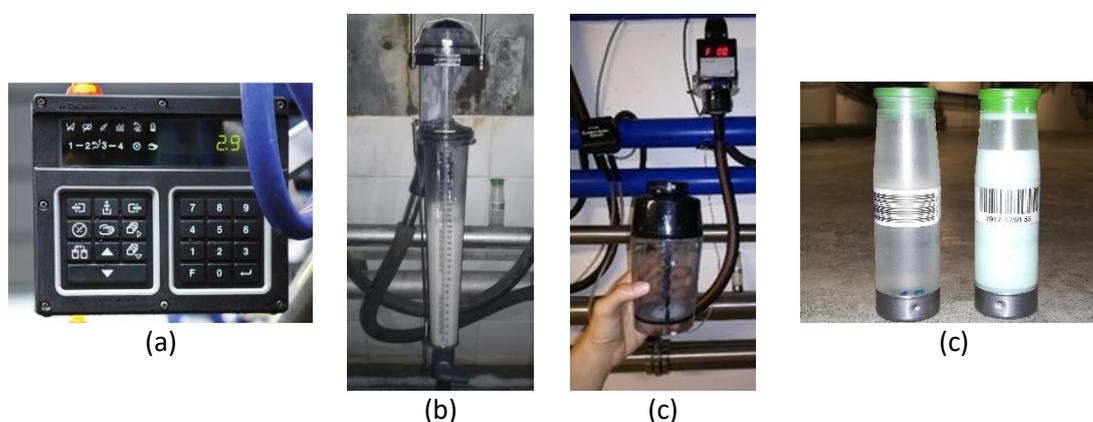


Figura 1 - Medidor de fluxo digital da produção de leite (a); Medidor volumétrico da produção de leite (b); Copo ou frasco de recolha da amostra (c) (Ruralbal, 2017).

Os equipamentos voluntários de ordenha (Figura 2) medem a produção de leite de cada animal, recolhem uma amostra representativa e podem realizar, ou não, a análise do leite, sem interferência ou supervisão humana. No caso de o equipamento não realizar a análise do leite, este deve armazenar as amostras de forma apropriada (ICAR, 2016).



Figura 2 - Equipamento voluntário de ordenha (DeLaval, 2017).

O volume mínimo de uma amostra é de 25 mL, que corresponde à produção de 2 kg de leite por ordenha. Caso uma amostra tenha uma quantidade de leite inferior, a realização da análise da mesma em laboratório pode ficar comprometida. Para preservar as amostras de leite pode utilizar-se conservantes que deverão ser previamente colocados no frasco, pelo laboratório (Portaria nº 1066/91 de 22 de outubro; ICAR, 2016).

Em Portugal, as análises oficiais são realizadas no laboratório da Associação Interprofissional do Leite e Lacticínios (ALIP). A análise dos constituintes do leite pode ser realizada por métodos laboratoriais, ou por equipamentos aprovados pelo ICAR (Anexo 1 e 2).

Os equipamentos dos laboratórios têm de estar corretamente instalados, calibrados e devem ser usados de forma apropriada. O ICAR criou um sistema de garantia de qualidade analítica (AQA), composto por fiscalizações internas e externas, que tem como objetivo harmonizar as práticas de análise entre os laboratórios das diversas organizações (ICAR, 2016).

2.2 PARÂMETROS AVALIADOS NO CONTRASTE LEITEIRO E FATORES DE VARIAÇÃO

Nesta parte do trabalho abordar-se-ão os parâmetros obtidos no contraste leiteiro, analisando as suas fontes de variação, as diversas estratégias de interpretação de resultados e a inter-relação entre eles.

Diversos autores dividem as fontes de variação em dois grupos: fatores nutricionais e não-nutricionais (Figura 3).

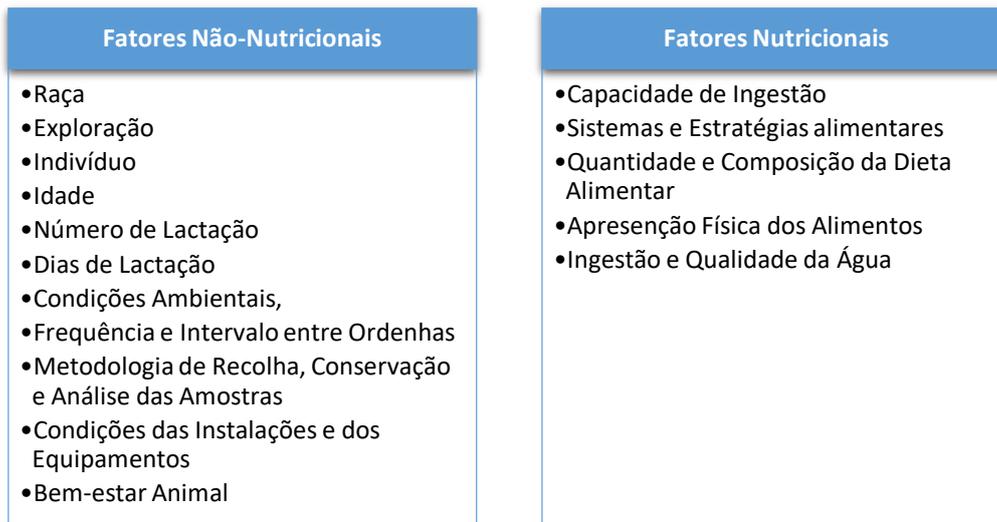


Figura 3 - Descrição dos fatores nutricionais e não-nutricionais.

Considerando a multiplicidade dos fatores enumerados, a revisão bibliográfica focar-se-á, principalmente, nas fontes de variação que podem ser analisadas através dos dados e nos objetivos do trabalho

2.2.1 Produção de Leite e Lactose

A Figura 4 descreve a variação da produção de leite (1a), da capacidade de ingestão da matéria seca (IMS) (1a), da energia necessária e ingerida (1b), do balanço energético (1b), da condição corporal (1c) e da fertilidade (1d) das vacas de leite ao longo da lactação.

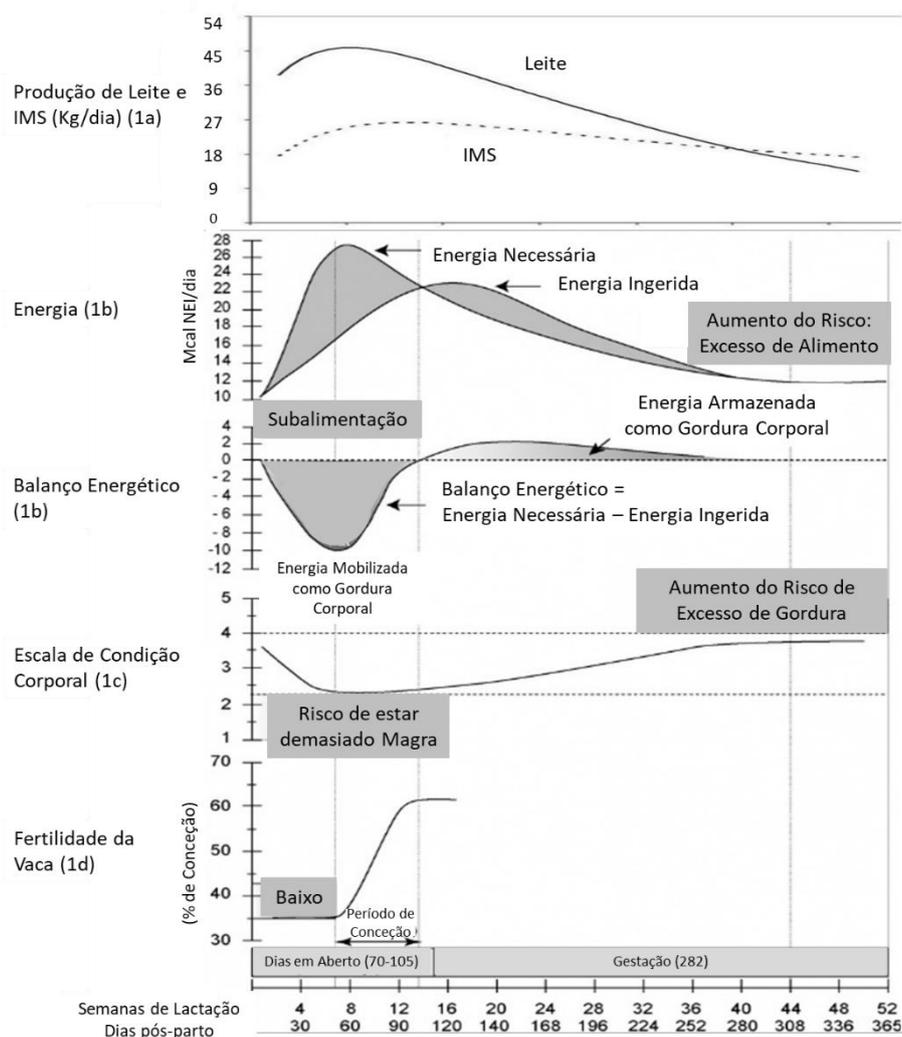


Figura 4 –Variação da produção de leite (1a), da IMS (1a), da energia necessária e ingerida (1b), do balanço energético (1b), da condição corporal (1c) e da fertilidade (1d) das vacas de leite ao longo da lactação (Wattiaux, 2011; Kellogg *et al.*, 1977 e NRC, 2001 citados por eXtension, 2012).

Tendo em conta a Figura 4 (1a), pode observar-se que a produção de leite e a IMS variam ao longo da lactação. Após o parto, a produção de leite e a IMS aumentam, até atingir o pico de produção e de ingestão, mantendo-se estáveis durante algumas semanas. O intervalo de tempo em que estes períodos ocorrem não é consensual entre os autores (Tabela 1), estas variações podem estar associadas ao diferente potencial genético dos animais.

Tabela 1 - Intervalo de tempo em que ocorre o pico de lactação e o pico de ingestão em vacas de leite

Pico de Produção (semana)	Pico de Ingestão (semana)	Referência Bibliográfica
4ª		Silvestre, 2003a
4ª	4ª – 8ª	Jorge, 2009
5ª- 8ª/9ª		Nunes, 2004
4ª – 8ª	10ª – 12ª	Castro <i>et al.</i> , 2009
6ª – 8ª		McAllister, s.d.a; Martinez, 2010
6ª – 14ª		Amaral-Philips, s.d.e.

A produção de leite no pico de produção é um bom indicador da produção total da lactação (McAllister, s.d.a; Nunes, 2004). Segundo Amaral-Philips (s.d.e.), por cada 0,45 kg de

leite produzido a mais no pico de lactação, a vaca pode produzir mais 90,7 a 113,4 kg de leite por lactação. De acordo com o mesmo autor, para que haja uma boa produção de leite ao longo da lactação, o pico de lactação deve ser persistente.

Após o pico da lactação inicia-se a fase descendente, diminuindo a produção de leite de forma progressiva (aproximadamente 2,5% por semana), até à interrupção da secreção láctea (Amaral-Philips, s.d.e.; Nunes, 2004). A duração da lactação considerada normal é de 305 dias seguida de um período seco de 60 dias (Bath *et al.*, 1982; citado por Silvestre *et al.*, 2003b; Nunes, 2004).

Uma vez que o pico da lactação é anterior ao pico de ingestão, as necessidades dos animais não conseguem ser colmatadas apenas pela ingestão do alimento. Consequentemente, ocorre um déficit energético que proporciona a ocorrência de balanço energético negativo (NEB) (Figura 4 (1b)). Durante o NEB, existem alterações adaptativas metabólicas, fisiológicas e endócrinas que provocam uma excessiva mobilização do tecido adiposo e o aumento da neoglucogénese para que se restabeleça o equilíbrio energético, originando a diminuição da condição corporal dos animais (Figura 4 (1c)) (Ospina *et al.*, 2010; McArt *et al.*, 2015; Vanholder *et al.*, 2015; Santaschi *et al.*, 2016; Viña *et al.*, 2016).

Este transtorno metabólico pode provocar diversas consequências, nomeadamente a diminuição do desempenho reprodutivo, devido à diminuição da taxa de concepção (Figura 4 (1d)), a ocorrência de cetose, acidose, infeções intra-mamárias, entre outros (Walsh *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2009; Ospina *et al.*, 2010a; Alvarenga, 2013; Marques, 2013; McArt *et al.*, 2013).

O número médio de dias de lactação pode ser considerado um indicador do manejo reprodutivo, uma vez que reflete o intervalo entre partos e a distribuição de partos ao longo do ano. De acordo Rodrigues *et al.*, (2012) e Bexiga, (2014) este indicador deve estar entre os 150 e os 175 dias e não ser superior a 180 dias.

De acordo com o comportamento fisiológico descrito na Figura 4, e as estratégias alimentares e reprodutivas das explorações, a lactação pode ser dividida em várias fases (3 a 6 fases). Na Tabela 2 apresentam-se algumas sugestões de divisão.

Tabela 2 - Divisão da lactação em fases consoante o comportamento fisiológico e as estratégias alimentares e reprodutivas.

Fases	Denominação	Especificação	Referência Bibliográfica
6	Pré-Parto	Entre os 21 e os 28 dias antes do parto. Ocorre um grande aumento das necessidades nutritivas devido à gestação.	The Dairy Nutrition Specialist, 2017
	Pós-Parto	Entre os 0 e os 30 dias de lactação. A produção de leite aumenta.	
	Início da Lactação	Entre os 31 e os 130 dias de lactação. Ocorre o pico da produção de leite.	
	Meio da Lactação	Entre os 131 e os 230 dias de lactação.	
	Final da Lactação	Entre os 231 dias de lactação até à interrupção da secreção lactea.	
	Período Seco	Entre a interrupção da secreção lactea e o parto.	
5	Início da Lactação	Entre os 0 e os 70 dias de lactação. Ocorre o pico da produção de leite.	Martinez, 2010
	Pico de IMS	Entre os 79 e os 140 dias de lactação. Ocorre o pico da IMS e a produção de leite começa a diminuir.	
	Meio e Final da Lactação	Entre os 140 e os 305 dias de lactação. A produção de leite diminui e aumentam as necessidades nutritivas devido à gestação	
	Período Seco	Entre os 60 e os 14 dias antes do parto.	
	Período de Transição	Entre os 14 e os 0 dias antes do parto.	
4	Período Seco	Entre os 60 e os 0 dias antes do parto.	Signoretta, 2010; Konjačić, 2013
	Início da Lactação	Entre os 0 e os 100 dias de lactação. Ocorre o pico da produção de leite	
	Meio da Lactação	Entre os 100 e os 200 dias de lactação. A produção de leite diminui e ocorre o pico da IMS.	
	Final da Lactação	Entre os 201 dias de lactação e a interrupção da secreção lactea.	
3	Início da Lactação	Entre os 14 e 100 dias de lactação. Ocorre o pico da produção de leite, o pico de IMS e o início da gestação.	McGill University, s.d.
	Meio da Lactação	Ocorre entre os 100 e 200 dias de lactação.	
	Final da Lactação	Entre os 200 dias de lactação e a interrupção da secreção lactea. A produção de leite e a IMS diminuem.	

Metodologicamente, quando o objetivo é especificamente avaliar a variação da produção e da composição de leite ao longo da lactação, existe uma distribuição aritméticas dos intervalos de amostragem, em 20 ou 30 dias (Hojman *et al.*, 2004; Jilek *et al.*, 2006; Dürr *et al.*, 2008; Doska *et al.*, 2012; Fatehi *et al.*, 2012; Kgole *et al.*, 2012; Haile-Mariam *et al.*, 2017).

A variação da produção de leite ao **longo da lactação** está associada à variação da produção de lactose, dado que é a sua concentração dentro das células epiteliais secretoras que determina o fluxo de água do exterior para o interior das células, através do mecanismo osmótico (Nunes, 2004; Dias, 2006; Alvarenga, 2013 Miglior *et al.*, 2006 citado por Haile-Mariam *et al.*, 2017).

Dias (2006) e Henao-Velásquez (2014) verificaram que a quantidade de lactose atinge o seu máximo no início da lactação e, posteriormente diminuiu até ao final da mesma, havendo

uma diminuição mais acentuada no final. Esta variação foi idêntica para diferentes produções de leite. Miglior *et al.*, (2006) constataram que a maior percentagem de lactose ocorre entre a 4ª e 8ª semana de lactação e que após o pico de concentração, esta também diminui até ao final da lactação.

Analisando a variação da produção de leite consoante o **número de lactação**, pode constatar-se que a terceira lactação é a que apresenta maior produção (Silvestre *et al.*, 2005; Hojman *et al.*, 2004 e Yazgan *et al.*, 2010 citado por Bendelja *et al.*, 2011). Segundo Silvestre *et al.*, (2005), as primíparas são as que apresentam menores produções, tendo em conta as primeiras cinco lactações. Amaral-Philips (s.d.e.) e Weller *et al.*, (2016) constataram que a primeira lactação apresenta uma menor produção do que a segunda. Contrariamente, Bendelja *et al.*, (2011) indicam que quando o número de lactação aumenta, a produção de leite diminui, dado que os animais de primeira e segunda lactação produzem uma maior quantidade de leite do que os de quarta e quinta lactação.

Relacionando a produção de leite no pico de lactação e o número de lactação em que a vaca se encontra, McAllister (s.d.a) verificou que as vacas de segunda lactação devem produzir mais 5,4 a 9,1kg de leite no pico de lactação, do que as vacas de primeira lactação. As vacas de terceira lactação, ou superiores, devem produzir 2,3kg de leite a mais no pico, do que as vacas de segunda lactação. As primíparas são os animais menos produtivos na fase inicial da lactação e no pico, apresentando o pico mais tardio e mais persistente, mas após os 200 dias de lactação estes animais são os que apresentam maiores produções (Silvestre *et al.*, 2003a). Quando as primíparas não produzem a quantidade de leite esperada, pode indicar que a recria não está a ser correta, e/ou se estes animais estiverem no mesmo parque que as múltíparas, pode significar que as primíparas não conseguem competir pelo alimento (Amaral-Philips, s.d.a).

Em relação à percentagem de lactose, Bendelja *et al.*, (2011) e Henao-Velásquez (2014) verificaram que não existem diferenças significativas na variação da lactose consoante o número de lactação. Contrariamente, Miglior *et al.*, (2006) referem que a percentagem de lactose diminui com o aumento do número de lactação.

Diversos autores indicam que a produção de leite é influenciada pela **frequência de ordenhas**. No estudo realizado por Silvestre *et al.*, (2004) e Quist *et al.*, (2008), nas explorações que praticam duas ordenhas diárias, as produções de leite das ordenhas da manhã são maiores do que as das ordenhas de tarde, esta diferença, significativa, constatou-se em todas as lactações. Este facto é suportado pelo intervalo entre as ordenhas, uma vez que a produção de leite está dependente da secreção látea e da pressão no úbere, estas variáveis aumentam de forma inversa ao longo do tempo (Silvestre *et al.*, 2004). Para que o aumento da pressão dentro do úbere não influencie a secreção do leite, as ordenhas devem ter um intervalo de 12h, quando

o intervalo diurno é menor que o intervalo noturno, é expectável que ocorram diferenças na produção de leite (Webster 1987 citado por Silvestre *et al.*, 2005). De acordo com Schmid & Van Vleck (1974) citados por Silvestre *et al.*, (2005), as primíparas são mais afetadas com o aumento do intervalo entre as ordenhas do que as múltíparas, porque ainda estão em crescimento e têm o úbere mais pequeno.

Nas explorações que praticam três ordenhas diárias, a menor produção de leite foi obtida na ordenha da manhã, aumentando ao longo das ordenhas, logo a maior produção ocorreu na ordenha da noite (Quist *et al.*, 2008). De acordo com Nunes, 2004, a frequência de ordenha também proporciona o aumento da quantidade de leite produzido (Tabela 3).

Tabela 3 -Variação da produção de leite consoante o número de ordenhas realizadas (Adaptado de Nunes, 2004).

Nº de Ordenhas	Produção de Leite (kg/dia)
1x	9,4
2x	15,6
Diferença (2x/1x)	6,2
2x	19,5
3x	23,0
Diferença (3x/2x)	3,5
3x	24,8
4x	19,3
Diferença (4x/2x)	4,9

A produção de leite e lactose também apresenta **variações sazonais** porque ao longo do ano existem alterações das estratégias alimentares e climáticas (Quist *et al.*, 2008).

Na Tabela 4 estão descritos quais os meses do ano em que a produção de leite é maior.

Tabela 4 – Variação da produção de leite consoante o mês e a época do ano.

Mês / Estação do Ano	Produção de Leite (kg/dia)	Pais do Autores	Referência Bibliográfica
Março - Julho	>	Portugal	Silvestre <i>et al.</i> , 2004
Verão	>*	Canadá	Quist <i>et al.</i> , 2008
Inverno	>**	Canadá	
Outono - Inverno	>	Croácia	Bendelja <i>et al.</i> , 2011

*em efetivos com 2 ordenhas/dia; ** em efetivos com 3 ordenhas/dia

De acordo com Miglior *et al.*, (2006), a lactose apresenta valores mais baixos nos meses em que a temperatura é mais elevada. Contrariamente, Henao-Velásquez, (2014) indica que a lactose apresenta valores mais baixos entre abril e junho (Colômbia). Por outro lado, Bendelja *et al.*, (2011) não encontraram diferenças significativas entre a percentagem de lactose obtida nos meses mais quentes e nos meses mais frios.

A **quantidade e composição da dieta alimentar** influencia a produção de leite, nomeadamente a relação concentrado/fornagem e a quantidade de proteína fornecida ao animal. A relação concentrado/fornagem influencia a produção ruminal de ácidos gordos voláteis (AGV), verificando-se uma maior produção de ácido propiónico e láctico quando se aumenta a quantidade de concentrado e, por conseguinte, uma maior produção de leite

(Kauffman *et al.*, 2001; Nunes, 2004; Walker, 2004 e Pfeffer *et al.*, 2005 citados por Márquez, 2006; Guliński *et al.*, 2016; Palmquist *et al.*, 1993 citado por Moreira, 2015; Albaaj *et al.*, 2017b).

O aumento da proteína bruta, até uma determinada concentração, 19% (Frank *et al.*, 2002) e 15% (Pimentel, 2011) proporciona o aumento da produção de leite. Mas, a eficiência da utilização da proteína diminui quando quantidade de proteína fornecida é superior às necessidades do animal (Miranda, 2014). O aumento da suplementação de nitrogénio não proteico (NNP), proteína solúvel (PS) e proteína degradável no rúmen (PDR), sem o aumento equilibrado da energia fermentável, não contribui, de forma favorável, para o aumento da produção de leite (Márquez, 2006). Contrariamente, Burgos *et al.*, (2007) salientam que a quantidade de proteína bruta na dieta não influencia a produção de leite.

Segundo ICAR (2016), a produção de leite diária por vaca pode variar entre os 0 e 99kg (ICAR, 2016). Na Tabela 5 encontram-se as percentagens de lactose consideradas normais para o leite de vaca.

Tabela 5 - Percentagem de lactose considerada normal para vacas de leite.

Lactose (%)	Referência Bibliográfica
4,68	Webb <i>et al.</i> , 1974 citado por Tavares, 2015
4,87	Carvalho, 2012 citado por Moreira, 2014
5	Haile-Mariam <i>et al.</i> , 2017

Por último, fazendo um pequeno apontamento sobre a estrutura do efetivo, de acordo com Consultpec (2012) e Bexiga (2014) as primíparas devem corresponder a 33% do efetivo e não devem existir mais de 10% de animais com cinco ou mais lactações. Apenas é aceitável que a percentagem de primíparas seja superior a 33% quando a exploração está a aumentar o efetivo, senão este índice indica que existe uma grande taxa de refugo dos animais. Caso uma exploração tenha mais de 10% de animais com mais de cinco lactações, e estes tenham bons níveis produtivos, revela que os animais têm uma elevada longevidade ou uma pequena taxa de substituição.

2.2.2 Gordura

A gordura do leite pode ter duas origens fisiológicas: ser formada a partir dos ácidos gordos voláteis (AGV) provenientes da digestão ruminal denominando-se “síntese de novo”; ter origem nos ácidos gordos, ácidos gordos não esterificados (NEFA) e triglicéridos presentes no sangue, provenientes da mobilização dos adipócitos corporais (Nunes, 2004; Barber *et al.*, 1997 citado por Duarte, 2010; Bernard *et al.*, 2008 citados por Shingfield *et al.*, 2012).

A “síntese de novo” é responsável por 40 a 50% da gordura do leite, os seus principais precursores são o ácido acético e β -hidroxibutirato, sintetizando-se ácidos gordos de cadeia curta e média (C4:0 ao C16:0) (Nunes, 2004; Dias, 2006; Barbar *et al.*, 1997 citado por Duarte,

2010). Os ácidos gordos de cadeia longa e alguns de cadeia média (C12:0 a C18:0), são sintetizados a partir dos ácidos gordos presentes no sangue (Duarte, 2010; Shingfield *et al.*, 2012). Pode então concluir-se que os ácidos gordos de cadeia média podem ter origem nas duas vias (Figura 5).

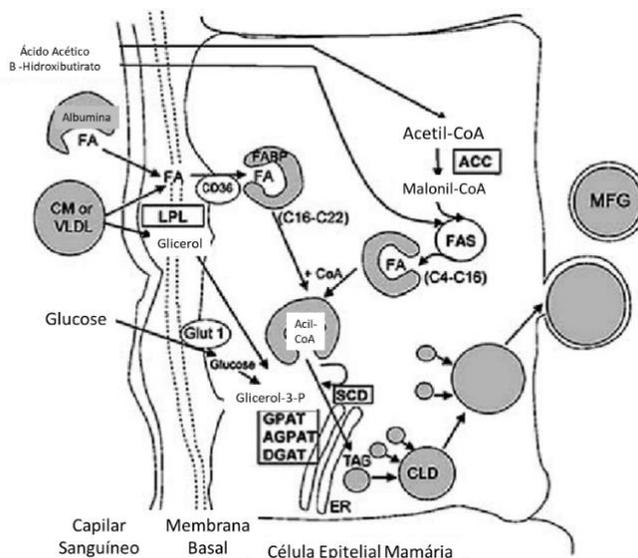


Figura 5 - Síntese das moléculas de gordura do leite nas células epiteliais da glândula mamária de bovino (Adaptado de Shingfield *et al.*, 2012).

(ACC - Acetil-CoA Carboxilase; AGPAT - 1-acilglicerol 3-fosfato aciltransferase; CD36 - Cluster de diferenciação 36; CLD - Gotas de lípido citoplasmático; CoA - Coenzima A; CM - Chilomicron; DGAT - Diacilglicerol aciltransferase 1; ER - Reticulo endoplasmático; FA - Ácido-gordo; FAP - Proteína de ligação de ácidos-gordos; FAS - Sintetase de ácido-gordo; Glut 1 - Transportador de glucose 1; GPAT - glicerol-3-fosfato aciltransferase; LPL - Lipoproteína lípase; MFG - Glóbulo de gordura do leite; SCD - Estearoil-CoA dessaturase; TAG - Triglicérido; VLDL - Lipoproteína de baixa densidade)

A síntese de gordura na glândula mamária pode aumentar devido à ocorrência de NEB e cetose, uma vez que estes transtornos originam o aumento da mobilização da gordura corporal. A ocorrência de fígado gordo também pode proporcionar o aumento deste parâmetro. Por outro lado, a síntese de gordura do leite pode diminuir devido à carência de precursores e à ocorrência de acidose. Diferentes fatores de diluição originam diferentes percentagens de gordura para a mesma quantidade de gordura sintetizada (Nunes, 2004; Buttchereit *et al.*, 2010; Toni *et al.*, 2011; Denis-Robichaud *et al.*, 2014; Zoche-Golob *et al.*, 2015).

A síntese de gordura diminui ao **longo da lactação** (Silvestre *et al.*, 2003a; Nunes 2004; Burgos *et al.*, 2007; Weller, 2016). Relativamente à percentagem de gordura, de acordo com Silvestre *et al.*, (2003a) e Weller *et al.*, (2016), esta é mais baixa no início da lactação e aumenta, de forma progressiva, até ao final, apresentando os menores valores entre o 50 e o 65/100 DEL. Os baixos valores deste parâmetro no início da lactação são devidos ao fator de diluição (Nunes, 2004). Segundo Amaral-Philips (s.d.e) e Nordlund & Cook (2004) citados por Castro *et al.*, (2009), apenas 10% das vacas devem ter uma percentagem de gordura igual ou superior a 4,5 ou 5,5%, até aos 50 ou 60 DEL, respetivamente.

Relativamente ao efeito do **número de lactação**, Silvestre *et al.*, (2003a) verificaram que a terceira lactação é a que apresenta maior síntese de gordura e a primeira lactação a menor. No início da lactação, a primeira lactação, é a que apresenta menor síntese, mas após os 200 dias, esta é a que apresenta a maior síntese de gordura.

Segundo Buttchereit *et al.*, (2010), a percentagem de gordura aumenta com o aumento do número de lactações. Bendelja *et al.*, (2011), declararam que a percentagem de gordura aumenta após a segunda lactação, mas as diferenças não são significativas. Contrariamente, Hojman *et al.*, (2004), Miglior *et al.*, (2006) constataram que a percentagem de gordura diminui com o aumento do número de lactações, mas as diferenças entre lactações também foram pequenas.

A síntese de gordura do leite também é influenciada pela **frequência de ordenhas** realizadas na exploração. De acordo com Nunes (2004), e como se pode observar na Tabela 6, a percentagem gordura diminui com o aumento da frequência de ordenha. Em explorações com 2 e 3 ordenhas diárias, a percentagem de gordura é maior na ordenha da noite (Quist *et al.*, 2008; Bendelja *et al.*, 2011).

Tabela 6 – Variação da percentagem de gordura consoante o número de ordenhas realizadas (Adaptado de Nunes, 2004).

Nº de Ordenhas	Gordura (%)
1x	4,29
2x	4,18
Diferença (2x/1x)	-0,1
2x	3,65
3x	3,51
Diferença (3x/2x)	-0,14
3x	4,71
4x	4,53
Diferença (4x/2x)	-0,18

De acordo com Palmquist (2006) citado por Moreira (2015), a síntese de gordura varia **ao longo do ano** devido às alterações da dieta alimentar e da temperatura (Tabela 7). Segundo Amaral-Philips, (s.d.e), o stress térmico provoca a diminuição da síntese de gordura.

Tabela 7 – Variação da percentagem de gordura consoante a época do ano.

Estação do Ano	Gordura (%)	País do Estudo	Referência Bibliográfica
Verão	<	Canadá	Ng-Kwai-Hang <i>et al.</i> , 1984 e Sargeant <i>et al.</i> , 1998 citados por Quist <i>et al.</i> , 2008
Inverno	>		
Verão	<	Canadá	Quist <i>et al.</i> , 2008
Inverno	>		
Primavera e Verão	<	Croácia	Bandelja <i>et al.</i> , 2011
Verão	<		Palmquist, 2006 citado por Moreira, 2015

A síntese de gordura do leite varia de acordo com a **quantidade e composição da dieta alimentar**, esta variação está explicada, de forma sucinta, na Figura 6.

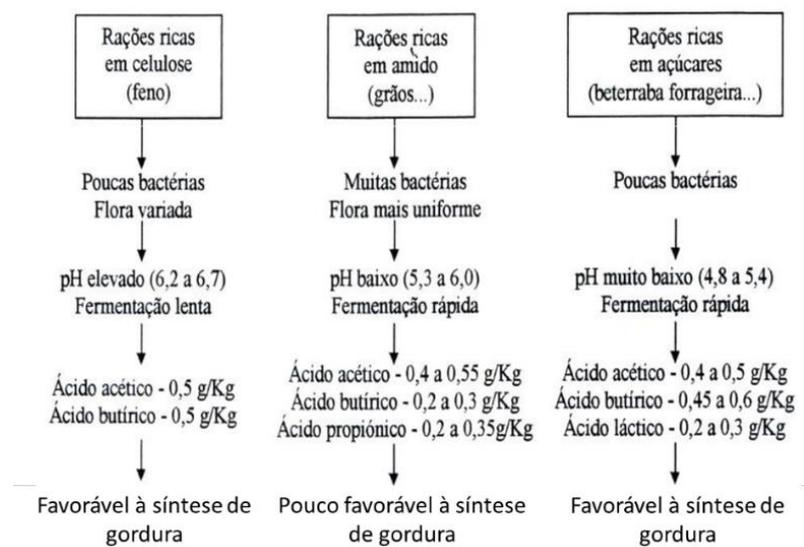


Figura 6 - Influência da composição da dieta alimentar na síntese de gordura na glândula mamária (Adaptado de Dias, 2006).

Tendo em conta a Figura 6, pode constatar-se que as dietas ricas em celulose e em açúcares favorecem a síntese de gordura. Pelo contrário, as dietas ricas em amido são pouco favoráveis à sua síntese. Desta forma, a relação concentrado/forragem fornecida ao animal influencia a síntese de gordura. (Amaral-Philips s.d.b; Nunes 2004; Palmiste *et al.*, 1993 e Looper *et al.*, 2001 citado por Moreira, 2015).

Os **sistemas e as estratégias alimentares** praticados na exploração também influenciam a síntese de gordura do leite. O aumento da frequência de distribuição de alimento origina um aumento da síntese de gordura, pois evita alterações bruscas da fermentação ruminal (Sutton *et al.*, 1985 citado por Quist *et al.*, 2008).

Tendo em conta os fatores previamente mencionados, vários autores utilizam este parâmetro como ferramenta de monitorização individual e do efetivo leiteiro, tanto para avaliar as estratégias utilizadas na exploração, como para detetar de forma precoce transtornos metabólicos e nutricionais, nomeadamente NEB, cetose, fígado gordo e acidose. Desta forma, os vários autores distinguem limites a partir dos quais consideram que a percentagem de gordura é baixa, normal ou alta (Tabela 8).

Tabela 8 - Divisão da percentagem de gordura do leite a partir do qual se considera que o valor é baixo, normal ou alto.

Níveis	Gordura (%)	Referência Bibliográfica
Valor Baixo	< 3	Looper <i>et al.</i> , 2001 citado por Moreira, 2015
	< 3,2	Amaral-Philips, s.d.b.
Valor Normal	3,2 – 3,6	Jankowska <i>et al.</i> , 2010
	3,5 – 8,5	Nunes, 2004
	4	Jekins & McGuire, 2006 citados por Moreira, 2015
Valor Alto	> 4,2	Denis-Robichaud <i>et al.</i> , 2014
	> 4,5	Amaral-Philips, s.d.e.
	> 5,49	Čejna & Chládek <i>et al.</i> , 2005
	> 5,5	Castro <i>et al.</i> , 2009

A percentagem de gordura no leite sofre facilmente variações, sendo aceitável haver alterações de três unidades percentuais (Dias, 2006; Looper *et al.*, 2001 citado por Moreira, 2015). De acordo com Amaral-Philips (s.d.e), a percentagem de gordura do leite, de cada animal, deve ter um valor de $\pm 0,3\%$ em relação à média do efetivo.

Segundo Amaral-Philips (s.d.e) e Nordlund & Cook (2004) citados por Castro *et al.*, (2009), a existência de elevadas percentagens de gordura pode indicar a ocorrência da mobilização de reservas corporais, já as baixas percentagem estão associadas a acidoses ruminais.

2.2.3 Proteína

As proteínas presentes no leite podem ser classificadas em dois grupos: as caseínas, que são proteínas insolúveis, e as proteínas de soro, que são proteínas solúveis (DePeters & Cant, 1990, Luquet, 1990 e Swaisgood *et al.*, 2004 citados por Dias, 2006; Pimentel, 2011).

As caseínas e algumas proteínas do soro, como as β -lactoglobulinas, α -lactoalbuminas e as lactoferrinas, são totalmente sintetizadas na glândula mamária, nomeadamente no retículo endoplasmático rugoso das células secretoras, utilizando os aminoácidos (AA) disponíveis. As restantes proteínas do soro, como as imunoglobulinas e as soroalbuminas, estão presentes no sangue, passando para a glândula mamária e conseqüentemente são incorporadas no leite. A transferência dos AA e de algumas proteínas do sangue para a glândula mamária depende da sua concentração no sangue e do fluxo que chega à glândula mamária (Nunes, 2004; DePeters & Cant, 1990, Correia & Correia, 1985 e Walter *et al.*, 2004 citado por Dias, 2006; Pimentel, 2011).

Caso o animal esteja sob a ocorrência de NEB, a síntese de proteína do leite diminui, já que o aumento de ácidos gordos no sangue diminui a libertação de somatotrofina, logo diminui a absorção de AA pela glândula mamária (Enjalbert, 2006 citado por Castro *et al.*, 2009; Huttman, 2007 citado por Buttchereit *et al.*, 2010).

A síntese de proteína do leite diminui ao **longo da lactação** (Silvestre *et al.*, (2003a), Burgos (2007) e Weller *et al.*, (2016)). Por outro lado, a percentagem de proteína diminui durante a primeira semana de lactação, mas após o primeiro mês e até ao final da lactação este componente aumenta (Dias, 2006). Segundo Silvestre *et al.*, (2003a), este parâmetro atinge os menores valores ($\approx 2,9\%$) entre o 40 e 57 DEL, estando de acordo com a figura apresentada por Weller *et al.*, (2016), que demonstra que a menor percentagem ($\approx 3,2$) ocorre entre o 30 e 50 DEL, sensivelmente. As variações da percentagem de proteína são menores do que a percentagem de gordura (Silvestre *et al.*, 2003a; Dias, 2006; Weller *et al.*, 2016).

Com o aumento do **número de lactações** a síntese de proteína tende a diminuir (Silvestre *et al.*, 2003a; Miglior *et al.*, 2006). A primeira lactação é a que apresenta menor síntese de proteína na fase inicial, mas é a lactação que contém maior síntese de proteína no final da lactação (Silvestre *et al.*, 2003a).

Bendelja *et al.*, (2011), constataram que a percentagem de proteína aumenta consoante o número de lactações e que as diferenças são significativas. Por outro lado, Hojman *et al.*, (2004) indicam que a variação da percentagem de proteína é pequena.

A **frequência e o intervalo entre ordenhas** também influenciam a síntese de proteína. A diferença entre a percentagem de proteína da ordenha de manhã e da noite é pequena, mas esta tende a ser maior na ordenha da noite em 0,09%, em efetivos com 2 ordenhas diárias e com 12h de intervalo entre ordenhas. Em efetivos com 3 ordenhas diárias a percentagem de proteína no leite atinge o seu pico na ordenha da noite. A variação da percentagem de proteína entre ordenhas é menor do que a variação da percentagem de gordura (Quist *et al.*, 2008). Nunes (2004), enuncia que a percentagem de proteína diminui com o aumento da frequência de ordenhas, devido ao factor diluição (Tabela 9).

Tabela 9 - Variação da percentagem de proteína consoante o número de ordenhas realizadas (Adaptado de Nunes, 2004).

Nº de Ordenhas	Proteína (%)
1x	3,64
2x	3,56
Diferença (2x/1x)	-0,08
2x	3,10
3x	3,05
Diferença (3x/2x)	-0,06
3x	3,49
4x	3,44
Diferença (4x/2x)	-0,04

A síntese de proteína varia **ao longo do ano**, sendo menor nos meses de temperatura mais elevada (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1984 e Sargent *et al.*, 1998 citados por Quist *et al.*, 2008; Quist *et al.*, 2008; Bendelja *et al.*, 2011). Mas, Quist *et al.*, (2008) apenas obtiveram diferenças significativas na primeira lactação.

Relativamente à influência da **quantidade e composição da dieta alimentar** na síntese da proteína do leite, Doyle *et al.*, (2003) citado por Dias, (2006), asseguram que esta influência é de 0,6%, mais especificamente, Jenkins & McGuire (2006) citados por Moreira (2015), indicam que o aumento de 1% da proteína da dieta proporciona um aumento de 0,02% de proteína do leite. Contrariamente, Burgos *et al.*, (2007), referem que a quantidade da proteína da dieta não influencia a quantidade de proteína no leite.

De forma sucinta, a proteína do leite apresenta uma relação positiva com a quantidade de energia ingerida, mas esta relação também está dependente da suplementação proteica

efetuada. Quando o alimento fornecido apresenta níveis de proteína bruta superiores ao recomendado a resposta da proteína do leite, relativamente à suplementação proteica, é praticamente nula (Nunes, 2004; Pfeffer *et al.*, 2005 citado por Márquez, 2006; Pimentel, 2011; Roseler *et al.*, 1993 citado por Miranda, 2014; Palmquist *et al.*, 1993 citado por Moreira, 2015):

Pelo contrário, Hoffman *et al.*, (1991) citado por Dias (2006), indicam que a síntese de proteína do leite apenas é regulada por mecanismos hormonais, e que apenas está dependente dos AA presentes na glândula mamária, logo não é influenciada pela composição da dieta alimentar.

Na Tabela 10 encontram-se as percentagens de proteína consideradas normais e baixas para as vacas leiteiras. Todos os animais do efetivo devem ter este parâmetro a $\pm 0,2\%$ da média do efetivo (Amaral-Philips, s.d.e).

Tabela 10 - Divisão da percentagem de proteína do leite a partir do qual se considera que o valor é baixo ou normal.

Níveis	Proteína (%)	Referência Bibliográfica
Valor Baixo	< 3,0	Looper <i>et al.</i> , 2001 citado por Moreira, 2015
Valor Normal	3,2	Márquez, 2006
	3,2 – 3,6	Osten-Sacken, 1999 citado por Salamończyk & Guliński, 2015

2.2.4 Relação Gordura / Proteína (G/P)

A relação entre a percentagem de gordura e proteína tem sido utilizada por vários autores como bioindicador de diagnóstico de transtornos metabólicos e de avaliação da dieta alimentar, substituindo a análise parcelar da percentagem de gordura e proteína num efetivo leiteiro ou um indivíduo (Amaral-Philips, s.d.b; Geishauser, 1998 citados por Buttchereit *et al.*, 2010; Van Knegsel *et al.*, 2010; Zoche-Golob *et al.*, 2015; Albaaj *et al.*, 2017b).

Segundo Amaral-Philips (s.d.b), a relação G/P não deve ser utilizada como bioindicador para detetar vacas a nível individual, uma vez que existe uma elevada possibilidade de fazer um diagnóstico errado. Por outro lado, Richardt (2004) citado por Čejna & Chládek (2005), enuncia que a relação G/P apenas deve ser monitorizada em amostras individuais.

Esta relação pode ser um indicador do desempenho produtivo porque reflete o balanço energético do animal (Tabela 11), logo pode ser utilizado como um critério para diferenciar as vacas que conseguem, ou não, adaptar-se à mudança metabólica que ocorre no início da lactação (Richardt, 2004 citado por Čejna & Chládek, 2005; Buttchereit *et al.*, 2010; Toni *et al.*, 2011; Zoche-Golob *et al.*, 2015).

Tabela 11 - Associação entre a relação G/P e o balanço energético (BE).

Associação entre Relação G/P e BE	Fase de Lactação (dias)	Referência Bibliográfica
-0,36 ; -0,74		Grieve <i>et al.</i> , 1986 citado por Buttchereit <i>et al.</i> , 2010
0,5	Até 77	Reist <i>et al.</i> , 2002 citado por Buttchereit <i>et al.</i> , 2010
-0,43	15	Buttchereit <i>et al.</i> , 2010
-0,42	35	
-0,28	55	
Fraca	Após 75	
Moderada	14 – 105	Vries & Veerkamp 2000 citados por Buttchereit <i>et al.</i> , 2010

De acordo com a Tabela 11, a G/P e o balanço energético apresentam uma relação negativa mais forte no início da lactação, isto ocorre porque nesta fase o NEB é mais intenso, logo a mobilização das reservas corporais é maior (Haas & Hofírek, 2004 citados por Čejna & Chládek, 2005; Buttchereit *et al.*, 2010; Zoche-Golob *et al.*, 2015).

Segundo Buttchereit *et al.*, (2010), este parâmetro é mais fiável para a deteção de vacas em NEB, do que a concentração de corpos cetónicos dos fluidos corporais ou a condição corporal (CC) dos animais. Contrariamente, Enemark (2008) e Kroghetal (2011) citados por Zoche-Golob *et al.*, (2015) constataram que a relação G/P não é um indicador preciso para o diagnóstico de NEB.

Ao longo da lactação, a relação G/P diminui, mas tem um ligeiro aumento após os 170 dias de lactação (Cejna & Chládek, 2005; Buttchereit *et al.*, 2010).

Na Tabela 12 estão descritos os valores a partir dos quais, o valor de G/P é considerado baixo, normal ou alto.

Tabela 12 - Divisão da relação G/P a partir do qual se considera que o valor é baixo, normal ou alto.

Níveis	Relação G/P	Referência Bibliográfica
Valor Baixo	< 1,0	Zoche-Golob <i>et al.</i> , 2015
	< 1,1	Čejna & Chládek, 2005
	< 1,2	Toni <i>et al.</i> , 2011
Valor Normal	1,0 - 1,5	Zoche-Golob <i>et al.</i> , 2015
	1,05 - 1,18	Čejna & Chládek, 2005
	1,2 – 1,25	Stokes <i>et al.</i> , 2000 citado por Moreira, 2015
	1,2 - 1,4	Toni <i>et al.</i> , 2011
Valor Alto	> 1,3	Denis-Robichaud <i>et al.</i> , 2014
	>1,4	Amaral-Philips, s.d.b; Čejna & Chládek, 2005
		Geishauser, 1998 e Heuer <i>et al.</i> , 1999 citados por Buttchereit <i>et al.</i> , 2010;
	> 1,5	Knegsel <i>et al.</i> , 2010; Marcos, 2014; Zoche-Golob <i>et al.</i> , 2015; Albaaj <i>et al.</i> , 2017b
	>2,0	Toni <i>et al.</i> , 2011

A relação G/P é mais referenciada pelos autores como indicativo da ocorrência de transtornos metabólicos e infecciosos e da menor capacidade produtiva dos animais, do que a interpretação dos parâmetros de forma isolada (Tabela 13).

Tabela 13 - Associação entre a relação G/P e a ocorrência de transtornos metabólicos e/ou infecciosos.

Nível da Relação G/P	Transtorno Metabólico / Infeccioso	Referência Bibliográfica
Alto	Cetose	Amaral-Philips, s.d.b; Haas & Hofírek, 2004 e Ritchardt, 2004 citados por Čejna & Chládek, 2005; Geishauser, 1998 citados por Buttchereit <i>et al.</i> , 2010; Knegsel <i>et al.</i> , 2010; Heuer <i>et al.</i> , 1999 citados por Toni <i>et al.</i> , 2011; Marcos, 2014; Denis-Robichaud <i>et al.</i> , 2014; Albaaj <i>et al.</i> , 2017b
	Deslocamento do Abomaso	Geishauser, 1998 e Heuer <i>et al.</i> , 1999 citados por Buttchereit <i>et al.</i> , 2010; Toni <i>et al.</i> , 2011
	Quistos nos Ovários	Geishauser, 1998 e Heuer <i>et al.</i> , 1999 citados por Buttchereit <i>et al.</i> , 2010;
	Retenção Placentária Metrites e Endometrites clínicas	Toni <i>et al.</i> , 2011
	Infeções Intra-mamárias	Čejna & Chládek, 2005; Geishauser, 1998 e Heuer <i>et al.</i> , 1999 citados por Buttchereit <i>et al.</i> , 2010; Zoche-Golob <i>et al.</i> , 2015
	Laminites	Čejna & Chládek, 2005; Geishauser, 1998 e Heuer <i>et al.</i> , 1999 citados por Buttchereit <i>et al.</i> , 2010;
	Depressão da Proteína do Leite	Looper <i>et al.</i> , 2001 citado por Moreira, 2015
	Diminuição da Produção de Leite Aumento Taxa de Refugo	Toni <i>et al.</i> , 2011
Baixo	Acidose Ruminal Subaguda	Amaral-Philips s.d.e; Ritchard, 2004 citado por Čejna & Chládek, 2005; Toni <i>et al.</i> , 2011; Zoche-Golob <i>et al.</i> , 2015; Moreira, 2015
	Diminuição do Desempenho Reprodutivo	Čejna & Chládek, 2005
	Depressão da Gordura do leite	Looper <i>et al.</i> , 2001 citado por Moreira, 2015
	Diminuição da Produção de Leite	Toni <i>et al.</i> , 2011

De acordo com Castro *et al.*, (2009), pode considerar-se que o efetivo está sob a ocorrência de cetose subclínica, quando mais de 40% das vacas apresentam uma relação G/P superior a 1,33 no primeiro contraste realizado após o parto.

Quando a relação G/P é superior a 1,5 promove uma menor resposta do sistema imunitários, o que origina maior quantidade de infeções intra-mamárias ao longo da lactação, enquanto que se a G/P for inferior a 1,0, esta taxa diminui (Zoche-Golob *et al.*, 2015). Este autor verificou também que o valor da G/P obtido no contraste leiteiro está relacionado com a ocorrência de mastites no mês subsequente. Contrariamente, Toni *et al.*, (2011) não obtiveram nenhuma relação significativa entre a incidência de mastites clínicas e a relação G/P no início da lactação.

2.2.5 Ureia

A ureia é o maior produto final do metabolismo do azoto das vacas de leite. Esta molécula tem origem em dois processos metabólicos, podendo ser sintetizada no fígado a partir do amoníaco formado no rúmen, ou a partir do catabolismo dos AA. A ureia difunde-se facilmente pelas membranas dos diversos tecidos, desta forma pode ser excretada pela urina, fezes e leite (Jonker *et al.*, 2001; Márquez, 2006; Konjačić *et al.*, 2010; Fatehi *et al.*, 2012; Spek

et al., 2013; Guliński et al., 2016; Albaaj et al., 2017b). O metabolismo do azoto em ruminantes lactantes pode ser observado na Figura 7.

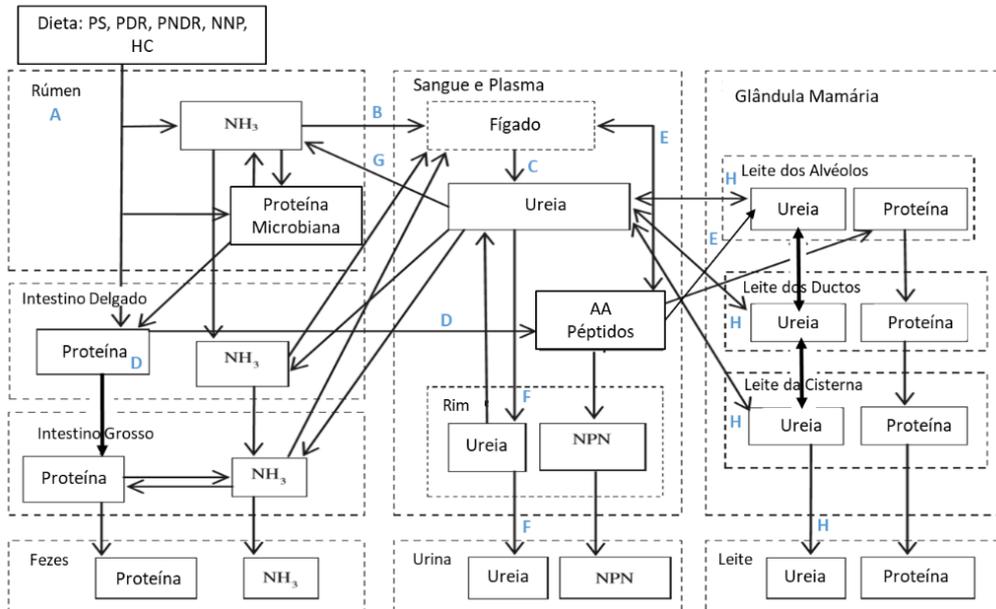


Figura 7 - Visão global do fluxo de azoto em ruminantes lactantes (Adaptado de Spek et al., 2013). (as setas representam os fluxos e as caixas delimitadas pela linha sólida representam as moléculas).

Considerando a Figura 7, o amoníaco é formado no rúmen e este processo está dependente da sincronização entre a degradabilidade da proteína e a fermentescibilidade dos HC. Os microrganismos utilizam o amoníaco, os AA e péptidos para a síntese de proteína microbiana, sendo que sensivelmente 70% do amoníaco é utilizado para este fim (A) (NRC, 2001 citado por Márquez, 2006; Bendelja et al., 2011; Konjačić, et al., 2010; Guliński et al., 2016).

Quando existe excesso de amoníaco no rúmen, este pode passar para o abomaso ou ser absorvido pelas paredes ruminais, entrando na corrente sanguínea e sendo transportado para o fígado (B). No fígado, nos hepatócitos, o amoníaco é convertido em ureia através do ciclo da ureia (C) (primeiro processo metabólico) (Grande & Santos, 2010; Jonker et al., 2001; Kertz et al., 1983 citado por Márquez, 2006; Bendelja et al., 2011; Guliński et al., 2016).

O segundo processo metabólico é o catabolismo dos AA. Neste caso, a proteína não-degradável (PNDR) e a proteína microbiana passam para o intestino delgado, sendo transferidos para a corrente sanguínea na forma de AA e péptidos (D). Quando o organismo não utiliza estes componentes nos processos metabólicos, estes podem ser catabolizados para a obtenção de energia. O catabolismo dos AA e péptidos ocorre no fígado e na glândula mamária (em menor quantidade), este processo consiste na desaminação destes compostos, separando a cadeia carbonada do grupo amina. Posteriormente, o grupo amina é convertido em ureia (E). Os AA catabolizados também podem ter origem na mobilização das reservas corporais (DePeters &

Ferguson, 1992 citado por Cabrita & Fonseca, 2004; Dijkstra *et al.*, 1998 citado por Pimentel, 2011; Roy & Brahma, 2011 citado por Miranda, 2014).

A maioria da ureia presente no sangue é filtrada pelos rins e excretada pela urina (F). Esta molécula também pode retornar ao rúmen pela saliva ou pela parede ruminal, neste caso o azoto é novamente utilizado como fonte de NNP (G). Por último, uma pequena parte da ureia presente no sangue é excreta pelo leite, esta difunde-se para os alvéolos, ductos e cisternas da glândula mamária, o processo inverso também ocorre de forma substancial (H) (Jonker *et al.*, 2001; Wittwer *et al.*, 1999 citado por Márquez, 2006; Burgos *et al.*, 2010; Bendelja *et al.*, 2011; Lapiere *et al.*, 2001 citado por Mutsvangwa *et al.*, 2016; Spek *et al.*, 2016).

A relação existente entre a concentração de azoto ureico no sangue (BUN) e MUN é positiva, linear e elevada (Tabela 14). A concentração de BUN e MUN também está relacionada, de forma positiva, com a concentração de azoto ureico na urina (Jonker *et al.*, 2001; Márquez, 2006; Bastin *et al.*, 2009; Fatehi *et al.*, 2012; Salamończyk & Guliński, 2015; Albaaj *et al.*, 2017b).

Tabela 14 - Correlação entre a concentração de BUN e MUN.

Correlação entre a Concentração de BUN MUN	Referências Bibliográficas
0,77 a 0,98	Arunvipas, 2001 citado por Márquez, 2006
0,904	Pimentel, 2011
0,92	Broderick <i>et al.</i> , 1997 citado por Cabrita & Fonseca, 2004
0,95	Wittwer, 1999 citado por Miranda, 2014

Tendo em conta o metabolismo de azoto descrito anteriormente, pode afirmar-se que a concentração de MUN é proporcional à de BUN (Roseler *et al.*, 1993 citado por Cabrita & Fonseca, 2004). Estes parâmetros são influenciados por vários fatores nutricionais e não-nutricionais. Segundo Arunvipas *et al.*, (2003) os fatores não-nutricionais são responsáveis por 13,3% da variação da quantidade de MUN. Contudo, de acordo com Hojman *et al.*, (2004), estes fatores são responsáveis por 37% da variação de MUN.

A variação da MUN ao **longo da lactação** pode ser observada, de forma resumida, na Tabela 15. Segundo Kgole *et al.*, (2012), a fase de lactação influencia a MUN em 1,2%, mas Doska *et al.*, (2012) indicam que os efeitos da fase de lactação não são significativos.

Tabela 15 - Variação da concentração de MUN ao longo da lactação.

Fase de Lactação (dias)	Concentração de MUN	Referência Bibliográfica
< 30	Baixa	
120 - 150	Alta (Pico)	Arunvipas <i>et al.</i> , 2003
150 - final	↓	
< 60	Baixa	
60 - 150	↑	Godden <i>et al.</i> , 2001a
150 - final	↓	
< 30	Baixa	
150 -180	Alta (Pico)	Fatehi <i>et al.</i> , 2012
180 - final	↓	
< 30	Baixa	Johnson & Young, 2003
< 30	Baixa	Rajala-Schultz <i>et al.</i> , 2003
78	Alta (Pico)	Jonker <i>et al.</i> , 1999 citado por Márquez, 2006
63	Alta (Pico)	Jonker <i>et al.</i> , 1998 citado por Cabrita & Fonseca, 2004
180 - 210	Alta	Doska <i>et al.</i> , 2012
60 - 90	Alta	Emanuelson <i>et al.</i> , 1993 citado por Jilek <i>et al.</i> , 2006
100 - 200	Alta	
> 200	↓	Konjačić <i>et al.</i> , 2010
101 - 200	Alta	
>305	Baixa	Salamończyk & Guliński, 2015
Início	Baixa	Jonker <i>et al.</i> , 2001; Carlsson <i>et al.</i> , 1995 citado por Jilek <i>et al.</i> , 2006

Como se pode observar nesta tabela, todos os autores constataram que até aos 60 dias de lactação a concentração é baixa, verificando-se um aumento após este período, depois a MUN volta a diminuir no final da lactação. Segundo Oldham, (1984) e Trevaskis & Fulkerson, (1999) citado por Cabrita & Fonseca (2004), a concentração de MUN é mais baixa no início da lactação porque nesta fase o azoto é utilizado com maior eficiência devido às elevadas exigências produtivas e/ou devido à mobilização das reservas corporais.

No que respeita à variação de MUN consoante o **número de lactação**, também existe desacordo entre os autores (Tabela 16).

Tabela 16 - Variação da concentração de MUN consoante o número de lactação.

Nº de Lactação	Concentração de MUN	Referência Bibliográfica
1ª	<	Godden <i>et al.</i> , 2001a; Canfield <i>et al.</i> , 1990 e Grexton, 1999 citados por Arunvipas <i>et al.</i> , 2003; Oltner <i>et al.</i> , 1985; Broderick e Clayton, 1997 citados por Cabrita & Fonseca, 2004; Hojman <i>et al.</i> , 2004; Hojman <i>et al.</i> , 2005; Miglior <i>et al.</i> , 2006
>3ª	>	Doska <i>et al.</i> , 2012
1ª - 4ª	>	
≥ 5ª	<	Salamończyk & Guliński, 2015
1ª - 2ª	>	
3ª	<	Jilek <i>et al.</i> , 2006; Fatehi <i>et al.</i> , 2012; Kgole <i>et al.</i> , 2012

Segundo Doska *et al.*, (2012) a concentração de MUN diminui com o aumento do número de lactações. Contrariamente, Miglior *et al.*, (2006) referem que a MUN aumenta com o aumento do número de lactação, assim como Konjačić *et al.*, (2010), sendo que estes autores enunciam que a concentração de MUN apenas aumenta após a segunda lactação.

Oltner *et al.*, (1985) citado por Cabrita & Fonseca (2004) referem que as primíparas apresentam uma menor concentração de MUN porque ainda estão em crescimento, logo utilizam os AA de forma mais eficiente.

Relativamente à variação da concentração de MUN, consoante a **frequência de ordenhas**, Kgole *et al.*, (2012) descrevem este fator influencia a MUN em 0,04%, havendo uma maior concentração de MUN em vacas que são ordenhadas duas vezes por dia quando comparado com vacas que são ordenhadas três vezes. A ordenha em que ocorre a maior concentração de MUN não reúne consenso entre os autores (Tabela 17).

Tabela 17 - Variação da concentração de MUN ao longo do dia.

Ordenha	Concentração de MUN	Referência Bibliográfica
Manhã	>	Eicher <i>et al.</i> , 1999; Greets <i>et al.</i> , 2004
Tarde	>	Godden <i>et al.</i> , 2001a
Não existe diferenças		Trevaskis <i>et al.</i> , 1999 citado por Cabrita & Fonseca, 2004

Ao **longo do ano** a concentração de MUN também varia, e também aqui existem diferenças entre os resultados dos estudos realizados (Tabela 18 e 19).

Tabela 18 - Variação da concentração de MUN consoante a época do ano.

Estação do Ano	Concentração de MUN	País do Estudo	Referência Bibliográfica
verão	>	Iraque	Fatehi <i>et al.</i> , 2012
		Israel	Hojman <i>et al.</i> , 2004
		Macedónia	Hristova <i>et al.</i> , 2014
verão e outono	>	Croácia	Konjačić <i>et al.</i> , 2010
inverno e primavera	<		
inverno	>	Brasil	Doska <i>et al.</i> , 2012
primavera	>	EUA	Jonker <i>et al.</i> , 2001

Tabela 19 - Variação da concentração de MUN consoante o mês do ano.

Mês	Concentração de MUN	País do Estudo	Referência Bibliográfica
abril	>	Portugal	Miranda, 2014
março, abril, julho e agosto	>	Canadá	Arunvipas <i>et al.</i> , 2003
julho a setembro	>	EUA	Godden <i>et al.</i> , 2001c
julho	>	Iraque	Fatehi <i>et al.</i> , 2012
dezembro	<		

Jonker *et al.*, (2001) declaram que a MUN aumenta durante a primavera, devido ao aumento da quantidade de proteína na pastagem e ao aumento da produção de leite.

Os fatores nutricionais são os que mais contribuem para a variação de MUN, nomeadamente a **quantidade e composição da dieta alimentar** (fórmula nutricional), assim como os **sistemas e estratégias alimentares** utilizadas na exploração (TMR, sistema de pastoreio, fornecimento do alimento concentrado e das forragens separadamente, etc.) (Baker *et al.*, 1995 citado por Cabrita & Fonseca, 2004; Hojman *et al.*, 2004; Márquez, 2006; Guliński *et al.*, 2016; Huhtanen *et al.*, 2015).

Segundo Márquez (2006), a quantidade de MUN aumenta de forma linear e significativa com o aumento da ingestão de proteína bruta (PB), uma vez que a correlação entre estes dois parâmetros é elevada (Tabela 20).

Tabela 20 - Correlação entre a PB e a concentração de MUN.

Correlação entre PB e MUN	Referência Bibliográfica
0,92	Broderick <i>et al.</i> , 1997 citados por Cabrita & Fonseca, 2004
0,90	Hof <i>et al.</i> , 1997 citados por Cabrita & Fonseca, 2004
0,78	Nousiainen <i>et al.</i> , 2004

Segundo Márquez (2006), a concentração de MUN pode variar 25% se a quantidade de proteína da dieta variar 10%. Mais especificamente, Aguilar *et al.*, (2012) referem que quando todas as variáveis são constantes, caso a concentração de proteína da dieta aumente 1%, a quantidade de MUN aumenta 11 mg/kg.

Pelo contrário, o aumento da energia fermentescível da dieta, com igual teor de PB, proporciona a diminuição da concentração de MUN (Broderick *et al.*, 2003 citado por Márquez, 2006). Na Tabela 21 está descrito como é que a composição da dieta alimentar influencia a MUN.

Tabela 21 - Influência da composição da dieta alimentar na concentração de MUN.

Fatores	Concentração de MUN	Referência Bibliográfica
Excesso de PS, RDP, PNDR e NNP	↑	Amaral-Philips, s.d.c.; DHIA, s.d.b.; Grande & Santos, 2010; Godden <i>et al.</i> , 2001c; Jonker <i>et al.</i> , 2001; Gustafsson <i>et al.</i> , 1993 citado por Cabrita & Fonseca, 2004; Geerts <i>et al.</i> , 2004; Hojman <i>et al.</i> , 2004; Márquez, 2006; Caldeira, 2005 citado por Pimentel, 2011; Broderick <i>et al.</i> , 1997 citado por Miranda, 2014; Guliński <i>et al.</i> , 2016
Excesso de proteína no intestino delgado - Excessiva absorção de AA	↑	Geerts <i>et al.</i> , 2004; Caldeira, 2005 citado por Pimentel, 2011
Excesso de HC fermentescíveis	↓	Amaral-Philips s.d.c.; DHIA s.d.b.; Grande & Santos, 2010; Jonker <i>et al.</i> , 2001; Gosselin & Adam, 2004; Hossein-Zadeh <i>et al.</i> , 2011; Caldeira, 2005 citado por Pimentel, 2011; Miranda, 2014; Huhtanen <i>et al.</i> , 2015
Excesso de NDF	↑	Hojman <i>et al.</i> , 2004
Não existência do equilíbrio entre PB e HC	↑ ↓	Amaral-Philips, s.d.c.; DHIA, s.d.b.
Não existência do equilíbrio entre PDR e PDNR	↓ ↑	DHIA, s.d.b.
Subnutrição grave - Catabolismo dos AA provenientes das reservas corporais	↑	Caldeira, 2005 citado por Pimentel, 2011

Por último, a utilização de elevadas quantidades de fertilizantes azotados proporciona o aumento da quantidade de PB das pastagens e forragens e, conseqüentemente o aumento da quantidade de proteína do leite (Márquez, 2006; Correa *et al.*, 2004 citado por Miranda, 2014).

Os **sistemas e estratégias alimentares**, nomeadamente a frequência da distribuição do alimento, e como ele é administrado aos animais (TMR ou alimentos separados) influencia a concentração de MUN (Jonker *et al.*, 2001; Guliński *et al.*, 2016). A concentração de BUN e MUN variam ao longo do dia devido aos períodos de ingestão do alimento (Tabela 22) (DHIA, s.d.u; Márquez, 2006; Pimentel, 2011; Gustafsson *et al.*, 1993 citado por Spek *et al.*, 2013).

Tabela 22 - Variação da concentração de amoníaco no rúmen e de BUN e MUN após a ingestão.

Variáveis	Tempo após a ingestão (h)	Referência Bibliográfica
Pico de Amoníaco no Rúmen	1	Gustafsson <i>et al.</i> , 1993 citado por Cabrita & Fonseca, 2004
	2	Geerts <i>et al.</i> , 2004
Pico de BUN	2 a 4	Gustafsson <i>et al.</i> , 1993 citado por Cabrita & Fonseca, 2004 Ikuta <i>et al.</i> , 2005 citado por Spek <i>et al.</i> , 2013
	2	Rodriguez <i>et al.</i> , 1997, Kolver <i>et al.</i> , 1998 e Robledo <i>et al.</i> , 2003 citados por Márquez, 2006
Diminuição de BUN	8	Rodriguez <i>et al.</i> , 1997, Kolver <i>et al.</i> , 1998 e Robledo <i>et al.</i> , 2003 citados por Márquez, 2006
	7 a 8	Gustafsson <i>et al.</i> , 1993 citado por Cabrita & Fonseca, 2004
Pico de MUN	3 a 5	Carlsson & Bergstrom 1994 citados por Cabrita & Fonseca, 2004

No estudo realizado por Broderick *et al.*, (1997) citado por Spek *et al.*, (2013), os autores constataram que a MUN é 33% maior durante o dia do que durante a noite, isto pode ser devido ao facto do animal consumir uma maior quantidade de alimento durante o dia.

Desta forma, as variações diurnas da concentração de MUN pode originar uma má interpretação dos resultados (Rajala-Schultz *et al.*, 2003; Cabrita & Fonseca, 2004). Sendo assim, é importante que a recolha das amostras de leite seja sempre feita no horário normal de ordenha e na mesma altura do dia, ou com um intervalo idêntico entre a ingestão do alimento e a recolha da amostra (DHIA, s.d.u; Meyer *et al.*, 2006).

2.2.5.1 Metodologia de recolha de amostras de leite para a análise de MUN e sua interpretação

A metodologia de recolha das amostras de leite influencia a concentração de MUN. Segundo DHIA (s.d.b), a MUN tende a ser mais alta na primeira fase da ordenha e menor na fase final, por isso as amostras de leite devem ser representativas de todo o leite produzido. Broderick *et al.*, (1997) citado por Cabrita & Fonseca, (2004), sugerem que a determinação de MUN deve ser feita em amostras de leite compostas (uma amostra tem leite de mais do que uma ordenha), porque estas amostras fornecem uma informação mais rigorosa sobre a concentração de MUN.

A concentração de MUN pode ser obtida através de 3 métodos de amostragem: (1) amostra individual de todos os animais; (2) amostra representativa de um grupo de animais homogéneos; (3) amostra representativa de todos os animais do efetivo (ex. amostra do tanque de leite). A concentração de MUN pode ser interpretada de 3 formas: isolada; em associação com o teor de proteína do leite; em associação com o teor de proteína e da quantidade de leite produzido.

Relativamente às unidades da concentração de ureia/MUN, verificou-se que as mesmas diferem consoante os autores. Tendo em conta que, no contraste leiteiro em Portugal, a

concentração de MUN é apresentada em (mg/kg), todos os valores foram uniformizados de acordo com a Tabela 23.

Tabela 23 - Conversão da concentração de ureia em MUN e vice-versa (Adaptado de Márquez, 2006).

Unidades Convencionais	Operação	Fator	Sistema Internacional de Unidades
Ureia (mg/dL)	x	0,1665	Ureia (mmol/L)
Ureia (mg/dL)	x	0,0777	MUN (mmol/L)
MUN (mg/dL)	x	0,357	Ureia (mmol/L)

Analisando os diversos estudos que avaliaram a concentração de MUN em amostras de leite individuais verifica-se uma discrepância entre os valores de MUN obtidos e a partir do qual se considera que o teor de MUN é baixo, normal ou elevado (Tabela 24).

Tabela 24 - Divisão da concentração de MUN a partir do qual se considera que o valor é baixo, normal ou alto.

Níveis	Concentração de MUN (mg/kg)	Referência Bibliográfica
Valor Baixo	< 70	DHIA, s.d.b.
	< 80	Jonker <i>et al.</i> , 2001
	< 83	Broderick <i>et al.</i> , 2010 citado por Huhtanen <i>et al.</i> , 2015
	< 90	Amaral-Philips, s.d.c
	< 100	Caldeira, 2005 citado por Pimentel, 2011
	< 120	Nelson, 1996 citado por Johnson <i>et al.</i> , 2003
	< 150	Albaaj <i>et al.</i> , 2017b
Valor Normal	80 - 120	Jonker <i>et al.</i> , 2001
	100 - 130	Marenjak <i>et al.</i> 2004 citado por Konjačić <i>et al.</i> , 2010
	100 - 140	Amaral-Philips, s.d.c; Doska <i>et al.</i> , 2012
	100 - 160	Gosselin & Adam, 2004; Jonker <i>et al.</i> , 1998 citado por Cabrita & Fonseca, 2004
	100 - 180	Jonker <i>et al.</i> , 1999 citado por Salamończyk & Guliński, 2015
	120 - 160	Nelson, 1996 citado por Johnson <i>et al.</i> , 2003
	110 - 170	Baker <i>et al.</i> , 1999 citado por Moreira, 2015
	150 - 270	Salamończyk & Guliński, 2015
Valor Alto	200 - 400	Bastin <i>et al.</i> , 2009
	250 - 450	Albaaj <i>et al.</i> , 2017b
	> 120	DHIA, s.d.b.
	> 150	Amaral-Philips, s.d.c; Caldeira, 2005 citado por Pimentel, 2011
	> 160	Nelson, 1996 citado por Johnson <i>et al.</i> , 2003

Uma vez que existe uma grande variação dos valores de MUN a nível individual, deve-se interpretar o valor de MUN obtido através de uma amostra de leite representativa de um grupo de animais, ou através de uma amostra representativa de todos os animais do efetivo (DHIA, s.d.b; Godden *et al.*, 2001c; Olter *et al.*, 1985 citado por Cabrita & Fonseca, 2004; Hojman *et al.*, 2004; Kohn *et al.*, 2002 citado por Kgoale *et al.*, 2012). A amostragem de grupo deve ser realizada em grupos de animais homogêneos, que estejam na mesma fase de lactação, com uma produção de leite semelhante e sobre a mesma dieta alimentar (Márquez, 2006). Na Tabela 25 é apresentado o número de animais que deve constar num grupo de amostragem.

Tabela 25 - Número de animais por grupo de amostragem.

Número de animais por grupo de amostragem	Referência Bibliográfica
25	Jonker <i>et al.</i> , 2001
8	DHIA, s.d.b.
4 - 16	Broderick <i>et al.</i> , 1997 citado por Cabrita & Fonseca, 2004

De acordo com DHIA (s.d.b.), a variação individual de MUN é sensivelmente ± 60 mg/kg em relação à média do grupo, por exemplo, caso o grupo tenha uma média de 120 mg/kg, 95% do grupo varia entre 60 a 180 mg/kg.

Relativamente à análise da amostra do tanque de leite, Márquez (2006) indica que o valor de MUN obtido reflete o metabolismo de azoto das vacas lactantes, e que este resultado pode ser utilizado como um filtro para definir se há necessidade, ou não, de realizar análises mais detalhadas a nível individual. Caso a concentração de MUN obtida esteja fora do intervalo de referência deve recolher-se amostras individuais (Márquez, 2006). Jonker *et al.*, (2001) enunciam que a amostra do tanque de leite é mais barata, mas que não demonstra as diferenças de manejo dos diferentes grupos de animais da exploração.

Para se estabelecer a concentração média de MUN do efetivo deve testar-se todas as vacas de forma individual por um período mínimo de 6 meses. Após a definição do valor médio e do valor objetivo, deve-se analisar os desvios que ocorrem, quer estes sejam superiores, ou inferiores (DHIA s.d.b.; Kohn *et al.*, 2002 citado por Kgoale *et al.*, 2012). No estudo realizado por Jonker *et al.*, (2002) citado por Bastin *et al.*, (2009), demonstrou-se que o fornecimento da média de MUN do efetivo aos produtores proporciona um melhor manejo alimentar e uma maior aproximação da concentração de MUN ao valor objetivo.

Vários autores defendem que a concentração de MUN deve ser interpretada em associação com o valor de proteína do leite. Na Tabela 26 estão descritos os valores de MUN e de proteína em que os autores consideram que existe um equilíbrio da dieta alimentar.

Tabela 26 – Associação entre a concentração de MUN e a percentagem de proteína no leite em que existe um equilíbrio da dieta alimentar.

Concentração de MUN (mg/kg)	Proteína (%)	Referência Bibliográfica
150 - 300	3,2 - 3,8	Bendelja <i>et al.</i> , 2011
120 - 160	3,0 - 3,2	Nelson 1996 citado por Fatehi <i>et al.</i> , 2012
150 - 250	3,2 - 3,6	Guliński <i>et al.</i> , 2016
150 - 300	3,2 - 3,6	Osten-Sacken 1999 citado por Salamończyk & Guliński, 2015

Na Tabela 27 encontram-se várias interpretações de diferentes associações entre a percentagem de proteína do leite e a concentração de MUN, tendo ainda em conta a produção de leite diária. A análise da produção de leite diária por vaca é importante porque, caso os animais produzam uma menor quantidade de leite do que o esperado, possivelmente estão a ingerir uma maior quantidade de proteína relativamente às suas necessidades, proporcionando o aumento de MUN (Jonker *et al.*, 2001)

Tabela 27 - Interpretação da concentração de MUN consoante a percentagem de proteína do leite.

Concentração de MUN (mg/kg)	< 3,0	Proteína (%) 3,0 - 3,2	> 3,2	Referência Bibliográfica
< 151,4	Deficiência PB		Excesso HC (Prod.* <30 kg/dia)	Márquez, 2006
< 256	Deficiência PB e HC	Deficiência PB e HC	Excesso HC Deficiência PB Equilíbrio AA	Miranda 2014
< 120	Deficiência PB, PS, PDR		Deficiência PDR, PS Excesso HC	Moreira, 2015
181,7 - 302,8	Baixo Fornecimento de Nutrientes	Correto (Prod.* 30-35 kg/dia)	Sincronia Ruminal (Prod.* <30 kg/dia)	Márquez, 2006
256 - 342	Deficiência HC Normal PB	Sincronia Ruminal	Excesso HC Normal PB	Miranda 2014
120 - 170	Deficiência PB, HC, AA		Equilíbrio AA e HC	Moreira, 2015
> 333	Deficiência HC	Correto (Prod.* >35 kg/dia)	Excesso PB, PDR e NNP	Márquez, 2006
> 342	Deficiência HC Excesso PB	Excesso PB Deficiência HC	Excesso PB	Miranda 2014
> 180	Deficiência PB, PS, PDR, HC Desequilíbrio AA		Excesso PS, PDR Deficiência HC	Moreira, 2015

*Produção de Leite (Prod.)

Considerando a complexidade da fundamentação da utilização do valor de MUN por diversos autores, de uma forma sucinta, na Tabela 28 podemos observar as possíveis utilizações do valor de MUN.

Tabela 28 - Possíveis utilizações do valor de MUN.

Possíveis Utilizações da Concentração de MUN	Referência Bibliográfica
Monitorizar os programas alimentares	DHIA s.d.b; Amaral-Philips, s.d.c; Jonker <i>et al.</i> , 2001; Nousiainen <i>et al.</i> , 2004; Hojman <i>et al.</i> , 2005; Bastin <i>et al.</i> , 2009; Aguilar <i>et al.</i> , 2012
Controlar a ingestão de PB e de HC relativamente às necessidades do animal	Jonker <i>et al.</i> , 2001; Hristova <i>et al.</i> , 2014; Pimentel, 2011; Aguilar <i>et al.</i> , 2012
Analisar a sincronização entre a degradação da proteína e a fermentescibilidade dos HC da dieta	Amaral-Philips, s.d.c; Jonker <i>et al.</i> , 2001; Rajala-Schultz, 2003; Geerts <i>et al.</i> , 2004; Márquez, 2006; Meyer <i>et al.</i> , 2006; Jilek <i>et al.</i> , 2006; Bendelja <i>et al.</i> , 2011; Pimentel, 2011; Doska <i>et al.</i> , 2012; Konjačić <i>et al.</i> , 2010; Guliński <i>et al.</i> , 2016
Conferir a eficiência da utilização da proteína e do azoto por parte do animal	Godden <i>et al.</i> , 2001c; Rajala-Schultz <i>et al.</i> , 2001; Márquez, 2006; Miglior <i>et al.</i> , 2006; Burgos <i>et al.</i> , 2007; Hossein-Zadeh <i>et al.</i> , 2011; Fatehi <i>et al.</i> , 2012; Kgole <i>et al.</i> , 2012; Hristova <i>et al.</i> , 2014; Guliński <i>et al.</i> , 2016; Huhtanen <i>et al.</i> , 2015; Albaaj <i>et al.</i> , 2017b
Melhorar os proveitos da exploração - diminuição dos custos da alimentação e aumento da quantidade e qualidade do leite	Grande & Santos, 2010; Godden <i>et al.</i> , 2001b; Godden <i>et al.</i> , 2001c; Jonker <i>et al.</i> , 2001; Rajala-Schultz, 2003; Hojman <i>et al.</i> , 2005; Márquez, 2006; Pimentel, 2011; Doska <i>et al.</i> , 2012; Roy & Brahma, 2011; citado por Miranda, 2014; Guliński <i>et al.</i> , 2016
Diminuir o impacto ambiental das explorações de leite	Godden <i>et al.</i> , 2001b; Jonker <i>et al.</i> , 2001; Fatehi <i>et al.</i> , 2002; Nousiainen <i>et al.</i> , 2004; Hojman <i>et al.</i> , 2005; Márquez, 2006; Burgos <i>et al.</i> , 2010; Aguilar <i>et al.</i> , 2012; Kgole <i>et al.</i> , 2012; Salamończyk & Guliński, 2015; Guliński <i>et al.</i> , 2016
Estimar a quantidade de azoto excretado pela urina	Nousiainen <i>et al.</i> , 2004; Burgos <i>et al.</i> , 2007; Fatehi <i>et al.</i> , 2012; Huhtanen <i>et al.</i> , 2015; Salamończyk & Guliński, 2015
Estimar as emissões de NH ₃ para o ambiente	Márquez, 2006; Burgos <i>et al.</i> , 2007; Burgos <i>et al.</i> , 2010; Aguilar <i>et al.</i> , 2012; Salamończyk & Guliński, 2015
Avaliar e melhorar o desempenho reprodutivo	Grande & Santos, 2010; Godden <i>et al.</i> , 2001c; Rajala-Schultz, 2003; Chaveiro <i>et al.</i> , 2011; Doska <i>et al.</i> , 2012
Controlar o Bem-estar Animal – indicar a possível ocorrência de acidose ruminal (MUN baixa) ou indicar o aumento da utilização das reservas corporais (MUN alta)	DHIA, s.d.b.; Bendelja <i>et al.</i> , 2011; Butler, 2000 citado por Márquez, 2006; Overton, 1998 e Roy <i>et al.</i> , 2011 citados por Miranda, 2014

2.2.6 β -Hidroxibutirato (BHB)

O β -Hidroxibutirato é um dos principais corpos cetônicos das vacas de leite, assim como a acetona e o acetoacetato. O BHB é o mais estável e robusto, sendo o corpo cetônico predominante em circulação (70%) (Nielsen, 2005; Duffield *et al.*, 2009; Jorge, 2009; Barros, 2010; Alvarenga, 2013; Miguéns, 2016; Viña *et al.*, 2016; Tatone *et al.*, 2016).

Os corpos cetônicos são excretados pela urina e pelo leite. A concentração de BHB no sangue apresenta uma boa relação com a concentração de BHB no leite (Geishauser *et al.*, 1998 e Duffield, 2000 citados por Viña *et al.*, 2016).

A formação de corpos cetônicos é denominada cetogénese e ocorre quando as vacas estão em NEB severo e não se conseguem adaptar ao desequilíbrio energético, e/ou quando os animais ingerem uma grande quantidade de alimentos que contêm uma elevada concentração de ácido butírico e um alto teor de gordura (Amaral-Philips, s.d.b; Laeger *et al.*, 2010; Marcos, 2014; Schwarz *et al.*, 2015).

Quando os animais ingerem uma grande quantidade de alimento que contenha uma elevada concentração de ácido butírico, este pode ser oxidado em BHB pelas células epiteliais do rúmen, ou ser transformado em BHB e/ou acetoacetato na mucosa intestinal (Oetzel, 2004; Laeger *et al.*, 2010; Andrews *et al.*, 2004 e Kaneko *et al.*, 2008 citados por Cruz, 2015).

Caso os animais estejam sob a ocorrência de NEB, entre outros mecanismos, ocorre a lipólise dos adipócitos, originando a libertação dos triglicéridos, glicerol e ácidos gordos não esterificados (NEFA) para o sangue. Os NEFA presentes no sangue podem ser utilizados diretamente pelos tecidos dos vários órgãos, como fonte energética, ou serem metabolizados no fígado (Castro *et al.*, 2009; Barros, 2010; Alvarenga, 2013; Marques, 2013; Marcos, 2014; Cruz, 2015; Jorjong *et al.*, 2015).

No fígado os NEFA são transformados por dois processos, podem ser oxidados ou re-esterificados. A oxidação pode ser total ou parcial (Figura 8). No processo de oxidação total os NEFA contribuem para a formação de moléculas de glucose (processo delimitado a azul). Na oxidação parcial, mais intensa quando a quantidade de glucose no sangue é pequena, os NEFA contribuem para a formação de corpos cetônicos (processo delimitado a laranja) (Castro *et al.*, 2009; Jorge, 2009; Barros, 2010; Marques, 2013; Alvarenga, 2013; Cruz, 2015).

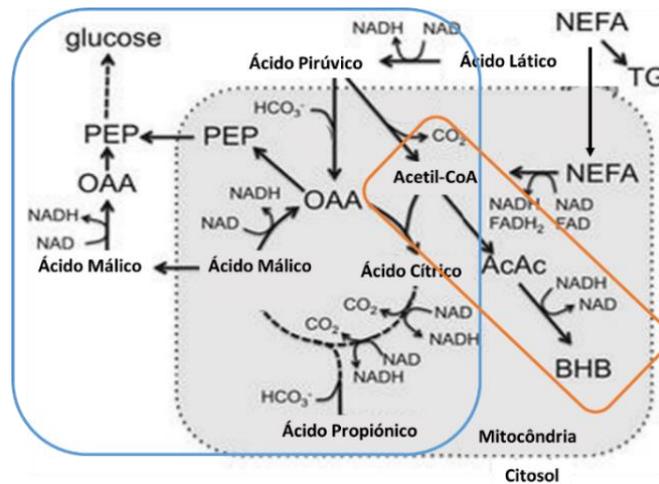


Figura 8 - Processo de oxidação dos NEFA no fígado de bovino (Adaptado de Allen & Piantoni, 2017). (ácido fosfoenolpirúvico (PEP), ácido oxaloacético (OAA) dinucleótico de nicotinamida e adenina (NADH), dinucleótico de nicotinamida (NAD), dióxido de carbono (CO₂), bicarbonato (HCO₃⁻), acetoacetato (AcAc), β-hidroxibutirato (BHB), triglicéridos (TG))

Deste modo, a concentração de NEFA no sangue reflete o grau de mobilização da gordura e a concentração de corpos cetônicos reflete o tipo de oxidação (Castro *et al.*, 2009; Jorge, 2009; Barros, 2010; Alvarenga, 2013; Marques, 2013). Se houver um aumento excessivo destes componentes significa que o animal não se está a conseguir adaptar ao NEB. A capacidade individual de se adaptar ao aumento da concentração de corpos cetônicos e NEFA varia consoante o animal (Duffield *et al.*, 2009; McArt *et al.*, 2015).

Na glândula mamária o BHB pode ser utilizado para a síntese de ácidos gordos. Por isso a concentração de BHB no leite é menor do que a concentração de BHB no sangue (Dodds *et al.*, 1981 citados por Enjalbert *et al.*, 2001; Reist *et al.*, 2002 citado por Campos *et al.*, 2005). Segundo Enjalbert *et al.*, (2001), a concentração de BHB no sangue explica 43% da variação da concentração de BHB no leite.

A concentração de BHB no sangue e leite varia **ao longo do ciclo produtivo**, existindo um aumento no final da gestação e início da lactação (Duffield *et al.*, 2009; Ospina *et al.*, 2010b). Durante a lactação, de acordo com Koeck *et al.*, (2014), a concentração de BHB no leite é mais alta entre o 5 e 40 DEL, ou entre o 20 e 30 DEL, conforme os resultados obtidos por Nielsen *et al.*, (2005) com vacas da raça Jersey. Após os 30 DEL, a concentração diminui de forma acentuada.

Segundo Tatone *et al.*, (2017), tendo em conta os primeiros 30 dias de lactação, a percentagem de vacas com BHB no leite superior a 0,15 mmol/L é maior após o parto, sendo que a maior percentagem de vacas (27%) ocorreu ao 6 DEL, tendo diminuído posteriormente. Santschi *et al.*, (2016) avaliaram a percentagem de animais com BHB no leite elevado (> 0,2

mmol/L) entre os 5 e 35 dias de lactação e analisaram em que dias da lactação é que a percentagem de animais é mais elevada (Tabela 29).

Tabela 29 - Percentagem de animais com elevada concentração de BHB até aos 35 dias de lactação (Adaptado de Santschi *et al.*, 2016).

Nº de Lactação	DEL	Percentagem de animais com elevada concentração BHB (%)
1ª	5 – 35	18,8
	5 – 7	30,03
2ª	5 – 35	19,5
	13 – 15	25,8
3ª	5 – 35	27,6
	11 – 14	34,6

Relativamente à concentração de BHB no sangue, no estudo realizado por Campos *et al.*, (2005), verificou-se que a concentração de BHB atinge o pico aos 56 dias de lactação, coincidindo com o pico de produção de leite. Contudo, Hachenberg *et al.*, 2007 citado por Jorge (2009) concluíram que a concentração de BHB apresenta valores mais elevados mais precocemente, entre os 10 e 42 dias de lactação. Salienta-se que próximo dos 10 dias de lactação ocorreu o pico da concentração de NEFA no sangue, sugerindo valores extremos de NEB. Por último, Marques (2013) verificou que a concentração de BHB atinge o pico de concentração poucos dias após o parto (5 e 15 DEL). Após o 15 DEL a concentração diminuiu, verificando-se valores médios da concentração de BHB de 1,36, 1,50 e 0,93 mmol/L aos 5, 15 e 30 dias de lactação, respetivamente.

McArt *et al.*, (2013) avaliaram a percentagem de animais com BHB no sangue entre 1,2 a 2,9 mmol/L entre os 3 e os 16 DEL, e concluíram que a percentagem de animais foi maior ao 5 DEL (sensivelmente 28%). Após os 5 DEL, a percentagem de animais diminuiu gradualmente. No estudo realizado por Jorjong *et al.*, (2015), estes autores verificaram que, na primeira semana de lactação, 59% das fêmeas apresentaram uma concentração de BHB no sangue superior a 1,2 mmol/L, na segunda semana apenas 14% e na terceira apenas 5,3%.

Segundo Nowroozi *et al.*, (2011) citado por Marcos (2014), a percentagem de animais com cetose subclínica (considerando uma concentração de BHB no sangue superior a 0,799 mmol/L) aumenta com o aumento do **número de lactações**, existindo uma maior percentagem de animais com risco de cetose subclínica entre a terceira e quinta lactação. Contrariamente, Marcos (2014) constatou que existe uma tendência para a diminuição dos valores de BHB com o aumento do número de lactação.

O **mês em que ocorre o parto** afeta a percentagem de animais que apresenta concentrações de BHB elevadas no início da lactação (Santaschi *et al.*, 2016; Tatone *et al.*, 2017). Segundo Santschi *et al.*, (2016), o grupo de vacas que parem entre outubro e janeiro e entre abril e junho apresentam uma maior percentagem de animais com a concentração de BHB no leite superior a 0,15 mmol/L (Canadá). Este autor está em concordância com Tatone *et al.*,

(2017), que indicam que o grupo de vacas que pare no inverno têm uma maior percentagem de animais com BHB no leite superior a 0,15 mmol/L, relativamente às fêmeas que parem nas restantes estações do ano (Canadá). Por último, Vanholder *et al.*, (2015) referem que as vacas que parem entre janeiro e março têm uma maior concentração de BHB, comparativamente às que parem entre outubro e dezembro (Bélgica).

A concentração de BHB nos fluidos corporais também varia ao longo do dia devido à **quantidade e composição do alimento**, e aos **sistemas e estratégias alimentares** utilizadas na exploração, uma vez que a concentração de BHB aumenta durante e após a refeição, devido à produção de ácido butírico no rúmen. No caso de as vacas serem alimentadas por TMR várias vezes ao dia, as variações de BHB nos fluidos corporais são menores (a concentração de BHB no leite é menos variável do que no sangue). O pico de concentração de BHB no sangue ocorre 4 a 5 horas após o início da refeição (Oetzel, 2004; Nielsen *et al.*, 2005; Jorge, 2009; Duske *et al.*, 2009; Laeger *et al.*, 2010).

Sempre que se efetua uma mudança significativa no manejo alimentar da exploração, deve-se analisar a concentração de BHB, para que as alterações realizadas sejam avaliadas e, se necessário, efetuar-se ações corretivas.

2.2.6.1 Metodologia de recolha de amostras de leite para a análise de BHB e sua interpretação

Devido ao facto do BHB ser o corpo cetónico mais estável nos fluidos corporais, este é o parâmetro mais utilizado para identificar os animais que estão sob a ocorrência de transtornos metabólicos, nomeadamente o NEB, a hipercetonémia e a cetose clínica e subclínica. O método de referência é a medição da concentração de BHB no sangue, mas este também pode ser medido no leite, efetuando análises em laboratório, e na urina, através de tiras. Estes métodos são mais práticos e fáceis (Oetzel, 2004; Nielsen *et al.*, 2005; Marques, 2013; Koeck *et al.*, 2014; Ehret *et al.*, 2015; Moreira, 2015).

Para o diagnóstico destes transtornos metabólicos também se pode utilizar a concentração da acetona, acetoacetato e NEFA no sangue, assim com a percentagem de gordura e a relação G/P do leite (Nielsen *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2009; Alvarenga, 2013; Marques *et al.*, 2013; Schwarz *et al.*, 2015; Tatone *et al.*, 2016). De acordo com Kneegsel *et al.*, (2010) e Drift *et al.*, (2012) a deteção de vacas com hipercetonémia não deve ser efetuada apenas através da concentração de BHB no leite, uma vez que existe uma maior especificidade quando se conjugam vários parâmetros.

Entre os autores existem diversas metodologias de amostragem e interpretações da concentração de BHB no sangue e leite. Primeiramente deve-se ter conhecimento de quando é que se deve retirar uma amostra do animal e quais são as metodologias de amostragem.

Para avaliar a quantidade de animais que estão em NEB, as amostras devem ser retiradas entre os 3 e 14 DEL (Ospina *et al.*, 2013). No entanto, para se avaliar a quantidade de animais que estão com hipercetonemia, o grupo de animais elegível é o que se encontra entre os 5 e 50 DEL (Oetzel, 2004). Contrariamente, Alvarenga, (2013), Suthar *et al.*, (2013) e McArt *et al.*, (2016), indicam que o diagnóstico da hipercetonemia deve ser realizado nas duas primeiras semanas de lactação.

Para analisar a concentração de BHB existem 3 metodologias de amostragem: (1) amostras individuais de todos os animais; (2) amostras individuais do grupo representativo de animais em risco; (3) amostra representativa do grupo de animais em risco.

A interpretação dos resultados de amostras individuais é feita pela comparação do valor obtido com o intervalo de valores/valor de referência (Oetzel, 2004). Este autor realça que esta interpretação apenas é útil para tomar decisões sobre a forma de manejo e tratamento das vacas que estão sob a ocorrência dos transtornos anteriormente mencionados, mas que não deve ser utilizada para definir novas estratégias de manejo na exploração. O valor a partir do qual se considera que a concentração de BHB é indicativa da ocorrência de um transtorno metabólico é difícil de definir (Tabela 30 e 31) (Duffield *et al.*, 2009; Ospina *et al.*, 2010b).

Tabela 30 – Definição do intervalo de valores da concentração de BHB no leite, a partir dos quais se considera que o risco é baixo, moderado ou alto, de o animal estar sob a ocorrência de transtornos metabólicos

Risco de BHB	Concentração de BHB no leite (mmol/L)	Etiologia*	Referência Bibliográfica
Baixo	< 0,15	Hipercetonemia	Koeck <i>et al.</i> , 2014; Nielsen <i>et al.</i> , 2015; Santaschi <i>et al.</i> , 2016
	> 0,1		Viña <i>et al.</i> , 2016
	> 0,15		Schwarz <i>et al.</i> , 2015; Tatone <i>et al.</i> , 2017
	> 0,2		Denis-Robichaud <i>et al.</i> , 2014; Valacta citado por Koeck <i>et al.</i> , 2014
Alto	0,15 – 0,2	Médio Risco de Cetose Clínica Suspeita de Cetose Clínica	Schwarz <i>et al.</i> , 2015; Koeck <i>et al.</i> , 2014; Santaschi <i>et al.</i> , 2016
	> 0,2	Elevado Risco de Cetose Clínica	Schwarz <i>et al.</i> , 2015
	> 0,2 0,5 - 0,8	Cetose Clínica	Koeck <i>et al.</i> , 2014; Santaschi <i>et al.</i> , 2016 Nielsen <i>et al.</i> , 2015

*Etiologia utilizada pelos autores

Tabela 31 – Definição do intervalo de valores da concentração de BHB no leite, a partir dos quais se considera que o risco é baixo, moderado ou alto, de o animal estar sob a ocorrência de transtornos metabólicos

Níveis de BHB	Concentração de BHB no sangue (mmol/L)	Etiologia*	Revisão Bibliográfica
Baixo	< 0,1		Andrews <i>et al.</i> , 2008 citado por Marques, 2013
	> 1,0	Cetose Subclínica	Sakha <i>et al.</i> , 2006 e Andrews <i>et al.</i> , 2008 citado por Marques, 2013
	> 1,2	Hipercetonémia	Santaschi <i>et al.</i> , 2016
		Cetose Subclínica	Enjalbert <i>et al.</i> , 2001; Roos <i>et al.</i> , 2007; Wilson & Goodell, 2013; Tatone <i>et al.</i> , 2017
		Cetose Clínica	Mahrt <i>et al.</i> , 2015;
	1,0 - 1,4		McArt <i>et al.</i> , 2012
1,2 - 1,4		Oetzel, 2004; Duffield <i>et al.</i> , 2009; Kneysel <i>et al.</i> , 2010; LeBlanc, 2010; Suthar <i>et al.</i> , 2013; Shin <i>et al.</i> , 2015; Raboisson <i>et al.</i> , 2015	
Alto	> 1,4	Cetose Subclínica	Jorge, 2009; Geishauser <i>et al.</i> , 2000 e Stilwell, 2013 citados por Marcos, 2014
	1,2 - 2,9		Duffield <i>et al.</i> , 2009; Denis-Robichaud <i>et al.</i> , 2014
	> 1,4	Cetose Clínica	McArt <i>et al.</i> , 2011; McArt <i>et al.</i> , 2012; Vanholder <i>et al.</i> , 2015
			Duffield <i>et al.</i> , 2009; Denis-Robichaud <i>et al.</i> , 2014
			Dirksen, 2006 citado por Laeger <i>et al.</i> , 2010
			Geishauser <i>et al.</i> , 2000, Duffield <i>et al.</i> , 2009, Stilwell, 2013 citados por Marcos, 2014
			Sakha <i>et al.</i> , 2006 e Duffield <i>et al.</i> , 2004 citado por Marques, 2013
> 2,0		Oetzel, 2004; Jorge, 2009; McArt <i>et al.</i> , 2011; McArt <i>et al.</i> , 2012; Vanholder <i>et al.</i> , 2015	
> 2,5			
> 2,6			
> 3,0			

*Etiologia utilizada pelos autores

A maioria dos autores analisa a composição do leite através de amostras individuais de todos os animais do efetivo, contudo Oetzel (2004) e Ospina *et al.*, (2013) propuseram uma abordagem por amostragem do efetivo. Esta metodologia assenta no pressuposto de que cada animal tem o seu limite fisiológico (e que este não é igual entre os animais). Para além deste pressuposto, acresce a facilidade de obtenção de amostras de leite por amostragem e a economicidade do sistema.

A análise dos resultados obtidos, por amostragem do efetivo, apenas é útil se houver um número suficiente de animais que representem os animais que estão em risco de estar sob a ocorrência de NEB ou hipercetonémia (Oetzel, 2004; Ospina *et al.*, 2013a). De acordo com Ospina *et al.*, (2013), o número de animais amostrados deve ser definido tendo em conta o objetivo da amostragem. Por exemplo, para estimar a prevalência de animais com elevada concentração de BHB, este autor indica que o número de animais amostrados deve ter em conta o número de animais do efetivo, o número de animais em risco, o intervalo de confiança que se pretende e a precisão do intervalo de confiança (Tabela 32). Este autor recomenda também que, caso as primíparas tenham um maneio diferente das múltiparas, estes animais devem ser avaliados em amostragens separadas

Tabela 32 - Dimensão da amostra necessária para estimar a prevalência de animais com elevados metabólitos energéticos (Adaptado de Ospina *et al.*, 2013).

Dimensão do Efetivo	Animais em Risco	Dimensão Amostra (± 10)*	Dimensão Amostra (± 5)*	Intervalo de confiança (%)
1000	35	14	25	75
	35	20	30	90
	35	22	31	95
	35	26	33	99
2000	70	17	39	75
	70	27	50	90
	70	33	55	95
	70	43	61	99

* Precisão do intervalo de confiança

Oetzel (2004) considera que, para avaliar a prevalência de cetose subclínica das explorações de leite, o intervalo de confiança mínimo aceitável é 75%, deste modo o autor aconselha a retirar-se uma amostra de 12 em 50 animais.

A interpretação dos resultados obtidos por amostragem do efetivo pode ser feita através de amostras individuais ou por amostras de grupo (Oetzel, 2004; Ospina *et al.*, 2013). Por forma de comparar estes dois métodos, Ospina *et al.*, (2013) analisaram 12 efetivos, com um mínimo de 12 amostras cada, estas foram analisadas como amostras individuais e como uma amostra de grupo. Este estudo concluiu que o resultado das amostras de grupo tem uma estreita correlação com a média aritmética do resultado das amostras individuais, mas que o primeiro tem uma menor sensibilidade em identificar corretamente os efetivos que apresentam NEB. A baixa sensibilidade do resultado das amostras de grupo, apesar dos menores custos laboratoriais, pode originar um maior número de falsos negativos, fazendo com que um efetivo que está afetado não seja identificado.

Relativamente às amostras individuais recolhidas por amostragem, o nível de alarme (proporção de animais que se encontra acima do valor de referência, a partir da qual se classifica o efetivo como sendo negativo, ou positivo) para a ocorrência de NEB ou cetose subclínica é diferentes entre os autores. De acordo com Oetzel (2004), as explorações devem ter menos de 10% da amostragem com uma concentração de BHB no sangue superior a 1,4 mmol/L, senão são classificadas como positivas para a ocorrência de cetose subclínica (Figura 9). Esta estratégia pode classificar os efetivos de forma errada (Figura 10).

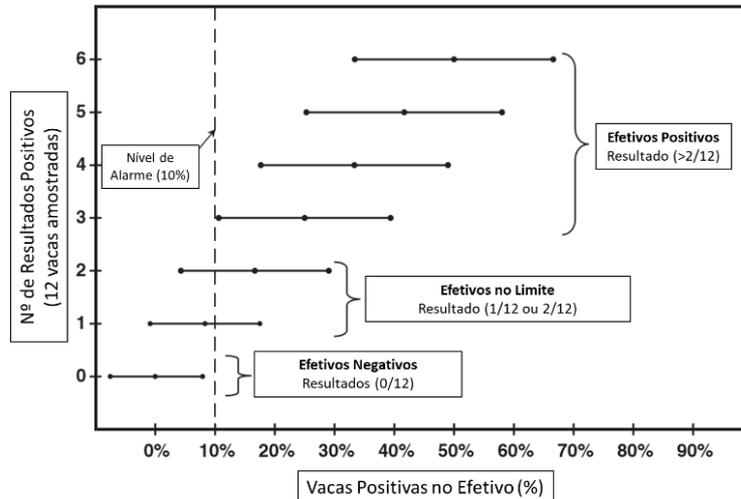


Figura 9 - Interpretação da concentração de BHB no sangue, obtido através de amostras individuais, utilizando um intervalo de confiança de 75% e um nível de alarme de 10% (12 animais amostrados em 50) (Adaptado de Oetzel, 2004).

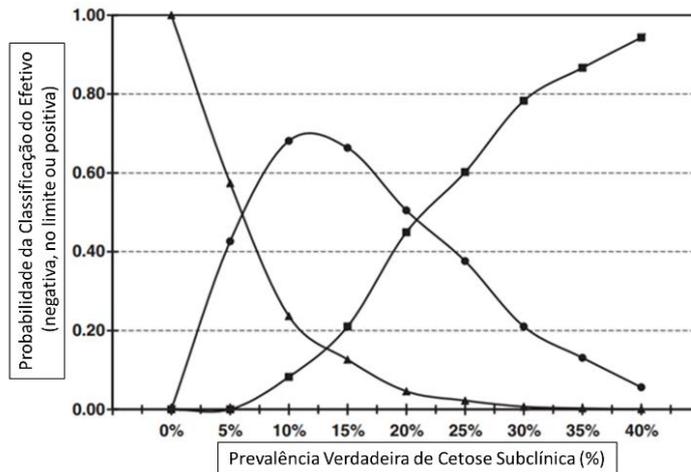


Figura 10 - Probabilidade de classificar um efetivo como negativo (triângulo), no limite (círculo), ou positivo (quadrado) para a ocorrência de cetose subclínica utilizando um valor limite de $\geq 1,4$ mmol/L para a concentração de BHB (12 animais amostrados em 50, com um nível de alarme de 10% e um intervalo de confiança de 75%) (Adaptado de Oetzel, 2004).

De acordo com a Figura 10, um efetivo tenha um grupo de animais com 25% de prevalência de cetose subclínica tem 2% de possibilidades de ser classificar como negativo, 38% de possibilidades de ser classificado no limite, e 60% de possibilidades de ser classificado como positivo (Oetzel, 2004).

Por outro lado, Ospina *et al.*, (2013) indicam que se deve utilizar um nível de alarme de 15% e 1,2 mmol/L como valor de referência da concentração de BHB no sangue. Caso a porcentagem de animais que se encontra acima do valor de referência seja superior, os produtores devem efetuar tratamentos e realizar análises mais frequentes (Figura 11).

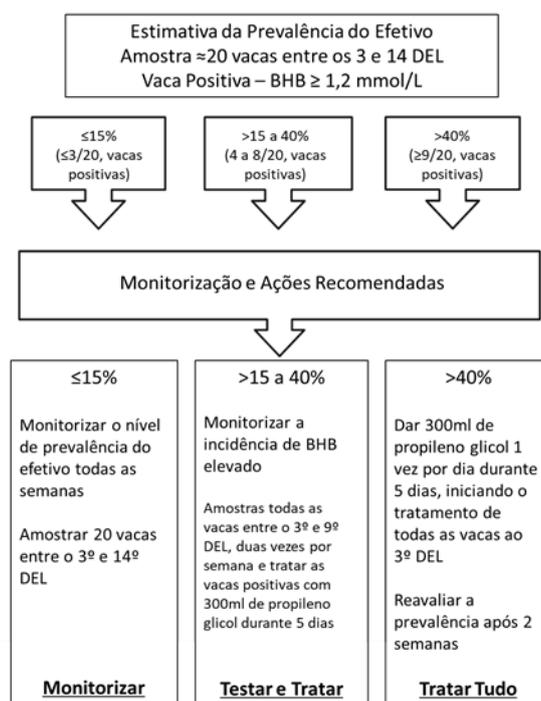


Figura 11 - Recomendações para a monitorização da concentração de BHB em efetivos de vacas de leite (Adaptado de Ospina *et al.*, 2013).

2.2.7 Células Somáticas

As células somáticas são glóbulos brancos, maioritariamente leucócitos (75 a 85%), e células epiteliais secretoras mortas. Existem sempre células somáticas na glândula mamária, mas, quando um microrganismo patogénico entra pelo do canal do teto e se multiplica provoca uma infeção originando a inflamação do parênquima da glândula e a danificação dos seus tecidos. Quando o sistema imunitário deteta que existe uma infeção intra-mamária, ocorre aumento do fluxo de glóbulos brancos para o úbere, assim como um aumento da morte e renovação das células epiteliais secretoras (Radostitis *et al.*, 2007c citado por Barros, 2010; Fonseca, 2010; Sharma *et al.*, 2011; Smith, 2009 citado por Marques, 2013; Cinar *et al.*, 2015).

Desta forma, a contagem de células somáticas (SCC) é um indicador viável, e largamente aceite, da ocorrência de infeções no úbere podendo ser utilizado para as monitorizar, assim como indicar o grau de intensidade da infeção, uma vez que a SCC aumenta com o aumento do número de quartos do úbere infetados, bem como com o aumento do fluxo de glóbulos brancos (Figura 12) (Paape *et al.*, 2002 citado por Dürr *et al.*, 2008; Dohoo & Meek, 1982 citado por Quist *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 1990 citados por Sharma *et al.*, 2011; Cinar *et al.*, 2015).

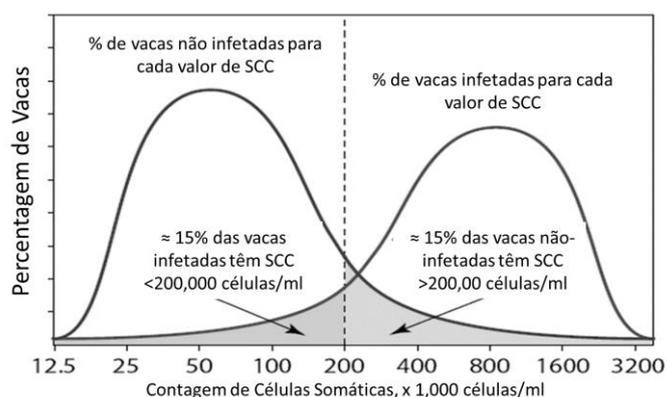


Figura 12 - Relação entre a SCC e o estado de infecção da glândula mamária (Adaptado de Sharm et al., 2011).

As infecções na glândula mamária provocam a diminuição da produção e alterações físicas, químicas e bacteriológicas do leite. Desta forma, estas infecções são um problema de bem-estar animal, de segurança alimentar (uma vez que um leite proveniente de um quarto de úbere infectado pode conter organismos patogénicos) e económico, não só devido ao anteriormente descrito, mas também devido aos custos de tratamento, ao aumento da possibilidade de a vaca ser refugada precocemente e à diminuição do preço de venda do leite (Dürr, 2008; Fonseca, 2010; Martins, 2011; Sharma *et al.*, 2011; Marcos, 2014; Cinar *et al.*, 2015).

Os transtornos metabólicos, como o NEB e a hipercetonémia, afetam a imunidade dos animais, particularmente os mecanismos de defesa do úbere, porque a elevada concentração de NEFA e corpos cetónicos no sangue afetam a capacidade dos leucócitos se multiplicarem e migrarem para o local da infecção. Deste modo, existe uma correlação negativa entre o NEB e a imunossupressão. A existência de lesões nos tetos e no úbere também promove o aumento da SCC e o desenvolvimento de infecções (Duffield *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2011; Alvarenga, 2013; McArt *et al.*, 2015; Suriyasathaporn *et al.*, 2010 citado por Zoche-Golob *et al.*, 2015).

A SCC no leite varia ao longo da lactação. Segundo Konjačić *et al.*, (2013), Martins (2011) e Dohoo & Meek, (1982) citado por Sharma *et al.*, (2011), a SCC aumenta, mesmo que o animal não esteja infectado (Tabela 33). De acordo com Amaral-Philips (s.d.f), o aumento da SCC no final da lactação, deve-se ao facto de a produção de leite ser menor, logo a concentração das células somáticas aumenta.

Tabela 33 - Variação da SCC ao longo da lactação (Adaptado Sharma *et al.*, 2011).

DEL	SCC (x 10 ³ células/mL)
0 – 49	380
50 – 99	429
100 – 149	498
150 – 199	399
200 – 249	452
250 – 299	445
>300	634

Reichmuth, (1975) citado por Sharma *et al.*, (2011) enunciam que a SCC é maior no final e no início da lactação, devido à resposta imunitária inata que ocorre antes e após o parto. Segundo Jensen & Eberhart, (1981) citados por Sharma *et al.*, (2011), caso o animal não tenha contraído nenhuma infecção durante o período seco, a SCC diminuiu para valores inferiores a 100×10^3 células/mL, durante 7 a 10 dias após o parto.

A SCC também aumenta com o aumento do **número de lactação** (Tabela 34) (Hojman *et al.*, 2004; Miglior *et al.*, 2006; Martins, 2011; Sharma *et al.*, 2011). Este aumento ocorre, principalmente, devido à prevalência de infecções em vacas com maior número de lactações (Harmon (1994, Blackburn, 1982 e Skrzypek *et al.*, 2004 citados por Sharma *et al.*, 2011).

Tabela 34 - Variação da SCC consoante a idade do animal (Adaptado Sharma *et al.*, 2011).

Idade do Animal	SCC (x 103 células/mL)
2	232
3	314
4	390
5	564
6	544
7	654
>7	868

Os resultados obtidos por Cinar *et al.*, (2015), também demonstram que a SCC é superior na segunda lactação, em comparação com a primeira (tabela 35). Inversamente, Quist *et al.*, (2008), referem que as diferenças dos resultados obtidos em vários estudos indicam que não existe um padrão definido da variação da SCC consoante o número e a fase de lactação.

A **frequência e o intervalo entre as ordenhas** influenciam a SCC no leite. Antes do início da ordenha a SCC é menor, e durante este processo as células somáticas aumentam de forma rápida e podem permanecer com valores elevados até 4 horas após o fim da ordenha. Em duas ordenhas consecutivas a SCC do mesmo animal pode variar 30%, e ao longo do dia pode variar mais de 40% (Amaral-Philips, s.d.f; Sharma *et al.*, 2011).

No estudo realizado por Quist *et al.*, (2008), em todos os efetivos, de 2 e 3 ordenhas, não houve uma variação diurna consistente, mas nos efetivos de 3 ordenhas, a SCC foi sempre menor nas ordenhas da manhã, estando de acordo com os resultados de estudos anteriores. Esta variação pode ser devido ao intervalo entre as ordenhas (Cullen, 1967 e Syrstad & Ron, 1978 citados por Quist *et al.*, 2008; Quist *et al.*, 2008).

Durante o verão, as **condições climáticas** são propícias ao aumento do número de agentes patogénicos, devido ao aumento da temperatura e humidade nas instalações. Este aumento proporciona também o aumento do stress térmico dos animais e conseqüentemente a diminuição das funções do sistema imunitário, levando ao aumento da SCC (Bodoh *et al.*, 1976 & Salsberg *et al.*, 1984 citados por Quist *et al.*, 2008; Harmon, 1994 e Khate & Yadav, 2010 citado por Sharma *et al.*, 2011). Por outro lado, Ng-Kwai-Hang *et al.*, (1984) citado por Quist *et al.*,

(2008), constataram que a SCC aumenta nos meses de inverno, resultado que pode ser atribuído ao facto de que neste estudo as vacas estarem em alojamento confinado durante o inverno e em pastagem no verão. Os resultados obtidos por Cinar *et al.*, (2015) também indicam que existe um aumento de SCC entre outubro e janeiro (meses frios) (Tabela 35).

Tabela 35 – Variação da SCC consoante o mês do ano (Adaptado de Cinar *et al.*, 2015).

Nº de Lactação	Mês									
	Junho	Julho	Ago.	Set.	Out.	Nov.	Dez.	Jan.	Fev.	Março
1	292,2	180,8	123,0	97,8	239,8	381,8	392,5	174,3	148,6	402,3
2	296,6	191,9	307,8	210,7	244,8	279,0	348,3	535,1	213,9	413,8

As **condições das instalações e dos equipamentos** da exploração, isto é o tipo de chão e as suas condições de higiene, o controlo e manutenção dos equipamento de ordenha, particularmente o vácuo das tetinas, as técnicas de ordenha e a sua higiene, assim como a educação dos colaboradores da exploração, entre outros, afetam de forma significativa a SCC e consequentemente o aparecimento de novas infeções, assim como a dificuldade de cura das infeções existentes (Amaral-Philips, s.d.f; DHIA, s.d.a; Yalçin *et al.*, 2010 citado por Cinar *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2011).

Devido ao facto da SCC ser influenciada por inúmeros fatores, e ter um grande impacto no bem-estar dos animais e na economia das explorações, este parâmetro deve ser monitorizado frequentemente. A monitorização mensal da SCC é um dos métodos mais eficazes para controlar e avaliar a ocorrência de infeções no úbere, sendo que os produtores não devem confiar apenas nos resultados de um único contraste (Quist *et al.*, 2008; Cinar *et al.*, 2015).

Na Tabela 36 estão descritos os valores a partir dos quais se considera que a SCC é indicativa da glândula mamária estar ou não infetada.

Tabela 36 – Definição do intervalo de valores da SCC, a partir dos quais se considera que o risco é baixo ou alto, de o animal estar sob a ocorrência de transtornos infecciosos.

Nível de Rico	SCC (x10 ³ células/mL)	Referência Bibliográfica
Baixo	< 50	Beaudeau, 2002; ICAR, 2016
	< 100	Jadhav <i>et al.</i> , 2016; Cinar <i>et al.</i> , 2015; Bytyqi <i>et al.</i> , 2010 citado por Sharma <i>et al.</i> , 2011; Hand <i>et al.</i> , 2012
	< 200	Borne <i>et al.</i> , 2011; Albaaj <i>et al.</i> , 2017a
	< 400	Hristova <i>et al.</i> , 2014
Baixo (Primíparas)	50 - 100	ICAR, 2016
Elevado	>100	Bytyqi <i>et al.</i> , 2010 citado por Sharma <i>et al.</i> , 2011
	> 150	Lavon <i>et al.</i> , 2011; Fuenzalida <i>et al.</i> , 2015
	> 200	DHIA, s.d.a; Borne <i>et al.</i> , 2011; International Dairy Federation, 1997 citado por Sharma <i>et al.</i> , 2011; Lomander <i>et al.</i> , 2013; Cinar <i>et al.</i> , 2015; ICAR, 2016; Jadhav <i>et al.</i> , 2016; Albaaj <i>et al.</i> , 2017a
	> 250	Beaudeau <i>et al.</i> , 2002; Berry <i>et al.</i> , 2007

Durante a análise da SCC deve-se ter em conta a SCC presente no tanque de leite, a percentagem de vacas com a SCC superior a 200 x10³células/mL, a percentagem de vacas com novas infeções e com infeções crónicas (Amaral-Philips, s.d.f; DHIA, s.d.a; Sharma *et al.*, 2011).

Entende-se por uma nova infecção, quando em dois contrastes consecutivos, há um aumento da SCC do primeiro para o segundo. Denomina-se infecção crónica, quando em dois contrastes consecutivos, o valor da SCC é elevado em ambos (DHI s.d.a).

Num efetivo, mais de 85% dos animais devem ter um valor de SCC inferior a 200×10^3 células/mL, ou menos de 5% dos animais com SCC superior a 1130×10^3 células/mL, sendo que as vacas com infeções intra-mamárias crónicas devem ser refugadas (Amaral-Philips, s.d.d; Amaral-Philips, s.d.f). O objetivo das explorações deve ser ter um maior número de animais com infeções intra-mamárias curadas do que novas infeções (DHIA s.d.a).

A avaliação da SCC do último contraste antes da secagem, e do primeiro contraste após o parto, permite avaliar a efetividade da secagem, período seco e manejo durante e após o parto, dado que o período seco é considerado um período de alto risco para o desenvolvimento de infeções intra-mamárias (Amaral-Philips, s.d.f; DHIA s.d.a; Barros, 2010).

Os dados do contraste leiteiro não devem ser utilizados exclusivamente para refugar as vacas que mais contribuem para a SCC do leite total da exploração, estes devem ser ferramentas para saber quais são as vacas que têm infeções intra-mamárias, como tal ajudar o produtor a solucionar o problema. A prevenção da ocorrência e do desenvolvimento de mastites é sempre mais económica do que o seu tratamento (Amaral-Philips, s.d.f).

2.2.8 Inter-Relação dos Parâmetros

Como referenciado nos pontos anteriores, a interpretação dos parâmetros do leite como instrumento de monitorização e alerta de possíveis alterações fisiológicas tem sido vastamente estudada na medida em que o leite é um fluido biológico, evitando assim métodos invasivos para obtenção destes parâmetros. Constata-se que o diagnóstico destas alterações fisiológicas é mais eficaz quando se equacionam os diversos parâmetros e os fatores determinantes, e não somente a análise individualizada. Assim, a bibliografia evidencia também a inter-relação dos vários parâmetros e fatores avaliados no leite e sangue.

Produção de Leite vs. Concentração de BHB, SCC, Concentração de MUN, Gordura e Proteína

A produção de leite total é influenciada negativamente pela concentração de BHB no sangue e leite (Oetzel, 2004; Roos *et al.*, 2007; Ehret *et al.*, 2015; Santaschi *et al.*, 2016; Vina *et al.*, 2016). Os animais com elevadas concentrações de **BHB** (com diagnóstico positivo de cetose clínica e subclínica) produzem menos leite do que animais com menores concentrações (Tabela 37). McArt *et al.*, (2012b) estimaram que, por cada aumento de 0,1mmol/L de BHB no sangue, no primeiro contraste realizado, a produção de leite diária dos primeiros 30 dias de lactação, diminui 0,5 kg/dia.

Vanholder *et al.*, (2015) verificaram que as vacas com cetose subclínica (BHB >1,2mmol/L) e clínica (BHB >3mmol/L) produzem mais 1,2 e 1,7kg de leite, respetivamente, no primeiro contraste após o parto, do que vacas saudáveis, indicando que as vacas mais produtoras têm uma maior predisposição para a ocorrência de cetoses subclínica e clínica.

Tabela 37 - Diferença da produção de leite consoante a concentração de BHB no sangue e leite (Adaptado de Duffield *et al.*, 1997, Jorge, 2009, LeBlanc, 2010, Raboisson *et al.*, 2014, Schwarz *et al.*, 2015 e Santschi *et al.*, 2016)

Nº de vacas	Produção de leite média (305DEL) (kg)	Nº de lactação	Concentração de BHB (mmol/L)	Semana da medição (nº)	Diferença da produção de leite		Referência Bibliográfica
					(kg)	(%)	
Sangue					Total (aos 305 dias)		
658	12200	Múltiparas	1	1ª e 2ª	-393	-3,2	Ospina <i>et al.</i> , 2010b
449		Primíparas	0,9		403	3,3	
997	7000 - 10000	Todas	1,4	1ª	-126	-1,48	Duffield <i>et al.</i> , 2009
			1,8		-333	-3,9	
			1,2	2ª	272	3,2	
			1,4		236	2,78	
650	12500	Primíparas	1,2	1ª e 2ª	-534	-4,3	Ospina <i>et al.</i> , 2010a
1022		Múltiparas	1		-358	-2,9	
		Todos	> 1,2			-25	Radostits <i>et al.</i> , 1994 e Geishauser <i>et al.</i> , 1998 citados por Jorge 2009
Sangue					Diária		
			1,2 – 1,4	1ª e 2ª	↓		LeBlanc, 2010
			1,6		-1,8		Duffield <i>et al.</i> , 1997 citado por Jorge, 2009
			1,8		-3		
			> 2		-4		
1110	34,61 35,58	Todas	> 1,4	1ª	-1,88	- 5,4	Duffield <i>et al.</i> , 2009
			> 2	2ª	-3,3	- 9,3	
1115	35	Todas	1,2 – 2,9	1ª e 2ª	-1,2 a -2,2	-3,4 a -6,3	McArt <i>et al.</i> , 2012b
Leite					Diária		
100		Todas	>= 0,2		- 2,4		Schwarz <i>et al.</i> , 2015
			>= 0,2		- 2,33		
			0,15 – 0,2		- 0,12		
498310		1ª, 2ª e >=3ª	>= 0,2	1ª		- 4,1	Santschi <i>et al.</i> , 2016
				2ª		- 5,1	
				3ª		- 6,7	
				4ª		- 8,1	
				5ª		- 8,8	

O valor de **SCC** a partir do qual a produção de leite começa a ser afetada deve ter em consideração a raça, número e fase de lactação em que os animais se encontram. A SCC é uma avaliação indireta da saúde da glândula mamária, desta forma a estimativa da diminuição da produção de leite, causada pela SCC, apresenta alguma dificuldade e não é consensual entre os autores (Tabela 38) (Dürr *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2011).

Tabela 38 - Diminuição da produção de leite diária consoante a SCC.

SCC (x10 ³ células/mL)	Diminuição da produção de leite (%/dia)	Referência Bibliográfica
403	- 2,1*	Yalçin <i>et al.</i> , 2000 citado por Cinar <i>et al.</i> , 2015
1097	-14,1*	
1900	-25,2*	
201 – 500	-2,67**	Cinar <i>et al.</i> , 2015
501 – 999	-5,35**	
≥ 1000	-12,26**	

*Em relação a animais com 198x10³ células/mL; **Em relação a animais com 200x10³ células/mL (primeira e segunda lactação)

A produção de leite diminui com o aumento da SCC desta forma o melhoramento para a produção de leite tem proporcionado um aumento da suscetibilidade para o desenvolvimento de mastites (Shook 1993 e Rogers *et al.*, 1998 citados por Sharma *et al.*, 2011; Cinar *et al.*, 2015). As raças de bovinos de leite mais produtoras são as que apresentam maior quantidade de SCC no leite, nomeadamente as raças Holstein Frísia e as Pardas Suíças (Sharma *et al.*, 2011).

No que se refere à relação entre a **MUN** e a produção de leite esta é positiva, não-linear e altamente significativa (Jonker *et al.*, 2001; Arunvipas *et al.*, 2003; Hojman *et al.*, 2004; Márquez, 2006; Meyer *et al.*, 2006; Konjačić *et al.*, 2010; Salamończyk & Guliński, 2015). No estudo realizado por Jilek *et al.*, (2006), a relação entre estes dois parâmetros é quadrática e positiva. Em concordância, a seleção genética para o aumento da produção de leite tende a aumentar a MUN, deste modo tem-se verificado que as vacas mais produtoras apresentam uma maior concentração de MUN (Carlsson *et al.*, 1995 citados por Arunvipas *et al.*, 2003; Trevaskis *et al.*, 1999 citado por Cabrita & Fonseca, 2004; Hossein-Zadeh *et al.*, 2011; Doska *et al.*, 2012). De acordo com DHIA (s.d.b.) e Godden *et al.*, (2001) citado por Cabrita & Fonseca, (2004), esta relação é positiva, possivelmente, devido ao facto das vacas mais produtoras ingerem uma maior quantidade de alimento para maximizar a produção de leite, entre os quais maior quantidade de alimentos proteicos.

Por cada aumento de 2000 kg de leite numa lactação de 305 dias, a **MUN** aumenta 3,3 mg/kg (Arunvipas *et al.* 2003) 28,5 mg/kg (Jonker *et al.*, 1998 citado por Cabrita & Fonseca, (2004) e 26 mg/kg (Jonker *et al.*, 1999 citado por Jilek *et al.*, 2006).

Rajala-Schultz *et al.*, (2003) citado por Jilek *et al.*, (2006) testaram a variação de **MUN** ao longo da lactação em 12 efetivos de baixa produção (média de produção de leite < 7,258 kg) e 12 efetivos de alta produção (média de produção de leite > 10,433 kg), verificando que a variabilidade de MUN entre contrastes é significativamente menor nos efetivos de alta produção, em comparação com os efetivos de menor produção. Esta tendência pode ser explicada pelo facto de nos efetivos de maior produção haver menor variabilidade das dietas alimentares. Pelo contrário, Godden *et al.*, (2001c) constataram que a média de MUN do efetivo não está associada à produção de leite.

A percentagem de **gordura e proteína** varia de forma inversa à produção de leite, mas a quantidade de gordura e proteína apresentam uma relação positiva com a quantidade de leite produzido (Silvestre *et al.*, 2003a; Nunes, 2004; Cue *et al.*, 1987 e Meyer, 1985 citado por Almeida, 2012).

Concentração de BHB vs. Gordura, Proteína, Relação G/P, Lactose, Concentração de MUN e SCC

O aumento da concentração de **BHB** nos fluidos corporais também influencia a composição do leite (Tabela 39) (Campos *et al.*, 2005; Roos *et al.*, 2007; Schwarz *et al.*, 2015).

Tabela 39 - Alterações na composição do leite consoante a concentração de BHB.

Concentração de BHB (mmol/L)	Gordura(%)	Proteína(%)	SCC(x10 ³ células/mL)	Concentração de MUN(mg/kg)	Lactose(%)	Referência Bibliográfica
> 0,2 (leite)	↑	↓	↑	↓		Schwarz <i>et al.</i> , 2015
> 0,1 (leite)	↑	↓		↑	↓	Roos <i>et al.</i> , 2007
> 1,2 (sangue)	↑	↓				Vanholder <i>et al.</i> , 2015
	↑	↓				Campos, 2005
	↑	↓				Duffield <i>et al.</i> , 2009

Durante o NEB a síntese de **gordura** na glândula mamária aumenta devido à maior quantidade de BHB e ácidos gordos em circulação, desta forma é expectável que vacas com hipercetonémia apresentem maiores teores de gordura no leite (Campos *et al.*, 2005). No estudo realizado por Santschi *et al.*, (2016), a percentagem de gordura foi maior em vacas com a concentração de BHB superior a 0,2 mmol/L. A diferença entre vacas com BHB maior 0,2 e menor 0,15 mmol/L foi 0,95% para todas as lactações. As vacas com a concentração de BHB entre 0,15 e 0,2 mmol/L apresentaram concentrações de gordura intermédias.

Existe uma relação positiva entre o balanço energético e a percentagem de proteína no leite (Grieve *et al.*, 1986 citado por Santschi *et al.*, 2016). Segundo Santschi *et al.*, (2016), a percentagem de **proteína** é menor em vacas com uma concentração de BHB entre 0,15 a 0,2 mmol/L e maior em vacas com BHB inferior a 0,15 mmol/L, em todas as lactações. A diferença entre vacas com BHB superior ou inferior a 0,15 mmol/L foi de 0,10, 0,05 e 0,05% para vacas em primeira, segunda e terceira ou maior lactação, respetivamente. Animais com uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L apresentaram percentagens de proteína intermédia. Segundo o mesmo autor, a quantidade de proteína foi também maior em vacas com BHB < 0,15mmol/L e menor em vacas com BHB > 0,2mmol/L, apresentando uma diferença de 0,09g/dia. Neste caso, as vacas com BHB entre 0,15 e 0,2mmol/L tiveram valores intermédios.

No estudo realizado por Duffield *et al.*, (2009), caso o animal na primeira semana de lactação tenha uma concentração de BHB no sangue superior a 2 mmol/L, a percentagem de proteína do leite diminuí 0,09% em valores absolutos, na segunda semana de lactação. Caso o

BHB no sangue seja superior a 1 mmol/L, a percentagem de proteína do leite diminuí 0,09% em valores absolutos.

Relativamente à relação **G/P**, Santschi *et al.*, (2016) refere que esta é maior em vacas com BHB superior a 0,2 mmol/L.

No estudo realizado por Santschi *et al.*, (2016), a concentração de **lactose e MUN** é menor em vacas com a concentração de BHB superior a 0,2 mmol/L, e maior em vacas com BHB inferior a 0,15, sendo que as vacas com BHB entre 0,15 a 0,2 apresentam valores intermédios de lactose e MUN. A diferença da concentração de MUN em vacas com BHB inferior a 0,15 e superior a 0,2mmol/L é 13, 15 e 1,7 mg/kg para vacas de primeira, segunda e terceira ou maior lactação, respetivamente.

Relativamente à **SCC**, o aumento da concentração de BHB nos fluidos corporais proporciona o aumento da concentração de SCC no leite, uma vez que a ocorrência de transtornos metabólicos diminui a eficiência do sistema imunitário (Santschi *et al.*, 2016; Vina *et al.*, 2016). Segundo LeBlanc (2010), a ocorrência de hipercetonémia durante as duas primeiras semanas após o parto aumenta a severidade e duração das infeções intra-mamárias. Koeck *et al.* (2014) indica que a seleção para uma menor concentração de BHB no leite no início da lactação proporciona a diminuição da SCC. Pelo contrário, Duffield *et al.*, (2009) e Suthar *et al.*, (2013) afirmam que não existe relação entre o aumento da concentração de BHB nos fluidos corporais e a ocorrência de infeções intra-mamárias.

SCC vs. Lactose, Gordura, Proteína e Concentração de MUN

A elevada SCC no leite também afeta a qualidade do leite produzido. Segundo Harmon (1994) citado por Sharma *et al.*, (2011), a elevada quantidade de células somáticas proporciona a diminuição da quantidade de **lactose, gordura e proteína** presentes no leite (Tabela 40).

Tabela 40 - Alterações na composição do leite consoante a SCC (Adaptado de Sharma *et al.*, 2011).

Constituintes do Leite	SCC (x 10 ³ células/mL)				Razão para a alteração
	<100	<250	500 – 1000	>1000	
	Diminuição (g/100mL)				
Lactose	4,90	4,74	4,60	4,21	Redução da Síntese
Caseína	2,81	2,79	2,65	2,25	
Gordura	3,74	3,69	3,51	3,13	

A redução da síntese, nomeadamente da lactose, ocorre devido à diminuição da integridade do tecido da glândula mamária (Lacasse citado por Santschi *et al.*, 2016). Segundo Haile-Mariam *et al.*, (2017), a correlação entre a SCC e a **lactose** é mais elevada quando as vacas estão em segunda e terceira lactação, no final da lactação e quando os níveis de SCC são mais elevados. Park *et al.*, (2007) citados por Haile-Mariam *et al.*, (2017) descrevem que a

percentagem de lactose em vacas com infeções intra-mamárias é significativamente mais baixa do que em vacas saudáveis.

A SCC e **MUN** apresentam uma relação negativa linear, sendo esta forte e estável ao longo da lactação (Arunvipas *et al.*, 2003; Johnson & Young, 2003; Hojman *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2006; Faust *et al.*, 1996 citado por Pimentel, 2011 e Konjačić *et al.*, 2013). De acordo com Litaca (1985) citado por Pimentel (2011), as vacas com o TCM (Teste Californiano de Mastites) positivo apresentam uma concentração de MUN mais baixa do que vacas com o TCM negativo.

Lactose vs. Gordura e Concentração de MUN

A lactose também está relacionada com a percentagem de gordura e com a concentração de MUN. A percentagem de **gordura** está inversamente relacionada com a lactose, porque a síntese de lactose é o fator que mais determina a taxa de osmolaridade das células epiteliais secretoras (Miglior *et al.*, 2006). Cao *et al.*, (2010) citado por Henao-Velásquez *et al.*, (2014) indicam que existe uma relação estatística significativa entre a percentagem de lactose e a **MUN**, mas Miglior *et al.*, (2006), constatou que esta relação apenas é significante em vacas de primeira lactação.

Concentração de MUN vs. Proteína e Gordura

A percentagem de **proteína** do leite apresenta uma relação negativa e não linear com a MUN (Godden *et al.*, 2001a; Fatehi *et al.*, 2002; Arunvipas *et al.*, 2003; Hojman *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2006; Konjačić *et al.*, 2010; Ferguson *et al.*, 1993 citado por Miranda 2014). Esta relação está dependente da eficiência da incorporação do azoto na proteína verdadeira do leite. Quando esta eficiência é maior, menor quantidade de MUN é excretada. (Márquez 2006; Jonker *et al.*, 1998 e Roy *et al.*, 2011 citados por Miranda 2014). Opostamente, de acordo com o Huhtanen *et al.*, (2015), a MUN aumenta com o aumento da quantidade de proteína do leite.

Quanto à relação entre a MUN e a percentagem de **gordura** do leite, não existe concordância entre os autores (Tabela 41).

Tabela 41 - Relação entre a concentração de MUN e a percentagem de gordura do leite.

Relação entre a MUN e a Gordura (%)	Referência Bibliográfica
Quadrática Negativa	Arunvipas <i>et al.</i> , 2003; Jilek <i>et al.</i> , 2006 Konjačić <i>et al.</i> , 2010
Negativa Não-Linear	Godden <i>et al.</i> , 2001a; Fatehi <i>et al.</i> , 2002; Johnson <i>et al.</i> , 2003; Meyer <i>et al.</i> , 2006
Positiva	Ferguson <i>et al.</i> , 1997 citado por Jilek <i>et al.</i> , 2006

A relação quadrática negativa descreve que a MUN é maior quando percentagem de gordura é média, e que a concentração de MUN é menor quando a percentagem de gordura é baixa ou alta.

Por último, a relação **P/G** apresenta uma forte correlação negativa com a percentagem de **gordura** no leite e uma correlação positiva fraca com a percentagem de **proteína** do leite (Vos & Groen, 1998 citados por Buttchereit *et al.*, 2010).

As correlações entre os parâmetros previamente mencionados segundo diversos autores podem ser observadas na Tabela 43. A correlação expressa a intensidade da associação entre duas variáveis, que pode ser negativa ou positiva, e os valores situam-se entre - 1 e + 1. O grau da associação é considerado baixo, moderado ou alto, consoante os valores do coeficiente de correlação (Tabela 42) (Almeida, 2012).

Tabela 42 - Grau de associação entre duas variáveis consoante o coeficiente de correlação (Adaptado de Almeida, 2012).

Grau da associação entre duas variáveis	Coeficiente de Correlação
Ausente	0
Baixo	0 – 0,35
Moderado	0,35 – 0,70
Alto	0,70 - 1

Tabela 43 - Coeficiente de correlação entre os parâmetros e fatores.

Parâmetros	Coeficiente de Correlação	Referência Bibliográfica	
Produção de Leite (kg/dia)	Gordura (%)	-0,362	Miglior <i>et al.</i> , 2007
		-0,31**	Konjačić <i>et al.</i> , 2013
		-0,305**	Arunvipas <i>et al.</i> , 2003
		-0,210***	Meyer <i>et al.</i> , 2006
		0,47	Hossein-Zadeh <i>et al.</i> , 2011
	Proteína (%)	0,05	Bendelja <i>et al.</i> , 2011
		-0,536**	Arunvipas <i>et al.</i> , 2003
		-0,52**	Miglior <i>et al.</i> , 2007; Konjačić <i>et al.</i> , 2013
		-0,423***	Meyer <i>et al.</i> , 2006
		-0,02	Bendelja <i>et al.</i> , 2011
	Relação G/P	0,33	Hossein-Zadeh <i>et al.</i> , 2011
		-0,038**	Meyer <i>et al.</i> , 2006
	Lactose (%)	-0,168	Miglior <i>et al.</i> , 2007
		-0,14	Hossein-Zadeh <i>et al.</i> , 2011
	Concentração de MUN (mg/kg)	0,05	Hossein-Zadeh <i>et al.</i> , 2011
0,252		Miglior <i>et al.</i> , 2007	
-0,031		Miglior <i>et al.</i> , 2007	
0,03		Hossein-Zadeh <i>et al.</i> , 2011	
0,13**		Konjačić <i>et al.</i> , 2013	
0,13***		Bendelja <i>et al.</i> , 2011	
SCC (x10 ³ células/mL)	0,173**	Arunvipas <i>et al.</i> , 2003	
	0,267***	Meyer <i>et al.</i> , 2006	
	0,34**	Doska <i>et al.</i> , 2012	
	-0,26**	Konjačić <i>et al.</i> , 2013	
	-0,251**	Cinar <i>et al.</i> , 2015	
	-0,083	Miglior <i>et al.</i> , 2007	
	0,11	Hossein-Zadeh <i>et al.</i> , 2011	

Tabela 43 - Coeficiente de correlação entre os parâmetros e fatores (continuação).

		0,29***	Bendelja <i>et al.</i> , 2011
		0,38	Hossein-Zadeh <i>et al.</i> , 2011
	Proteína (%)	0,44***	Konjačić <i>et al.</i> , 2013
		0,47	Miglior <i>et al.</i> , 2007
		0,476**	Arunvipas <i>et al.</i> , 2003
	Relação G/P	0,77	Vos & Groen, 1998 citados por Buttchereit <i>et al.</i> , 2010
		-0,168	Miglior <i>et al.</i> , 2007
	Lactose (%)	-0,14	Hossein-Zadeh <i>et al.</i> , 2011
		-0,13***	Bendelja <i>et al.</i> , 2011
		-0,117**	Arunvipas <i>et al.</i> , 2003
		-0,09**	Konjačić <i>et al.</i> , 2013
		0,014	Ferguson <i>et al.</i> , 1997 citado por Jilek <i>et al.</i> , 2006
	Concentração de MUN (mg/kg)	0,024**	Pimentel, 2011
		0,11**	Bendelja <i>et al.</i> , 2011
		0,13	Hossein-Zadeh <i>et al.</i> , 2011
		0,182	Miglior <i>et al.</i> , 2007
		0,04	Hossein-Zadeh <i>et al.</i> , 2011
	SCC (x10 ³ células/mL)	0,045	Miglior <i>et al.</i> , 2007
		0,103*	Cinar <i>et al.</i> , 2015
		0,11**	Konjačić <i>et al.</i> , 2013
		-0,18	Vos & Groen, 1998 citados por Buttchereit <i>et al.</i> , 2010
	Relação G/P	-0,248	Miglior <i>et al.</i> , 2007
		-0,14***	Bendelja <i>et al.</i> , 2011
	Lactose (%)	-0,07	Hossein-Zadeh <i>et al.</i> , 2011
		-0,745***	Jilek <i>et al.</i> , 2006
		-0,212**	Arunvipas <i>et al.</i> , 2003
		-0,06**	Konjačić <i>et al.</i> , 2013
		-0,002	Pimentel, 2011
	Concentração de MUN (mg/kg)	0,082	Miglior <i>et al.</i> , 2007
		0,14***	Bendelja <i>et al.</i> , 2011
		0,16	Hossein-Zadeh <i>et al.</i> , 2011
		0,08	Hossein-Zadeh <i>et al.</i> , 2011
	SCC (x10 ³ células/mL)	0,093	Miglior <i>et al.</i> , 2007
		0,21**	Konjačić <i>et al.</i> , 2013
		0,291*	Cinar <i>et al.</i> , 2015
		-0,17	Hossein-Zadeh <i>et al.</i> , 2011
	Concentração de MUN (mg/kg)	-0,072	Miglior <i>et al.</i> , 2007
		0,01	Bendelja <i>et al.</i> , 2011
		-0,4	Lefebvre <i>et al.</i> , 2002 citado por Miglior <i>et al.</i> , 2006
	Lactose (%)	-0,227	Miglior <i>et al.</i> , 2007
	SCC (x10 ³ células/mL)	-0,206**	Cinar <i>et al.</i> , 2015
		-0,15	Hossein-Zadeh <i>et al.</i> , 2011
		-0,1	Miglior <i>et al.</i> , 2007; Konjačić <i>et al.</i> , 2013
	Concentração de MUN (mg/kg)	0,005	Cinar <i>et al.</i> , 2015
	SCC (x10 ³ células/mL)	0,02	Hossein-Zadeh <i>et al.</i> , 2011
		0,51	Drift <i>et al.</i> , 2012
	Concentração de BHB (mmol/L)		Relação G/P

Tabela 43 - Coeficiente de correlação entre os parâmetros e fatores (conclusão).

Nº de Lactação	Produção de Leite (kg/dia)	0,168** 0,248***	Arunvipas <i>et al.</i> , 2003 Meyer <i>et al.</i> , 2006
	Gordura (%)	-0,013**	Arunvipas <i>et al.</i> , 2003
	Proteína (%)	-0,069**	Arunvipas <i>et al.</i> , 2003
	Concentração de MUN (mg/kg)	0,028**	Arunvipas <i>et al.</i> , 2003
DEL	Produção de Leite (kg/dia)	-0,606** -0,57** -0,2465***	Arunvipas <i>et al.</i> , 2003 Konjačić <i>et al.</i> , 2013 Meyer <i>et al.</i> , 2006
	Gordura (%)	0,228** 0,26**	Arunvipas <i>et al.</i> , 2003 Konjačić <i>et al.</i> , 2013
	Proteína (%)	0,563** 0,64**	Arunvipas <i>et al.</i> , 2003 Konjačić <i>et al.</i> , 2013
	Concentração de MUN (mg/kg)	-0,07*** -0,047**	Konjačić <i>et al.</i> , 2013 Arunvipas <i>et al.</i> , 2003
	SCC (x10 ³ células/mL)	0,19**	Konjačić <i>et al.</i> , 2013

Para finalizar, definiu-se os intervalos de valores, em que a percentagem de gordura e proteína, a relação G/P e a concentração de MUN são considerados baixos, normais ou altos (Tabela 44), assim como quais são os intervalos de valores em que se considera que não existe risco, que o risco é moderado ou que o risco é alto de o animais estar sob a ocorrência de transtornos metabólicos e/ou infecciosos (Tabela 45), tendo por base as Tabelas 8, 10, 12, 30 e 36).

Tabela 44 - Definição do intervalo de valores da percentagem de gordura, proteína, da relação G/P e da concentração de MUN, a partir dos quais se considera que os valores são baixos, normais ou altos.

Níveis / Parâmetros	Gordura (%)	Proteína (%)	G/P	MUN (mg/kg)
Baixo	< 3,20	< 3,00	< 1,00	< 100
Normal	3,20 – 4,50	3,00 – 3,20	1,00 – 1,40	100 – 300
Alto	> 4,50	> 3,20	> 1,40	> 300

Tabela 45 - Definição do intervalo de valores da concentração de BHB e da SCC, a partir dos quais se considera que o risco é baixo, moderado ou alto de o animal estar sob a ocorrência de transtornos metabólicos e/ou infecciosos.

Níveis / Parâmetros	BHB (mmol/L)	SCC (x10 ³ células/mL)
Baixo Risco	< 0,10	< 100
Moderado Risco	0,10 – 0,20	100 - 200
Alto Risco	> 0,20	> 200

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Neste trabalho utilizou-se os dados do contraste leiteiro nacional obtidos entre o dia 2 de janeiro de 2015 e 20 de março de 2017, de 27 explorações. As explorações, segundo a divisão territorial NUTS III, situam-se em 4 regiões do Alentejo, no Alentejo Central, Alentejo Litoral, Baixo Alentejo e Alto Alentejo (Figura 13).

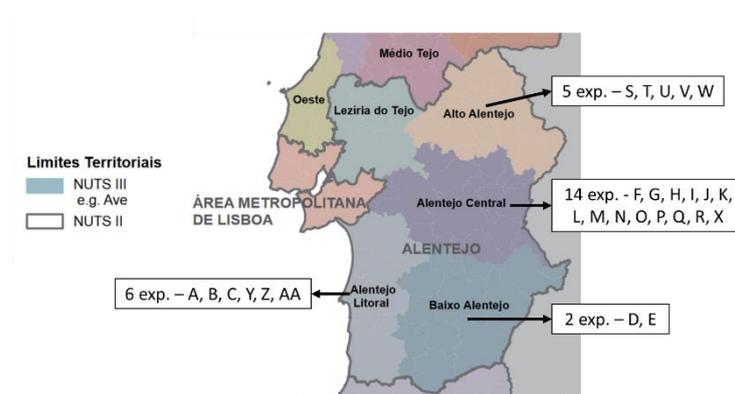


Figura 13 – Localização das explorações nas 4 regiões do Alentejo (Adaptado de INE, 2015).

Os dados do contraste leiteiro, por exploração, foram fornecidos em ficheiros de Excel (2013) pela Associação para o Desenvolvimento da Estação de Apoio à Bovinicultura Leiteira (EABL) (Anexo 3). O ficheiro compilado com todas as explorações apresenta 220776 linhas/registos, sendo que cada registo corresponde a um contraste por vaca.

3.2 MÉTODOS

Com base na bibliografia, os dados foram filtrados. Primeiramente, excluíram-se os contrastes que continham valores que se encontravam fora do intervalo de valores aceitável para cada variável (Tabela 46), posteriormente eliminaram-se as lactações com menos de 8 contrastes, obtendo-se um ficheiro com 110461 registos (50,03% dos registos eliminados), referentes a 9523 lactações.

Tabela 46 - Definição do intervalo de valores considerado aceitável para cada variável.

Variável	Intervalo de Valores	Referência Bibliográfica
Lactação Válida	≥ 240 dias de lactação – ≥ 8 contrastes	Portaria nº 1066/91 de 22 de outubro, 1991
Intervalo entre o Parto e o Primeiro Contraste (dias)	5 – 71	Portaria nº 1066/91 de 22 de outubro, 1991
Dias de Lactação (dias)	≤ 600	Arunvipas <i>et al.</i> , 2003; Konjačić <i>et al.</i> , 2010; Salamończyk & Guliński, 2015
Produção de Leite Diária (kg)	4 – 99	ICAR, 2016
Porcentagem de Gordura (%)	1,5 – 9	Silvestre <i>et al.</i> , 2003b; ICAR, 2016
Porcentagem de Proteína (%)	1 – 7	Silvestre <i>et al.</i> , 2003b; Doska <i>et al.</i> , 2012; ICAR, 2016; Weller <i>et al.</i> , 2016
Concentração de MUN (mg/kg)	10 – 500	Konjačić <i>et al.</i> , 2010; Doska <i>et al.</i> , 2012
SCC (x10 ³ células/mL)	6 – 30 000	Martins, 2011

Posteriormente, os dados filtrados foram compilados num único ficheiro de Excel (2013), que apresenta 14 variáveis (Anexo 4). De acordo com o tratamento estatístico utilizado, as variáveis são consideradas categóricas ou contínuas (Tabela 47).

Tabela 47 - Definição das categorias e códigos das variáveis.

Variável	Códigos	Categorias
Exploração	Exploração	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, X, W, X, Y, Z, AA
Fase da Lactação (dias)	Fase de Lactação (dias)	0 – 13; 14 – 27; 28 – 41; 42 – 55; 56 – 119; 120 – 179; 180 – 239; 240 – 299; ≥ 300
Dias de Lactação	DEL	contínua
Número de Lactação	Nº de Lactação	1, 2, 3, 4, ≥5
Número de Ordenhas em 24h	Nº de Ordenhas	2 ordenhas diárias, 3 ordenhas diárias, sistema voluntário de ordenha
Mês do Ano	Mês	1 (janeiro), 2 (fevereiro), 3 (março), 4 (abril), 5 (maio), 6 (junho), 7 (julho), 8 (agosto), 9 (setembro), 10 (outubro), 11 (novembro), 12 (dezembro)
Produção de Leite Diário (kg)	Produção de Leite (kg/dia)	contínua
Porcentagem de Lactose	Lactose (%)	contínua
Porcentagem de Gordura	Gordura (%)	contínua
Porcentagem de Proteína	Proteína (%)	contínua
Relação Gordura/Proteína	Relação G/P	contínua
Concentração de MUN (mg/kg)	Concentração de MUN (mg/kg)	contínua
Concentração de β-hidroxibutirato (mmol/L)	Concentração de BHB (mmol/L)	contínua
Contagem de Células Somáticas (x10 ³ células/mL)	SCC (x10 ³ células/mL)	contínua

3.2.1 Análise Estatística

Para o tratamento dos dados utilizaram-se as seguintes abordagens:

1. Análise descritiva;
2. Interpretação da distribuição dos dados através da análise de *boxplots*;
3. Correlação de Spearman;
4. Ajustamento de modelos lineares generalizados mistos (GLMM) para a concentração de BHB (modelo A) e ureia (modelo B).

A abordagem 1 e 3 foi efetuada através do programa informático SPSS *Statistics* 24.0. O ajustamento dos GLMM e os *boxplots* foram feitos com recurso ao programa *R Project*.

Em todas as abordagens utilizaram-se níveis de significância usuais, considerando os resultados significativo a 5% (sig=*), 1% (sig=**) e 0,1% (sig=***), nos resultados não significativos (sig=n.s.).

Boxplots

O principal objetivo da interpretação dos *boxplots* é a avaliação da distribuição dos dados. Estes permitem saber qual é o centro da distribuição (mediana), a sua dispersão (diferença entre o valor máximo e mínimo), quanto maior for a dispersão, maior é a variação dos dados, a simetria ou assimetria da distribuição (posição da linha mediana no retângulo) e a existência de *outliers* (pontos fora das linhas desenhadas).

O retângulo contém 50% das observações da amostra, e este representa a distância entre o primeiro e o terceiro quartil. Metade das observações são menores ou iguais à mediana e a restante metade é igual ou maior que esta. As linhas desenhadas representam 25% das menores e maiores observações (EDIT, 2013).

GLMM

O modelo A tem como resposta binária a concentração de BHB. Neste modelo, a concentração de BHB assume o valor de 0 quando é inferior ou igual a 0,2mmol/L, e assume o valor de 1 quando é superior a 0,2mmol/L. O modelo B tem como resposta binária a concentração de MUN. Neste modelo, a concentração de MUN assume o valor de 0 quando é inferior ou igual a 300mg/kg, e assume o valor de 1 quando é superior a 300mg/kg. Em ambos os modelos foi utilizada a função de ligação *logit*, e considerou-se o efeito aleatório do animal dentro do efeito da exploração.

Para ajustar os modelos A e B realizaram-se as seguintes etapas:

1. Seleção das variáveis explicativas, suas categorias, e categoria de referência, de acordo com a revisão bibliográfica (Tabela 48 e 49);

Tabela 48 – Variáveis explicativas, suas categorias, e categoria de referência do modelo A (BHB).

Variáveis Explicativas	Categorias	Categoria de Referência
Nº de Lactação	1; 2; 3; 4; ≥ 5	2
Fase de Lactação (dias)	5 – 41; 42 – 55; 56 – 119; 120 – 179; ≥180	42 – 55
Produção de Leite (kg/dia)	Contínuo	
Gordura (%)	< 4,5; ≥ 4,5	< 4,5
Relação G/P	< 1,4; ≥ 1,4	< 1,4
SCC (x10 ³ células/mL)	< 200; 200 – 399; ≥ 400	< 200

Tabela 49 - Variáveis explicativas, suas categorias, e categoria de referência do modelo B (MUN).

Variáveis Explicativas	Categorias	Categoria de Referência
Nº de Lactação	1; 2; 3; 4; ≥ 5	2
Fase de Lactação (dias)	5 – 41; 42 – 55; 56 – 179; ≥180	42 – 55
Produção de Leite (kg/dia)	Contínuo	
Proteína (%)	< 3; 3 – 3,2; > 3,2	3 – 3,2
Relação G/P	< 1,4; ≥ 1,4	< 1,4

2. Ajustamento de um modelo inicial, onde foram selecionadas todas as variáveis que se revelaram significativas na fase univariada;
3. Tendo em conta o modelo inicial, eliminou-se, de forma sucessiva e por ordem decrescente do valor P, todas as variáveis não significativas (valor $P > 0,05$);
4. Verificação da significância das variáveis que não foram incluídas no modelo inicial. Caso as variáveis excluídas sejam significativas na presença das variáveis que estão no modelo, são adicionadas a este;
5. Validação da forma funcional das variáveis contínuas. Aplicou-se o método dos polinômios fracionários em caso de não linearidade (utilizando como aproximação o modelo linear generalizado que considera independência entre observações).
6. Avaliação das interações que fazem sentido no âmbito dos objetivos do estudo (valor $P < 0,05$);
7. Realização da análise de resíduos.

Neste processo, a significância das variáveis e das interações foi testada recorrendo ao teste de razão de verosimilhanças. O critério utilizado para a comparação dos modelos foi o de Akaike.

Os GLMM, de resposta binária e com a função de ligação *logit*, podem possibilitar a interpretação dos resultados com maior facilidade, dado que, num modelo sem interações, a exponencial de um coeficiente é, simplesmente, a razão de chances ou razão de possibilidades.

A **razão de chances** ou **razão de possibilidades** (em inglês: odds ratio (**OR**)) é o quociente entre a possibilidade de um evento ocorrer num grupo e a possibilidade desse evento ocorrer noutro grupo. A possibilidade é o quociente entre a probabilidade de o evento ocorrer e a probabilidade do mesmo evento não ocorrer, no mesmo grupo. Exemplificando, se as probabilidades de um evento ocorrer, em cada grupo, forem p_1 (primeiro grupo) e p_2 (segundo grupo) obtém-se que:

1. A possibilidade de o evento ocorrer no primeiro grupo é $p_1/(1-p_1)$;
2. A possibilidade de o evento ocorrer no segundo grupo é $p_2/(1-p_2)$;
3. Desta forma, a razão de possibilidades é: $OR = (p_1 / (1-p_1)) / (p_2 / (1-p_2))$;

Quando a razão de possibilidades é igual a 1, indica que o evento estudado é igualmente provável ocorrer nos dois grupos. Quando a razão de possibilidades é maior que 1, indica que o

evento é mais provável ocorrer no primeiro grupo. Por último, quando a razão de possibilidades é menor que 1, indica que o evento é mais provável ocorrer no segundo grupo.

Por exemplo, supondo que uma amostra aleatória é constituída por 100 vacas na primeira lactação e 150 vacas na segunda lactação. Na primeira lactação existem 60 vacas com uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L, e na segunda lactação existem 50 vacas com a concentração de BHB superior a 0,2mmol/L. A possibilidade de uma primípara ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L é igual a $(60/100) / (40/100) = 60/40 = 3/2$ (usualmente diz-se 3 para 2 e representa-se por 3:2), enquanto que a possibilidade de uma vaca de segunda lactação ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L é igual a $(50/150) / (100/150) = 50/100 = 1/2$ (portanto, de 1 para 2 ou 1:2). Desta forma, a razão de possibilidades é igual a $(3/2) / (1/2) = 3$. Concluindo-se que as vacas da primeira lactação têm 3 vezes mais possibilidades de ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L do que as vacas de segunda lactação. Para que as diferenças encontradas sejam estatisticamente significativas a um nível α , o intervalo de confiança, de nível $1-\alpha$ para o OR, não pode conter o valor 1 (Zeger & Liang, 1998; Prentice & Zhao, 1991; Skrondal & Rabe-Hesketh, 2004; Pinheiro & Chao, 2006; Zuur *et al.*, 2009; Bates, 2010; Hardin&Hilbe, 2013; Finch *et al.*, 2014; R Core Team 2017).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE DESCRITIVA DA AMOSTRA

Considerando o número de explorações (27) e lactações válidas (9523) anteriormente mencionadas, a Figura 14 apresenta o número de animais por exploração, e a Figura 15 o número de animais por número de lactação e por número de ordenhas diárias.

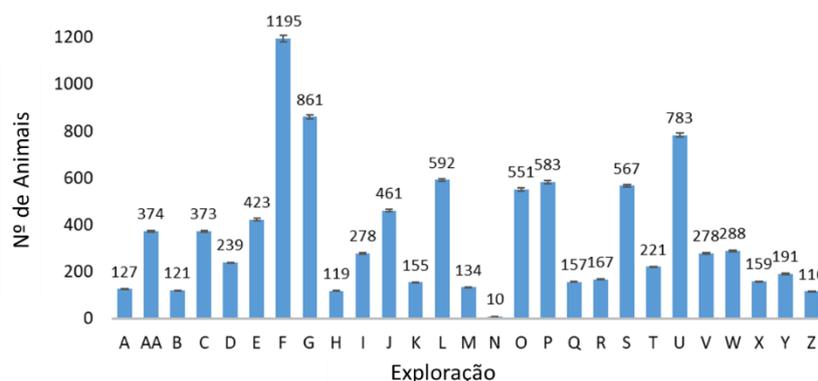


Figura 14 - Número de animais por exploração

A média de animais por exploração é 353 ± 270 , demonstrando que as explorações amostradas são de grandes dimensões. Contudo, o número de animais por exploração é muito variável, dado que existem 11 explorações com menos de 200 animais, 7 explorações entre 200 a 400 animais, 6 explorações entre 400 a 600 animais e 3 explorações com mais de 600 animais (Anexo 6).

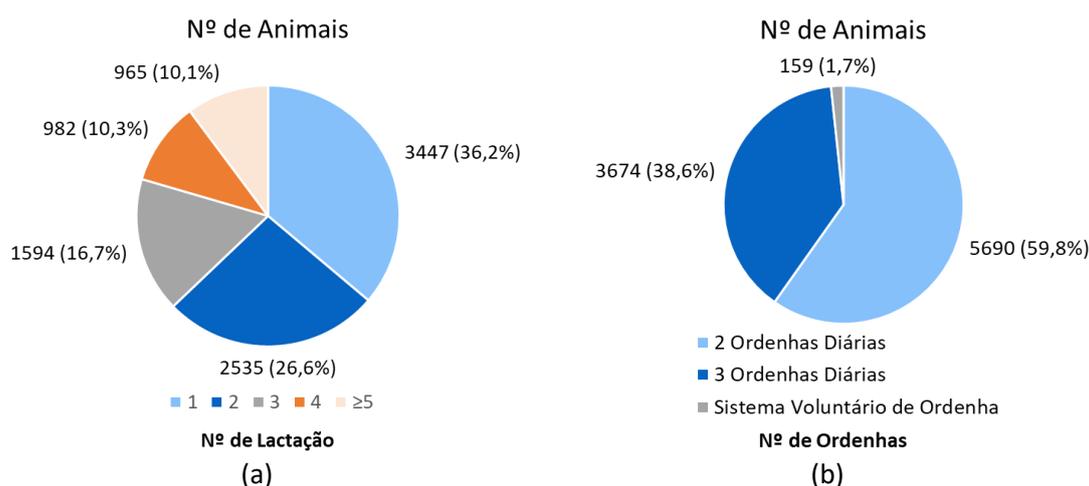


Figura 15 – Número de animais por número de lactação (a) e por número de ordenhas diárias (b).

Tendo em conta a Figura 15 (a), constata-se que o número de animais diminuiu com o aumento da lactação. A primeira lactação é a que apresenta uma maior proporção, com 36,2% dos animais, apenas 10,1% têm cinco ou mais lactações. Efetuando uma análise comparada às recomendações de Consultpec (2012) e Bexiga (2014) verifica-se que a estrutura do efetivo da

região amostrada está de acordo com a estrutura desejável de uma exploração leiteira, em que o número de animais na primeira lactação deve corresponder a 33% do número total de animais, e a percentagem de animais com mais de cinco lactações não deve ser superior a 10%.

Em relação à frequência de ordenha (Figura 15 (b)), verifica-se que apenas existe uma exploração que utiliza o sistema voluntário de ordenha, a exploração X, que corresponde a 1,7% dos animais. Aproximadamente 60% dos animais são ordenhados duas vezes num período de 24h, salientando-se, contudo, que 38,6% dos animais efetuam 3 ordenhas diárias.

O número médio de dias de lactação é $177,63 \pm 107,80$, desta forma pode concluir-se que existe uma equidade de distribuição de partos ao longo do ano, mas que esta é ligeiramente superior ao aconselhado por Rodrigues *et al.*, (2012) e Bexiga, (2014) que indicam que o número médio de dias de lactação deve estar entre os 150 a 175 dias e nunca ser superior a 180 dias.

Na Tabela 50 pode observar-se a análise descritiva de todos os parâmetros analisados.

Tabela 50 - Análise descritiva da quantidade e qualidade do leite dos animais contrastados nas 4 regiões do Alentejo.

Parâmetros	Média \pm DP	Mediana	CV (%)	Variância	Min.	Max.
Produção de Leite (kg/dia)	35,08 \pm 9,8	34,10	27,94	96,12	4,2	83,5
Lactose (%)	4,88 \pm 0,25	4,90	5,12	0,06	1,12	5,69
Gordura (%)	4,16 \pm 1,09	4,09	26,20	1,20	1,50	9,00
Proteína (%)	3,37 \pm 0,39	3,33	11,57	0,16	1,04	6,62
Relação G/P	1,24 \pm 0,32	1,21	25,80	0,10	0,37	3,69
Concentração de MUN (mg/kg)	241,67 \pm 68,34	238	28,28	4670	11	500
Concentração de BHB (mmol/L)	0,057 \pm 0,08	0,04	140,35	0,01	0,00	3,42
Ln(BHB)	-2,92 \pm 0,84	-2,81		0,77	-4,61	1,23
SCC ($\times 10^3$ células/mL)	253,80 \pm 770,17	74	303,46	593156	6	25203
Ln(SCC)	4,52 \pm 1,31	4,36		1,72	1,79	10,13

A produção de leite diária média é $35,08 \pm 9,8$ kg, o que representa, de forma aproximada, uma produção de 10699kg de leite aos 305 dias de lactação. Este valor é superior aos 9497kg de leite produzidos, em média, aos 305 dias de lactação em Portugal, no ano de 2016 (ANABLE, 2016).

A média da percentagem de proteína ($3,37 \pm 0,39\%$) e gordura ($4,16 \pm 1,09\%$) também é superior à média obtida em Portugal, aos 305 dias de lactação, no ano de 2016, que apresentou 3,22% de proteína e 3,63% de gordura (ANABLE, 2016). Das 27 explorações contrastadas nas 4 regiões do Alentejo, apenas a exploração A ($3,51 \pm 0,80\%$) e X ($3,37 \pm 0,83\%$) apresentaram uma percentagem de gordura média inferior à média nacional de 2016 (3,63%). Assim como a exploração A ($3,18 \pm 0,37\%$), X ($3,16 \pm 0,33\%$) e Y ($3,21 \pm 0,45\%$) foram as únicas que tiveram uma percentagem de proteína média inferior à média de 2016 (3,22%).

A mediana da percentagem de gordura, proteína e, consequentemente a relação G/P, encontram-se no intervalo de valores considerados normais (vide Tabela 8, 10 e 12). A mediana

da percentagem de lactose também está de acordo com os valores considerados normais pela bibliografia (Tabela 5).

O valor médio da SCC é superior ao desejável, pois deve ser inferior a 200×10^3 células/mL. A média da concentração de MUN obtida apenas é considerada normal para Bastin *et al.*, (2009), Salamończyk & Guliński, (2015) e Albaaj *et al.*, (2017b), sendo considerado um valor elevado para os restantes autores (Tabela 24).

Por último, a média da concentração de BHB, segundo a Tabela 31, indica que os animais contrastados nas 4 regiões do Alentejo apresentam um baixo risco de estarem sob a ocorrência de transtornos metabólicos, dado que este valor é inferior a 0,1mmol/L.

Verificou-se que os parâmetros que apresentam maior coeficiente de variação são a SCC e a concentração de BHB. O valor médio da concentração de BHB é idêntico à sua mediana, mas SCC apresenta uma elevada diferença entre a média e a mediana, indicando que a distribuição dos dados não é simétrica.

Por fim, a percentagem de proteína apresenta uma menor variação do que a gordura, estando de acordo com Amaral-Philips (s.d.e), que refere que a percentagem de gordura de cada animal apresenta uma maior variação do que a percentagem de proteína.

4.2 QUANTIDADE E QUALIDADE DO LEITE: VARIAÇÃO POR EXPLORAÇÃO, AO LONGO DA LACTAÇÃO, NÚMERO DE LACTAÇÃO, NÚMERO DE ORDENHAS DIÁRIAS E AO LONGO DO ANO

Devido ao facto de os parâmetros analisados apresentarem um elevado grau de variabilidade, não serem independentes, e não verificarem os pressupostos da normalidade e homocedasticidade, a análise dos dados foi efetuada através da interpretação de *boxplots*, que descrevem a variação das observações consoante as diferentes explorações, fase e número de lactação, número de ordenhas e mês do ano.

Realizou-se também o ajustamento dos GLMM para a concentração de BHB e MUN, porque possibilitam interpretar os resultados com maior facilidade através da razão de possibilidades (*odds ration* (OR)).

4.2.1 Produção de Leite Diária e Percentagem de Lactose

A variação da produção de leite diária e da percentagem de lactose, por **exploração**, pode ser observada na Figura 16 (a) e (b).

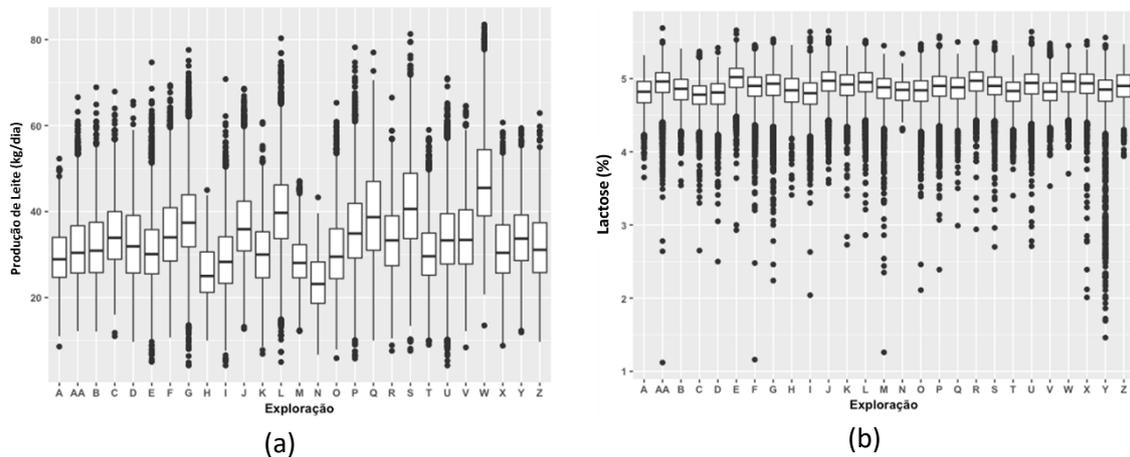


Figura 16 - Variação da produção de leite diária (a) e da percentagem de lactose (b), consoante a exploração.

De acordo com a Figura 16 (a), verifica-se que a produção de leite varia de forma relevante entre as 27 explorações. Deve salientar-se também, que a produção de leite mais elevada se encontra na exploração W, com 288 animais, onde aproximadamente 75% dos animais têm uma produção superior a 40kg/dia. As explorações H e N são as que apresentam menor produção, sendo que 75% dos animais tem uma produção inferior a 30 kg/dia, estas explorações são também as que apresentam maior percentagem de animais com uma produção inferior a 20kg/dia (Anexo 7).

Relativamente à percentagem de lactose (Figura 16 (b)), pode constatar-se que este parâmetro apresenta uma pequena variação por exploração e uma pequena dispersão, pois a distância interquartil é pequena. Neste parâmetro, verifica-se também uma grande quantidade de *outliers* inferiores a 4,5%. Embora, a variação da percentagem de lactose esteja associada à variação da produção de leite, verifica-se que a variação deste não é tão acentuada, o que está em concordância com Heano-Velásquez (2014) (Anexo 7).

Consoante a **fase de lactação**, existem diferenças relevantes na produção de leite diária (Figura 17 (a)). Mas, existem pequenas diferenças entre as medianas da percentagem de lactose, assim como a sua dispersão (Figura 17 (b)).

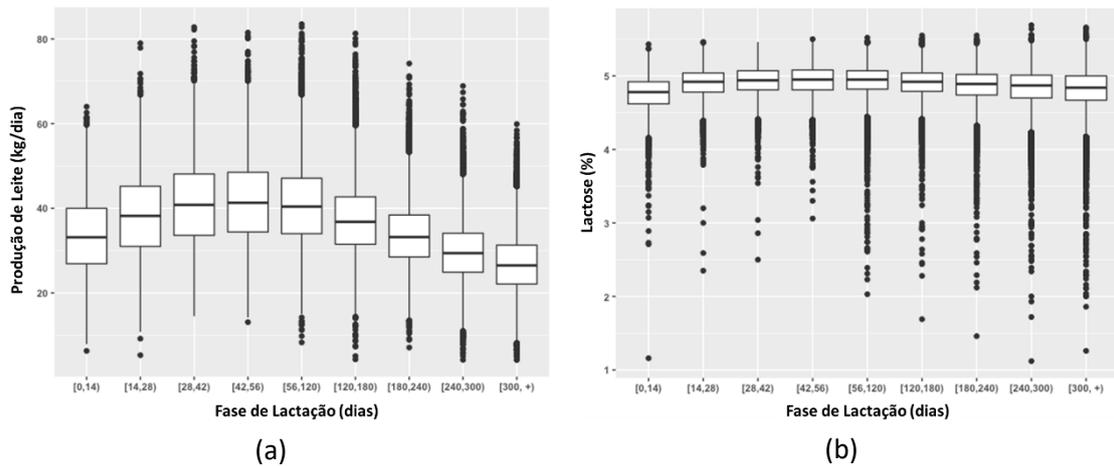


Figura 17 - Variação da produção de leite diária (a) e da percentagem de lactose (b), consoante a fase de lactação.

Tendo em conta a Figura 17 (a), constata-se que a produção de leite regista um aumento até aos 55 DEL. Entre o 28 e o 119 DEL, a produção mantém-se elevada, ocorrendo o pico de lactação entre o 42 e o 55 DEL. Nesta fase, 50% das observações apresentam produções de leite superiores a 40kg/dia. O intervalo de tempo em que ocorre o pico de produção está de acordo com McAllister, (s.d.a), Nunes, (2004), Castro *et al.*, (2009) e Martinez, (2010), que indicam que este ocorre entre a 4ª e 8ª semana. Posteriormente, a produção de leite diminui até à interrupção da secreção láctea, estando conforme o descrito por Amaral-Philips, (s.d.e.) e Nunes, (2004). Pode realçar-se também, que a maior dispersão de valores se verifica até ao 120 DEL, refletindo a diferença de produção que existe entre os animais (Anexo 11).

Apesar da pequena variação da percentagem de lactose (Figura 17 (b)), observa-se que esta aumenta até ao 27 DEL e mantém-se aproximadamente constante entre o 28 e o 119 DEL, coincidindo o pico da produção de leite. Posteriormente, diminui de forma progressiva até ao fim da lactação. Esta variação segue o modelo de variação apresentado por Miglior *et al.*, (2006) (Anexo 11).

A produção de leite diária e a percentagem de lactose apresentam uma pequena variação consoante o número de lactação (Figura 18 (a) e (b)).

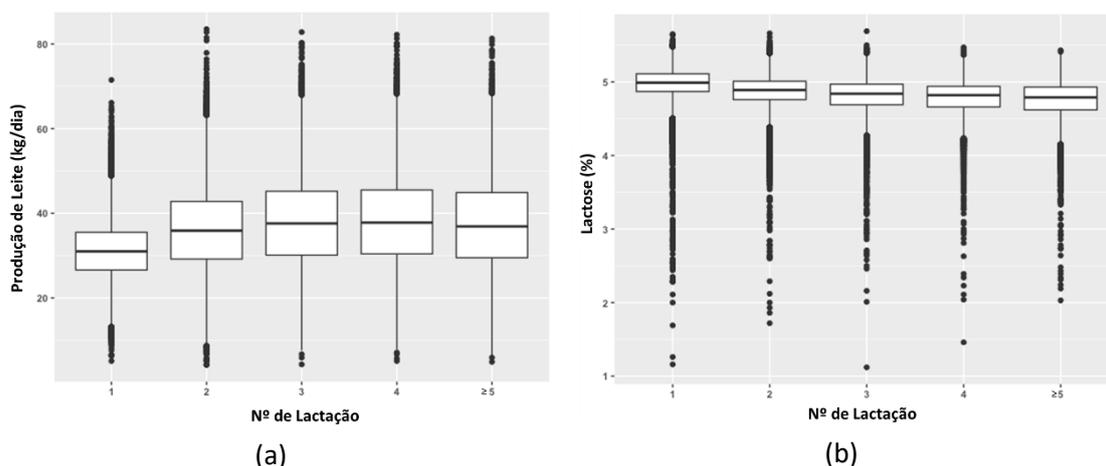


Figura 18 - Variação da produção de leite diária (a) e da percentagem de lactose (b), consoante o número de lactação.

Contudo, constata-se que as primíparas são os animais que apresentam menor produção de leite e menor dispersão de valores, estando de acordo com Amaral-Philips (s.d.e.), Silvestre *et al.*, (2005) e Weller *et al.*, (2016). As produções de terceira e quarta lactação são um pouco superiores às restantes, correspondendo aos resultados esperados. Estes resultados estão de acordo com Silvestre *et al.*, (2005), Hojman *et al.*, (2004) e Yazgan *et al.*, (2010) citado por Bendelja *et al.*, (2011), pois estes autores enunciam que a lactação mais produtiva é a terceira. Pelo contrário, este resultado não é concordante com Bendelja *et al.*, (2011), que indicam que os animais de primeira e segunda lactação produzem uma maior quantidade de leite do que os de quarta e quinta lactação (Anexo 15).

A percentagem de lactose apresenta uma ligeira tendência de diminuição com o aumento do número de lactação. Este resultado pode estar associado a um maior aumento da quantidade de leite, comparativamente ao aumento da quantidade de lactose, que origina uma menor percentagem. Este resultado está de acordo com Miglior *et al.*, (2006) e é oposto ao obtido por Bendelja *et al.*, (2011) e Henao-Velásquez *et al.*, (2014), que indicam que não existem diferenças entre as lactações (Anexo 15).

Considerando o **número de ordenhas diárias**, verifica-se que a produção de leite varia de forma relevante (Figura 19 (a)), mas que a percentagem de lactose praticamente não é influenciada por este fator (Figura 19 e Anexo 19).

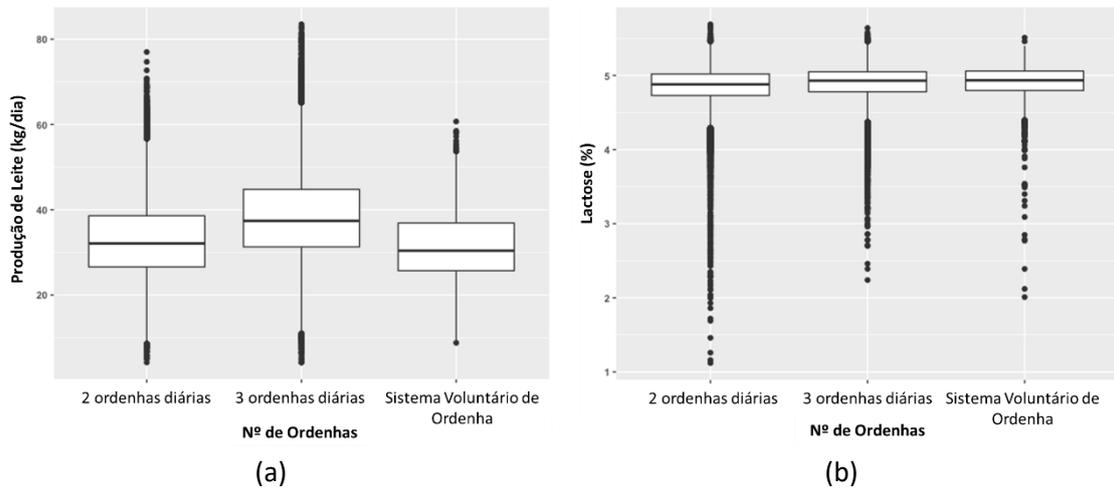


Figura 19 - Variação da produção de leite diária (a) e da percentagem de lactose (b), consoante o número de ordenhas diárias.

Segundo a Figura 19 (a), verifica-se que a realização de três ordenhas diárias proporciona uma maior produção de leite comparativamente à realização de duas ordenhas, o que seria de esperar, embora este aumento seja ligeiramente inferior ao mencionado por Nunes, (2004). Contrariamente ao esperado, o sistema voluntário de ordenha é o que apresenta menor produção de leite, apesar da diferença de produção em relação às duas ordenhas diárias seja pequena. Este resultado pode ocorrer devido ao facto de apenas existir uma exploração com o sistema voluntário de ordenha, esta exploração pode ter uma produção média baixa e/ou este sistema não garante que os animais tenham uma elevada frequência de ordenha. Esta situação pode dever-se a uma gestão incorreta da exploração ou à inadequada funcionalidade do estábulo (Anexo 19).

Por último, ao **longo do ano**, a variação da produção de leite apresenta diferenças consideráveis, mas a percentagem de lactose demonstra apenas uma ligeira variação (Figura 20 (a) e (b)).

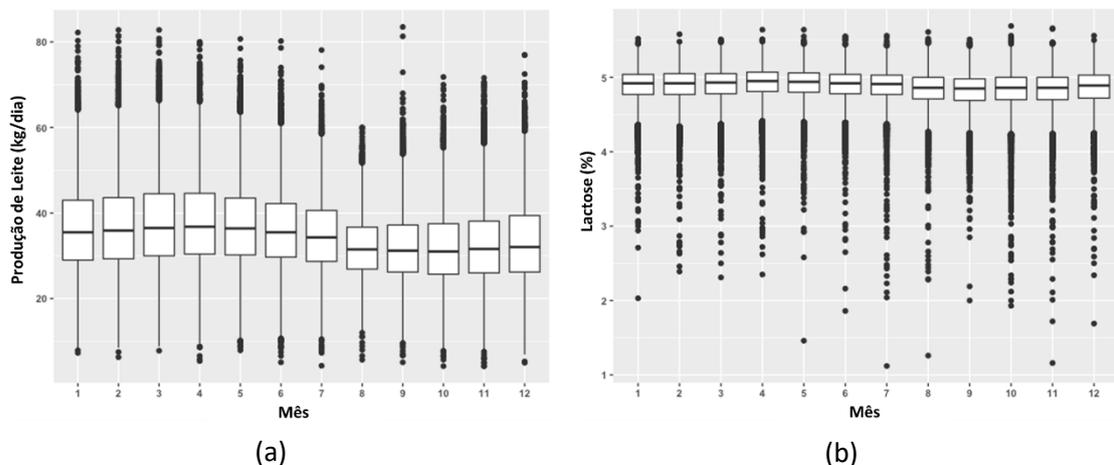


Figura 20 - Variação da produção de leite diária (a) e da percentagem de lactose (b) ao longo do ano.

A maior produção de leite (Figura 20 (a)), ocorre entre janeiro e junho e a menor produção entre agosto e outubro, sensivelmente. Todavia, Silvestre et al., (2004) verificaram que, na região do Minho, as maiores produções se prolongam até julho, o que é compreensível, considerando as condições edafo-climáticas da região. Estes resultados são parcialmente contrários ao estudo realizado na Croácia, por Bendelja et al., (2011), que registaram as maiores produções de leite no outono e inverno, mas justificáveis tendo em conta as práticas de manejo alimentar efetuadas ao longo do ano. Deve salientar-se também, que o mês em que ocorre a menor produção (agosto) é o que apresenta menor dispersão de valores realçando que, neste mês, praticamente todos os animais diminuem a sua produção diária. As baixas produções observadas nos meses de agosto e setembro podem estar associadas ao stress térmico dos animais (Anexo 23).

No que concerne à variação da percentagem de lactose (Figura 20 (b)), apesar de pequena, constata-se que a menor percentagem ocorre em agosto e setembro. Estes resultados vão ao encontro da variação da produção de leite e de Henao-Velásquez et al., (2014) e Miglior et al., (2006) (Anexo 23).

A correlação de Spearman entre a produção de leite e a percentagem de lactose é significativa e baixa (0,087), o que pode explicar os resultados anteriormente apresentados. Esta correlação é superior à obtida por Meyer *et al.*, (2006), Bendelja *et al.*, (2011) e Hossein-Zadeh *et al.*, (2011) e inferior à de Miglior *et al.*, (2007) (Anexo 5).

4.2.2 Percentagem de Gordura, Proteína e a Relação G/P

Na Figura 21 (a), (b) e (c) observa-se as variações da percentagem de gordura, proteína e a relação G/P entre as explorações amostradas.

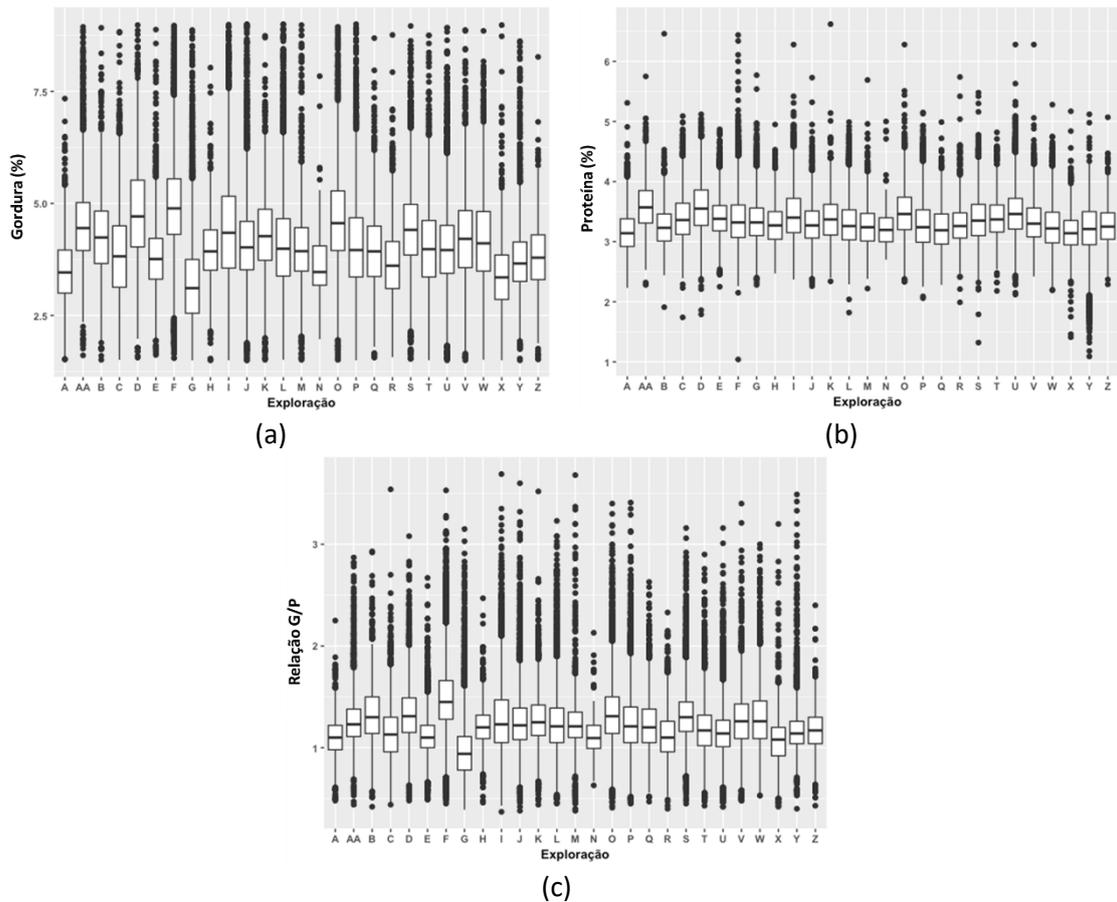


Figura 21 - Variação da percentagem de gordura (a), proteína (b) e da relação G/P (c), consoante a exploração.

Considerando a Figura 21, observa-se que a variação das medianas e da dispersão da percentagem de gordura são superiores à da percentagem de proteína e da relação G/P. Este resultado está de acordo com o esperado porque a percentagem de gordura é o parâmetro da composição de leite que mais varia. Do mesmo modo, é a percentagem de proteína que apresenta uma menor quantidade de *outliers*.

Tendo em conta a Figura 21 (a), constata-se que as explorações que apresentam maiores percentagens de gordura são a D e F, e a menor é a exploração G. Na exploração F, sensivelmente 50% das observações apresentam valores superiores a 5%. Em relação à percentagem de proteína (Figura 21 (b)), as explorações que apresentam maiores valores são a AA e D, e o menor é a exploração X (Anexo 8).

Por último, a tendência de variação da relação G/P (Figura 21 (c)), é semelhante à da percentagem de gordura, pois os maiores valores encontram-se nas explorações B, D, F e O, e o menor na exploração G. Na exploração G, mais de metade das observações têm uma relação G/P inferior a 1 (Anexo 9).

Relativamente à variação destes três parâmetros ao longo da lactação, verificou-se uma elevada variação da percentagem de gordura e proteína e uma ligeira variação da relação G/P (Figura 22 (a), (b) e (c)).

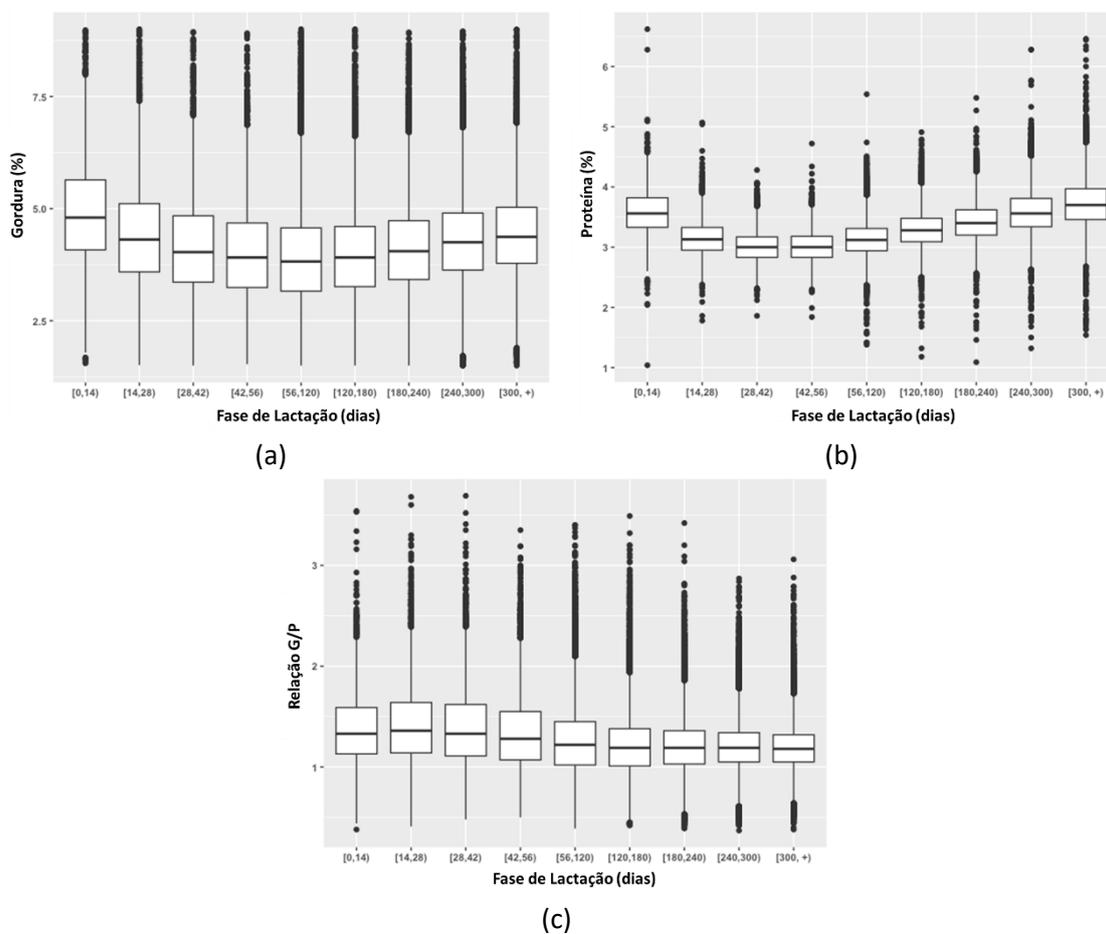


Figura 22 - Variação da percentagem de gordura (a), proteína (b) e da relação G/P (c), consoante a fase de lactação.

De acordo com a Figura 22 (a), a percentagem de gordura diminui até aos 119 DEL, sendo que a menor percentagem ocorre entre os 56 e 119 DEL. Posteriormente, este parâmetro aumenta até à interrupção da secreção láctea. Comparando com a variação da produção de leite ao longo da lactação, verifica-se que estas variam em sentido contrário, dado que a percentagem de gordura diminui e apresenta os menores valores quando a produção de leite aumenta e têm os valores mais elevados. Esta variação é semelhante à descrita por Weller *et al.*, (2016), que obteve os menores valores entre os 50 e 100 DEL e à de Silvestre *et al.*, (2003b), mas este indica que os menores valores ocorrem mais precocemente, entre os 50 e 65 DEL (Anexo 12).

A percentagem de proteína tem uma variação idêntica à da percentagem de gordura (Figura 22 (b)), mas atinge os menores valores mais cedo, entre os 28 e 55 DEL (nesta fase 50% das observações apresentam valores inferiores a 3%). Após esta fase, este parâmetro também aumenta até ao final da lactação. Esta variação está de acordo com Silvestre *et al.*, (2003b) e Weller *et al.*, (2016), que enunciam que a menor percentagem ocorre entre os 30 e 57 DEL. No entanto, difere de Dias, (2006), que declara que após os 30 DEL a percentagem de proteína aumenta (Anexo 12).

A relação G/P varia de forma inversa à percentagem dos parâmetros anteriormente mencionados (Figura 22 (c)). Esta relação atinge os maiores valores entre os 5 e 41 DEL, sendo justificada pelo facto de a percentagem de proteína diminuir mais rapidamente do que a de gordura. Posteriormente, a percentagem de proteína aumenta e a gordura mantém-se em valores baixos, o que faz com que a relação G/P diminua até aos 179 DEL. Após esta fase, a relação G/P mantém-se relativamente constante até à interrupção da secreção láctea. Esta variação não está de acordo com Cejna & Chládek, (2005) e Buttchereit *et al.*, (2010), que indicam que a relação G/P diminui até aos 170 dias de lactação e depois aumenta. Deve-se realçar que, até aos 55 DEL, sensivelmente 25% das observações apresentam uma relação G/P superior a 1,5 (valor superior ao indicativo da ocorrência de transtornos metabólicos / infecciosos) (Anexo 13).

A variação da percentagem de gordura, proteína e da relação G/P, consoante o **número de lactação**, encontra-se na Figura 23 (a) e (b) e (c).

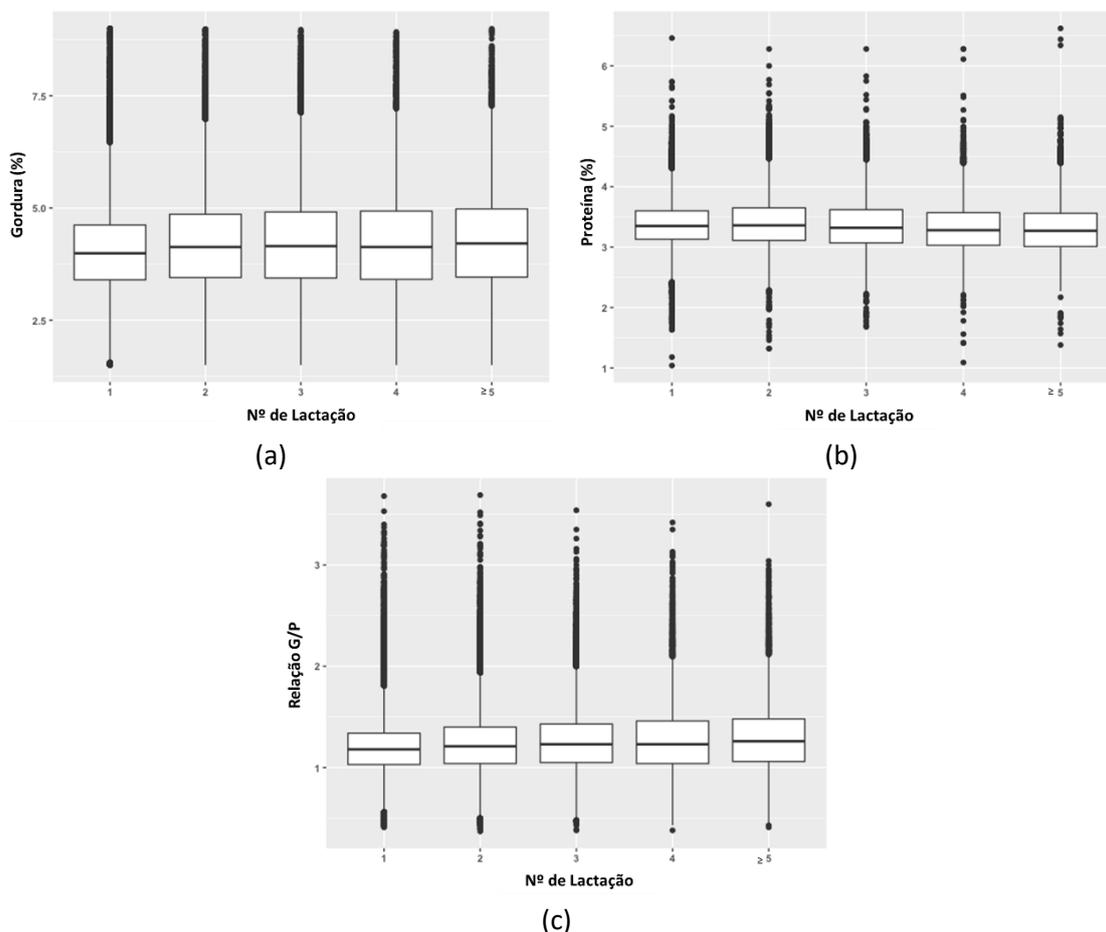


Figura 23 - Variação da percentagem de gordura (a), proteína (b) e da relação G/P (c), consoante o número de lactação.

Tendo em conta a Figura 23 (a), constata-se que a primeira lactação é a que apresenta menor percentagem de gordura. Os animais de quinta lactação ou superior são os que apresentam maior percentagem, mas esta não varia, de forma relevante, das restantes

multíparas. Este resultado é contrário ao esperado, uma vez que a primeira lactação é a que apresenta menor produção de leite logo, era previsível que a percentagem de gordura, nesta lactação, fosse superior às restantes devido ao efeito do fator de diluição. Este resultado está de acordo com Buttchereit *et al.*, (2010), que referem que a percentagem de gordura aumenta com o aumento do número de lactações. Opondo-se a Bendelja *et al.*, (2011) que enunciam que a primeira lactação tem maior percentagem de gordura do que a segunda e terceira, assim como de Hojman *et al.*, (2004) e Miglior *et al.*, (2006), que referem que a percentagem de gordura diminui com o aumento do número de lactações (Anexo 16).

A percentagem de proteína apresenta a maior mediana na primeira e segunda lactação, e tem uma ligeira tendência de diminuição com o aumento do número de lactação (Figura 23 (b)). Este resultado está de acordo com a variação da produção de leite (menor produção de leite, maior percentagem de proteína). Este resultado não é concordante com o obtido por Bendelja *et al.*, (2011), que afirmam que a percentagem de proteína aumenta com o aumento do número de lactações, mas está de acordo com Silvestre *et al.*, (2003b) e Miglior *et al.*, (2006), que indicam que a proteína diminui com o aumento do número de lactação (Anexo 16).

Por último, segundo a Figura 23 (c), a relação G/P tende a aumentar com o aumento do número de lactação, apresentando uma variação semelhante à percentagem de gordura, esta variação é explicada pelo facto de a percentagem de gordura aumentar e a proteína diminuir com o aumento do número de lactação (Anexo 17).

Consoante o **número de ordenhas diárias**, a percentagem de gordura, proteína e a relação G/P apresentam variações consideráveis (Figura 24 (a), (b) e (c)).

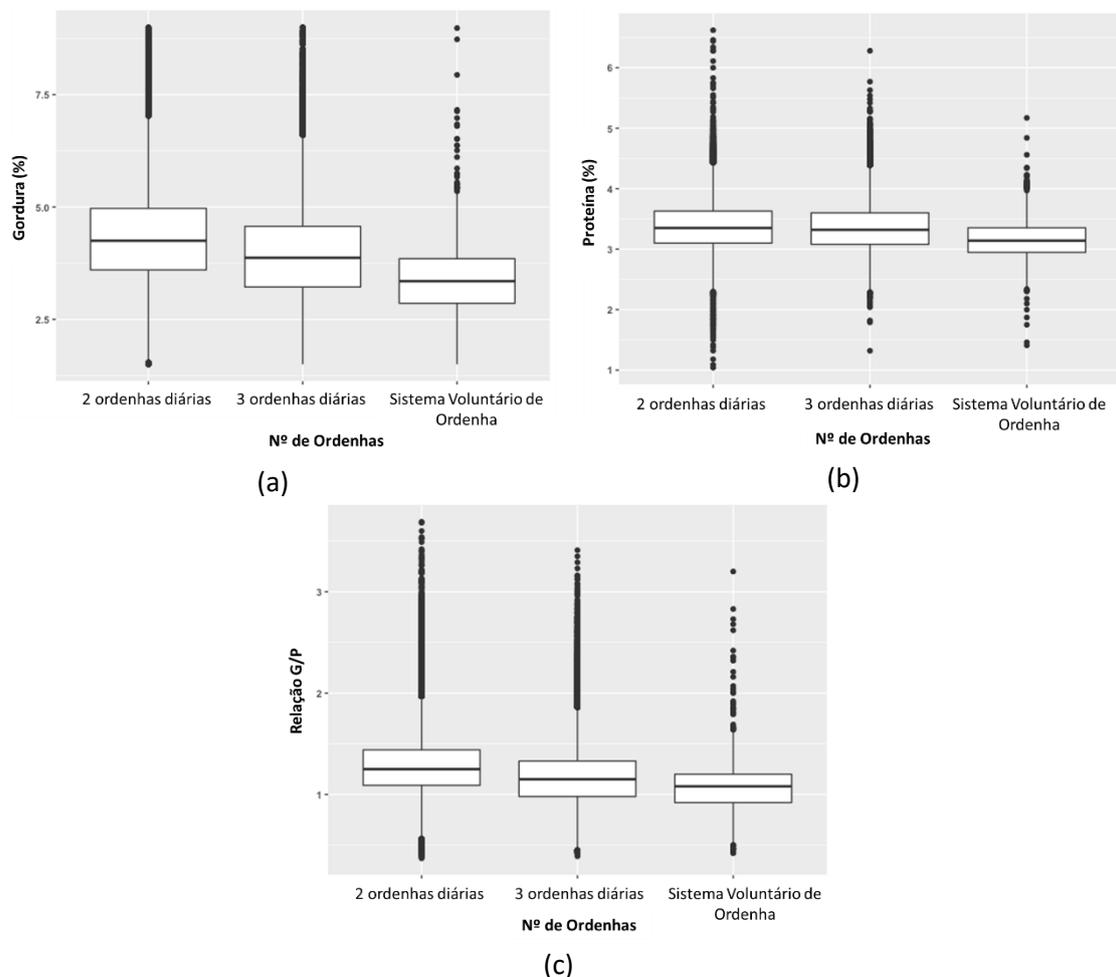


Figura 24 - Variação da percentagem de gordura (a) proteína (b) e da relação G/P (c), consoante o número de ordenhas diárias.

De acordo com a Figura 24, os três parâmetros apresentam a mediana mais elevada quando se realizam duas ordenhas diárias e a menor quando existe o sistema voluntário de ordenha, indicando que estes parâmetros diminuem com o aumento da frequência de ordenhas. Excetuando os resultados do sistema voluntário de ordenha, esta variação está de acordo com a variação da produção de leite, pois esta é maior quando se realizam três ordenhas diárias (Anexo 20 e 21). A diminuição destes parâmetros com o aumento da frequência de ordenha é concordante com o descrito por Nunes, (2004).

Por fim, ao **longo do ano**, a percentagem de gordura, proteína e a relação G/P apresentam uma variação moderada (Figura 25 (a), (b) e (c)).

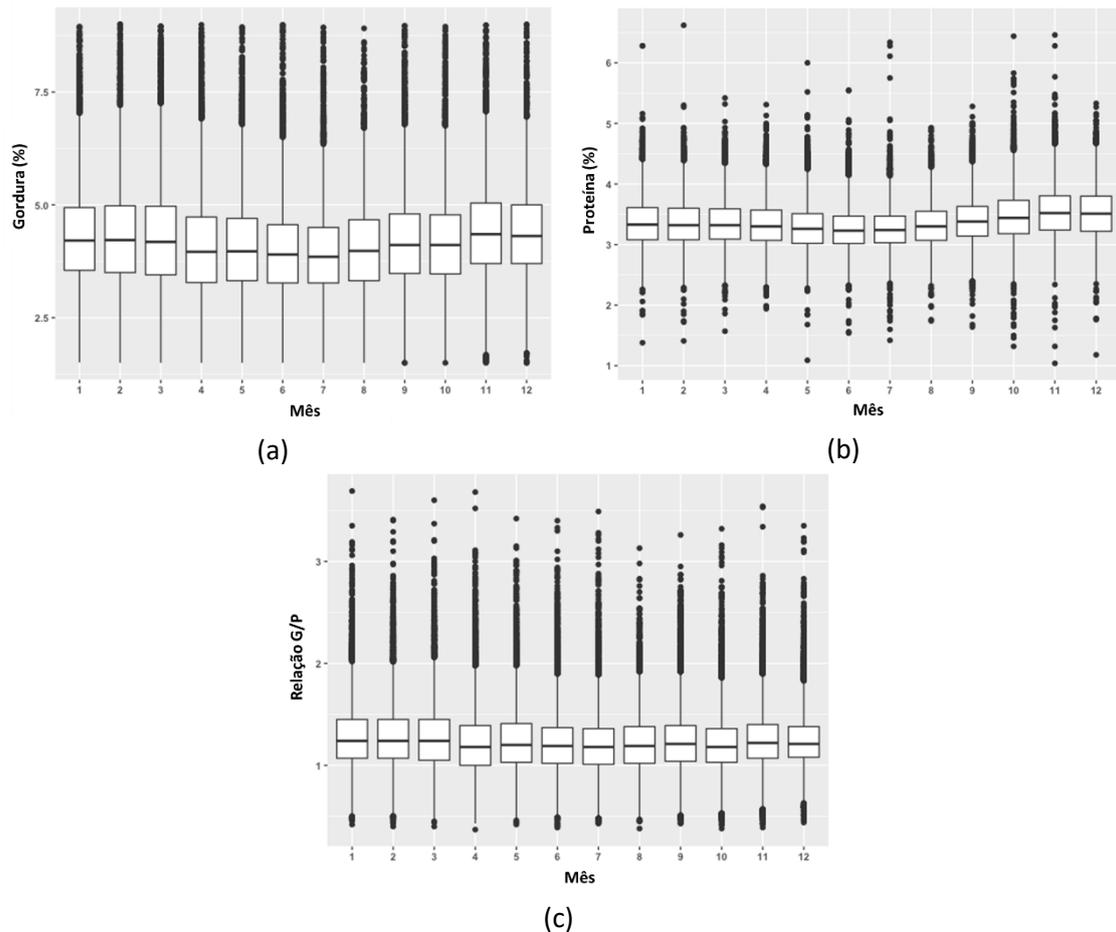


Figura 25 - Variação da percentagem de gordura (a), proteína (a) e da relação G/P (b) ao longo do ano.

Analisando a figura 25 (a) e (b), verifica-se que a percentagem de gordura e proteína apresentam variações semelhantes, dado que as menores medianas, de ambos os parâmetros, ocorrem nos meses de junho e julho, e as maiores nos meses de novembro e dezembro. Tendo em conta as condições edafo-climáticas, era esperado que os menores valores ocorressem no verão (julho, agosto e setembro), devido ao stress térmico. O facto da percentagem de gordura e proteína apresentar um ligeiro aumento nos meses de agosto e setembro, pode ser devido à menor produção a de leite nestes meses, proporcionando um menor fator de diluição (Anexo 24).

Estas variações estão de acordo com Bendelja *et al.*, (2011), que defendem que a percentagem de gordura e proteína é menor na primavera e verão, e são semelhantes ao verificado por Amaral-Philips, (s.d.e), Ng-Kwai-Hang *et al.*, (1984) e Sargent *et al.*, (1998) citados por Quist *et al.*, (2008), Quist *et al.*, (2008) e Palmquist, (2006) citado por Moreira, (2015), que indicam que a percentagem destes parâmetros é menor no verão devido ao stress térmico.

No que se refere à relação G/P (Figura 25 (c)), as medianas mais altas ocorrem em janeiro, fevereiro e março, mas a variação e dispersão deste parâmetro é pequena (Anexo 25).

Relativamente às correlações de Spearman, verificou-se que a correlação entre a produção de leite e a percentagem de proteína (-0,525) é mais alto do que a correlação entre o primeiro parâmetro e a percentagem de gordura (-0,190). A associação negativa entre estas variáveis está de acordo com Silvestre *et al.*, (2003a), Nunes, (2004) e Cue *et al.*, (1987) e Meyer, (1985) citado por Almeida, (2012) que asseguram que estes parâmetros variam de forma inversa à produção de leite, mas é contrária ao obtido por Hossein-Zadeh *et al.*, (2011). Analisando o valor absoluto da correlação entre a produção de leite e a percentagem de proteína, este está de acordo com o obtido por Arunvipas *et al.*, (2003), Meyer *et al.*, (2006), Miglior *et al.*, (2007) e Konjačić *et al.*, (2013), mas é superior ao descrito por Bendelja *et al.*, (2011). O valor absoluto da correlação com a percentagem de gordura é menor do que a enunciada por Arunvipas *et al.*, (2003), Meyer *et al.*, (2006), Miglior *et al.*, (2007) e Konjačić *et al.*, (2013).

A percentagem de lactose apresenta um coeficiente de correlação baixo e negativo com a percentagem de gordura (-0,140), de proteína (-0,062) e com a relação G/P (-0,111). A correlação com a percentagem de gordura está em concordância com Miglior *et al.*, (2007), Bendelja *et al.*, (2011) e Hossein-Zadeh *et al.*, (2011), e a correlação com a percentagem de proteína está de acordo com Hossein-Zadeh *et al.*, (2011).

A correlação entre a percentagem de gordura e proteína é positiva, moderada (0,335) e inferior à obtida por Arunvipas *et al.*, (2003), Miglior *et al.*, (2007), Hossein-Zadeh *et al.*, (2011) e Konjačić *et al.*, (2013), mas é superior à descrita por Bendelja *et al.*, (2011).

Por último, a relação G/P apresenta uma correlação alta com a percentagem de gordura (0,882) e uma correlação baixa com a percentagem de proteína (-0,095), estando de acordo com Vos & Groen, (1998) citados por Buttchereit *et al.*, (2010). O valor destas correlações indica que quando a relação G/P é alta ou baixa, é sobretudo devido à maior ou menor percentagem de gordura, e não está tão relacionada com o valor da percentagem de proteína. A produção de leite tem uma correlação positiva e baixa com a relação G/P (0,036), esta associação é contrária à de Meyer *et al.*, (2006), que obteve uma correlação negativa.

4.2.3 Concentração de Azoto Ureico no Leite (MUN)

Uma vez que o modelo linear generalizado misto para a concentração de MUN quantificou o efeito da fase e número de lactação, não será analisada a influência destes fatores através da interpretação dos *boxplots*.

A variação da concentração de MUN consoante a **exploração** encontra-se na Figura 26

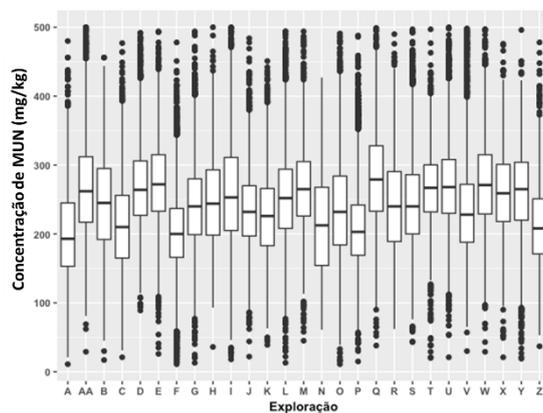


Figura 26 - Variação da concentração de MUN consoante a exploração.

A Figura 26 demonstra que existem variações consideráveis da concentração de MUN entre explorações. A maior concentração ocorre na exploração Q nesta, 50% das observações apresentam concentrações de MUN superiores a 279mg/kg. As explorações A, F e P são as que têm menores concentrações, nestas, sensivelmente metade das observações apresentam concentrações inferiores a 200mg/kg (Anexo 9). Em todas as explorações verifica-se uma elevada dispersão de valores.

A variação da concentração de MUN consoante o **número de ordenhas diárias** e **mês** pode ser observada na Figura 27 (a) e (b)

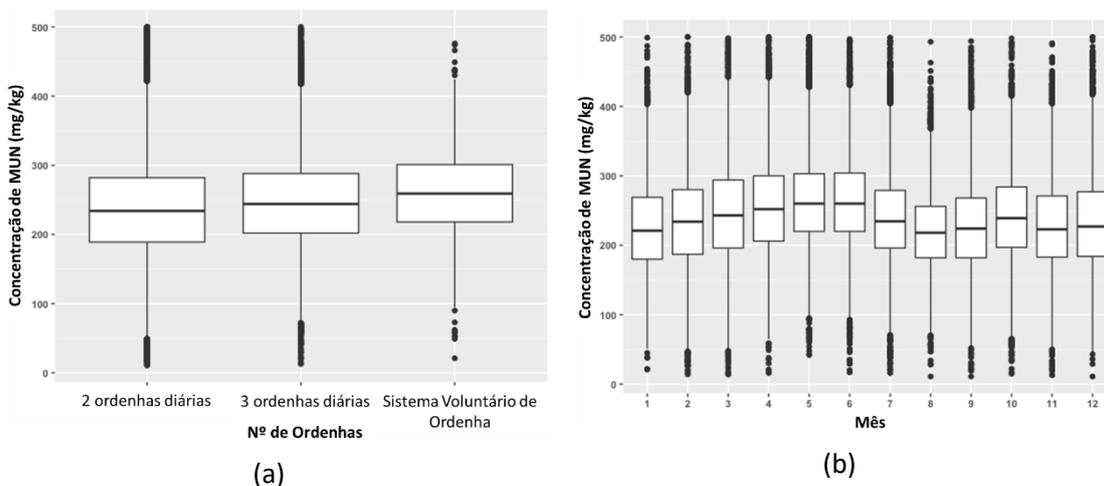


Figura 27 – Variação da concentração de MUN consoante o número de ordenhas diárias (a) e ao longo do ano (b).

Atendendo à Figura 27 (a), percebe-se que a concentração de MUN aumenta com o aumento da frequência de ordenhas. A maior concentração de MUN na realização de três ordenhas diárias comparativamente a duas ordenhas, está de acordo com a variação da produção de leite (Figura 19) e com alguns autores anteriormente mencionados. Este resultado não está de acordo com Kgole *et al.*, (2012), que indicam que a concentração de MUN é maior quando se efetuam duas ordenhas diárias, comparativamente com a realização de três ordenhas (Anexo 21).

Ao longo do ano, a concentração de MUN apresenta uma variação considerável (Figura 27 (b)). As medianas mais elevadas ocorrem nos meses de abril, maio e junho, e a mais baixa no mês de agosto. O mês de agosto é o que apresenta menor dispersão de valores. Esta variação está de acordo com a variação da produção de leite ao longo do ano, e é idêntica à descrita por Joker *et al.*, (2001), que afirmam que o aumento da concentração de MUN na primavera se deve ao aumento da quantidade de proteína nas pastagens, e à da Miranda (2014), que refere que a maior concentração de MUN ocorre em abril (Anexo 25).

O coeficiente de correlação entre a concentração de MUN e a produção de leite é positivo e baixo (0,020). O facto de a associação ser positiva explica a semelhante variação destes parâmetros. Esta correlação é inferior ao descrito por Arunvipas *et al.*, (2003), Meyer *et al.*, (2006), Bendelja *et al.*, (2011), Doska *et al.*, (2012) e Konjačić *et al.*, (2013), mas é idêntica à referida por Hossein-Zadeh *et al.*, (2011). O facto de ser positiva está de acordo com todos os estudos consultados, exceto Miglior *et al.*, (2007) que obteve uma correlação negativa.

A correlação entre a concentração de MUN e a percentagem de lactose (0,059) é superior ao enunciado por Bendelja *et al.*, (2011) e contrária à descrita por Miglior *et al.*, (2007) e Hossein-Zadeh *et al.*, (2011), que obtiveram uma correlação negativa. A correlação entre a concentração de MUN e a relação G/P (-0,071) é baixa e negativa.

A correlação entre a concentração de MUN e a percentagem de proteína é positiva e baixa (0,020). Este resultado não está de acordo com o enunciado por Golden *et al.*, (2001a), Fatihi *et al.*, (2002), Arunvipas *et al.*, (2003), Johnson *et al.*, (2003), Hojman *et al.*, (2004), Jilek *et al.*, (2006), Meyer *et al.*, (2006) e Konjačić *et al.*, (2013) que defendem que estes parâmetros têm uma relação negativa. Por outro lado, Huhtanen *et al.*, (2015) enunciam que a concentração de MUN aumenta com o aumento da quantidade de proteína presente no leite e Miglior *et al.*, (2007), Bendelja *et al.*, (2011) e Hossein-Zadeh *et al.*, (2011) obtiveram uma correlação positiva entre estas variáveis.

Para finalizar, a correlação entre a concentração de MUN e a percentagem de gordura (-0,057) é concordante com o descrito por Konjačić *et al.*, (2013) e é contrária ao enunciado por Ferguson *et al.*, (1997) citado por Jilek *et al.*, (2006), Miglior *et al.*, (2007), Bendelja *et al.*, (2011), Pimentel, (2011) e Hossein-Zadeh *et al.*, (2011), que indicam que esta correlação é positiva. O coeficiente de correlação entre a concentração de MUN e a relação G/P é baixo e negativo (-0,071).

4.2.4 Concentração de β -hidroxibutirato (BHB)

De acordo com a análise da variação da concentração de MUN, não será feita a interpretação do efeito da fase e número da lactação na concentração de BHB através da

interpretação de *boxplots*, porque o efeito destes fatores foi quantificado no modelo linear generalizado misto para a concentração de BHB.

Para a análise da variação da concentração de BHB por exploração, número de ordenhas diárias e mês do ano através de *boxplots*, efetuou-se uma transformação logarítmica.

A concentração de BHB varia de forma considerável consoante a **exploração** (Figura 28).

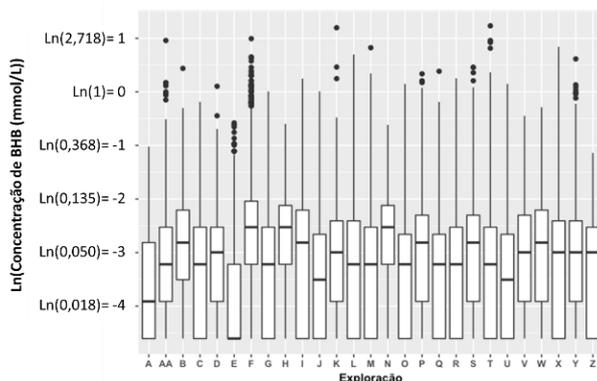


Figura 28 - Variação da concentração de BHB consoante a exploração.

As explorações que apresentam maior concentração de BHB são a F, H e N, nestas, 50% das observações apresentam uma concentração de BHB superior a 0,07mmol/L. A exploração com menor concentração é a E, aqui, metade das observações apresentam uma concentração de BHB igual a 0,0mmol/L. Deve realçar-se que a exploração F é a que apresenta maior percentagem de gordura e relação G/P, e as explorações H e N são as que apresentam menor produção de leite. O facto das explorações H e N serem as que apresentam menor produção de leite e maior concentração de BHB indica que, possivelmente, nestas explorações existe um desequilíbrio da dieta alimentar, originando a ocorrência de transtornos metabólicos como o NEB e a cetose. A Figura 28 demonstra também que existe uma elevada dispersão de valores em todas as explorações (Anexo 10).

A variação da concentração de BHB consoante o **número de ordenhas diárias** e o **mês do ano** encontra-se na Figura 29 (a) e (b).

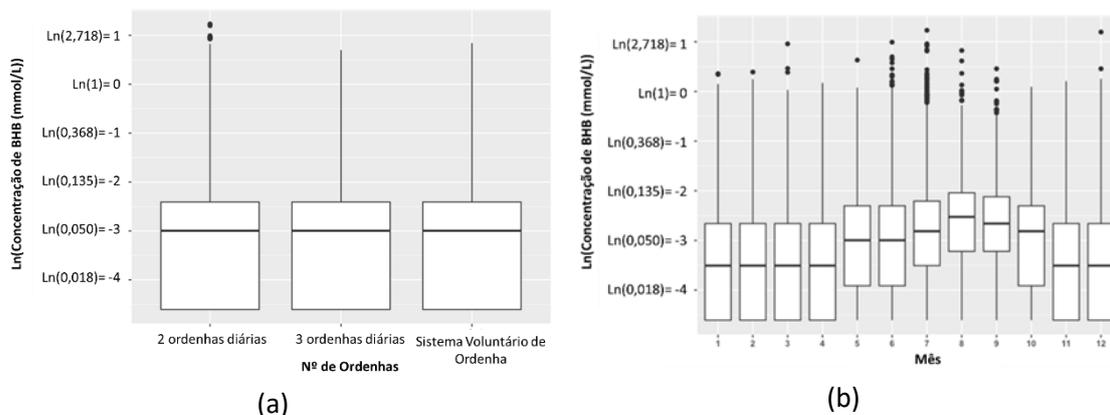


Figura 29 - Variação da concentração de BHB consoante o número de ordenhas diárias (a) e o mês do ano (b).

De acordo com a Figura 29 (a), observa-se que a concentração de BHB não é influenciada pelo número de ordenhas diárias realizadas. A dispersão dos valores é semelhante em todos os sistemas, assim como o facto de 50% das observações terem uma concentração de BHB inferior a 0,05mmol/L (Anexo 22).

Por último, o mês em que se recolhe a amostra têm uma elevada influência na concentração de BHB. A maior concentração ocorre no mês de agosto e setembro, e a menor entre novembro e abril. Comparativamente à variação da produção de leite, verifica-se que a maior concentração do BHB ocorre quando a produção de leite é menor, em agosto. Nesta época do ano os animais estão sobre a ocorrência de stress térmico e, conseqüentemente ingerem uma menor quantidade de alimento, o que proporciona a mobilização das reservas corporais e a maior concentração de NEFA's no sangue, que origina a maior concentração de corpos cetónicos nos fluidos corporais. (Anexo 26).

O coeficiente de correlação entre a concentração de BHB e a produção de leite (-0,070) e a percentagem de lactose (-0,223) é baixo e negativo. Os sinais destas associações estão de acordo com o anteriormente descrito, assim como com Oetzel, (2004), Roos *et al.*, (2007), Ehret *et al.*, (2015), Santaschi *et al.*, (2016) e Vina *et al.*, (2016), que indicam que a produção de leite é negativamente influenciada pela concentração de BHB presente no sangue e leite. A correlação com a percentagem de lactose está de acordo com Santaschi *et al.*, (2016), que referem que as vacas com maior concentração de BHB apresentam menor percentagem de lactose.

A correlação entre a concentração de BHB e a percentagem de gordura (0,250) e a relação G/P (0,266) é baixa e positiva. A primeira associação está de acordo com Campos, (2005), Roos *et al.*, (2007), Duffield *et al.*, (2009), Schwarz *et al.*, (2015) e Vanholder *et al.*, (2015), que defendem que a maior concentração de BHB e ácidos gordos na glândula mamária origina maior síntese de gordura. A segunda associação está de acordo com o descrito por Santaschi *et al.*, (2016), que descrevem que a relação G/P é maior em vacas com BHB superior a 0,2mmol/L. O valor desta correlação é sensivelmente metade do descrito por Drift *et al.*, (2012).

Por fim, o coeficiente de correlação entre a concentração de BHB e a percentagem de proteína não é significativa e a correlação entre a concentração de BHB e MUN é baixa e negativa (-0,148), esta está de acordo com o descrito por Santaschi *et al.*, (2016), que asseguram que as vacas com maior concentração de BHB apresentam menores concentrações de MUN.

4.2.5 Contagem de Células Somáticas (SCC)

Para a análise da variação da SCC por exploração, fase e número de lactação, número de ordenhas diárias e mês do ano, efetuou-se uma transformação logarítmica. A SCC apresenta uma variação considerável entre **explorações** (Figura 30).

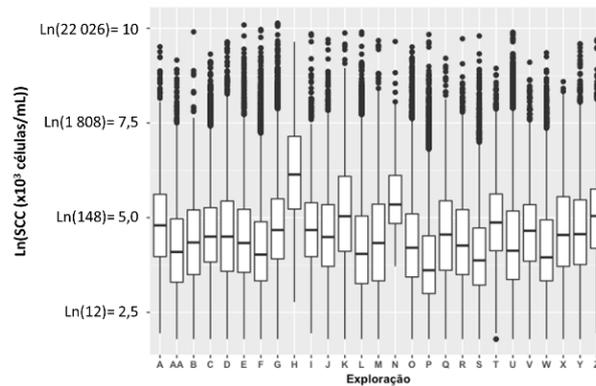


Figura 30 - Variação da SCC consoante a exploração.

Tendo em conta a Figura 30, afirma-se que a exploração H é a que apresenta maior SCC, nesta 50% das observações apresentam uma SCC superior a 464×10^3 células/mL, seguida da exploração N, em que metade das observações tem uma SCC superior a 210×10^3 células/mL. A exploração que apresenta menor SCC é a P, onde 50% das observações têm uma SCC inferior a 37×10^3 células/mL. Todas as explorações apresentam uma elevada dispersão dos dados (Anexo 10).

A SCC varia de forma relevante, consoante a **fase e o número de lactação** (Figura 31 (a) e (b)).

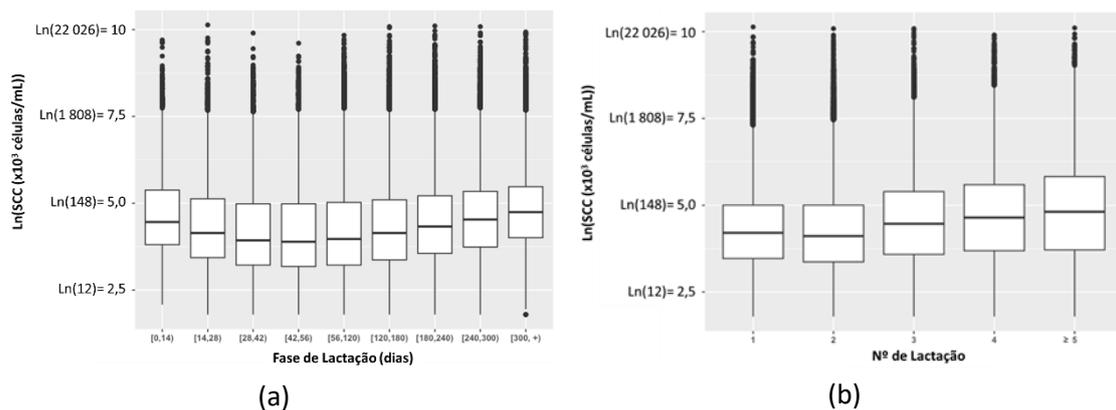


Figura 31 - Variação da SCC ao longo da lactação (a) e consoante o número de lactação (b).

Analisando a Figura 31 (a), constata-se que a SCC diminui até aos 55 DEL. Após esta fase, este parâmetro aumenta até ao final da lactação. As maiores medianas ocorrem até aos 13 DEL e após os 240 DEL (Anexo 14).

Este resultado está de acordo com Reichmuth, (1975) citado por Sharma *et al.*, (2011), que declaram que a SCC é maior no início e no final da lactação, assim como com Martins (2011),

Dohoo & Meek, (1982) citado por Sharma *et al.*, (2011) e Konjačić *et al.*, (2013), que referem que a SCC aumenta ao longo da lactação.

A partir da Figura 31 (b), compreende-se que a SCC aumenta após a segunda lactação, e que a SCC dos animais que estão na primeira e segunda lactação é idêntica. Este resultado está de acordo com Hojman *et al.*, (2004), Miglior *et al.*, (2006), Martins, (2011), Sharma *et al.*, (2011) e Cinar *et al.*, (2015), que referem que a SCC aumenta com o aumento do número de lactação. Segundo Beckley & Johnson, (1966), Reichmuth, (1975), Blackburn, (1982) e Skrzypek *et al.*, (2004) citados por Sharma *et al.*, (2011), este aumento ocorre, sobretudo, devido à prevalência de infeções intra-mamárias (Anexo 18).

A variação da SCC em função do **número de ordenhas diárias** e do **mês do ano** encontra-se na Figura 32 (a) e (b).

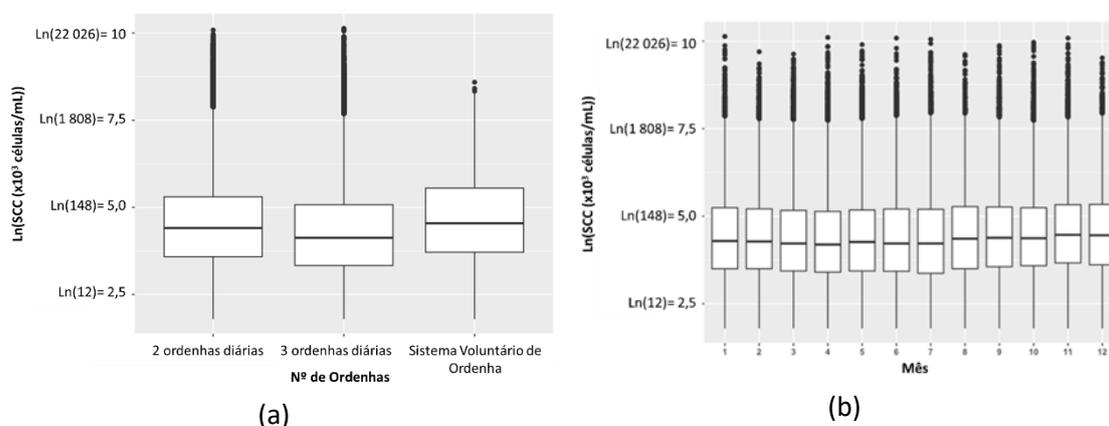


Figura 32 - Variação da SCC consoante o número de ordenhas diárias (a) e ao longo do ano (b).

Relativamente à influência do número de ordenhas diárias realizadas (Figura 32 (a)), o sistema voluntário de ordenha é o que apresenta maior SCC, e a realização de 3 ordenhas diárias a menor. Todos os sistemas apresentam uma idêntica dispersão dos valores (Anexo 22).

A SCC apresenta uma pequena variação ao longo do ano, tendo os maiores valores em novembro e dezembro. Este resultado está de acordo com Cinar *et al.*, (2015), que obtiveram a maior SCC entre outubro e janeiro, mas não é concordante com Salsberg *et al.*, (1984) citado por Quist *et al.*, (2008) e Khate & Yadav, (2010) citado por Sharma *et al.*, (2011), que referem que no verão existe uma maior SCC devido ao aumento da temperatura e humidade nas instalações, o que provoca o aumento do stress térmico e a diminuição da atividade do sistema imunitário dos animais (Anexo 26).

O coeficiente de correlação entre a produção de leite e a SCC é baixo e negativo (-0,178). O valor desta correlação é inferior ao obtido por Konjačić *et al.*, (2013) e Cinar *et al.*, (2015), mas é superior ao descrito por Miglior *et al.*, (2007). O facto de ser negativa está de acordo com Sharma *et al.*, (2011) e Cinar *et al.*, (2015), que enunciam que a produção de leite diminui com

o aumento da SCC, mas é contrária ao obtido por Hossein-Zadeh *et al.*, (2011), que indicam que esta correlação é positiva.

A correlação entre a SCC e a percentagem de lactose também é baixa e negativa (-0,303). Esta está em concordância com o descrito por Miglior *et al.*, (2007), Hossein-Zadeh *et al.*, (2011) e Cinar *et al.*, (2015). Segundo Lacasse citado por Santschi *et al.*, (2016) e Sharma *et al.*, (2011), a redução da síntese de lactose é devido à diminuição da integridade do tecido da glândula mamária causado pelo aumento da SCC. Park *et al.*, (2007) citado por Haile-Mariam *et al.*, (2017) também reporta que a percentagem de lactose é menor em vacas com infeções intra-mamárias.

A correlação entre a SCC e a percentagem de gordura (0,010) e proteína (0,133) é positiva e baixa, ambas as correlações são menores do que as descritas por Konjačić *et al.*, (2013) e Cinar *et al.*, (2015). Seria de esperar que fossem negativas, porque a síntese destes componentes diminui com o aumento da SCC (Harmon 1994 e Schallibaum & Melchior 2001 citados por Sharma *et al.*, 2011). Contrariamente, a correlação entre a SCC e a relação G/P é negativa e baixa (-0,051).

Por último, a correlação entre a SCC e a concentração de MUN é baixa e negativa (-0,015). Este valor é mais baixo do que o descrito por Miglior *et al.*, (2007) e Konjačić *et al.*, (2013) e é contrário ao obtido por Hossein-Zadeh *et al.*, (2011) e Cinar *et al.*, (2015) que referem que esta relação é positiva. Era esperado que esta associação fosse mais forte devido ao facto de a maioria dos autores consultados indicarem que esta associação é negativa e forte, nomeadamente, Arunvipas *et al.*, (2003), Johnson & Young, (2003), Hojman *et al.*, (2004), Meyer *et al.*, (2006), Faust *et al.*, (1996) citado por Pimentel, (2011) e Konjačić *et al.*, (2013).

O coeficiente de correlação entre a concentração de BHB e a SCC é baixo e positivo (0,101). Esta associação está em conformidade com LeBlanc (2010), Koeck *et al.*, (2014), Schwarz *et al.*, (2015), Santschi *et al.*, (2016) e Vina *et al.*, (2016), que asseguram que a existência de NEB e hipercetonémia proporciona a diminuição da funcionalidade do sistema imunitário e, por conseguinte, o aumento do número e intensidade das infeções intra-mamárias.

4.2.6 Modelos Lineares Generalizados Mistos (GLMM)

Os modelos lineares generalizados mistos (GLMM) comparativamente aos modelos de equações generalizadas (GEE), apresentaram maior consistência em termos da ordem de grandeza dos valores dos coeficientes ajustados e da respetiva significância. Verificou-se também, que o GLMM para a concentração de BHB apresentou maior consistência do que para a concentração de MUN.

4.2.6.1 Modelo A (BHB)

Como foi descrito anteriormente, para a realização do modelo A, utilizou-se como variáveis explicativas, a produção de leite diária, a fase e o número de lactação, a percentagem de gordura, a relação G/P e a SCC presentes no leite. A interpretação dos coeficientes, desvios padrões e valores P obtidos após o ajustamento do modelo (Anexo 27) será realizada através do quociente entre a possibilidade de um evento ocorrer num grupo, e a possibilidade desse evento ocorrer noutro grupo (*odds ration* (OR)).

Na Figura 33 observa-se o efeito da produção de leite diária na concentração de BHB, nomeadamente, a razão de possibilidades de uma vaca, que produz 10kg/dia (Ref10kg) ou 20kg/dia (Ref20kg) ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L, quando comparada com outra vaca com diferente produção de leite diária.

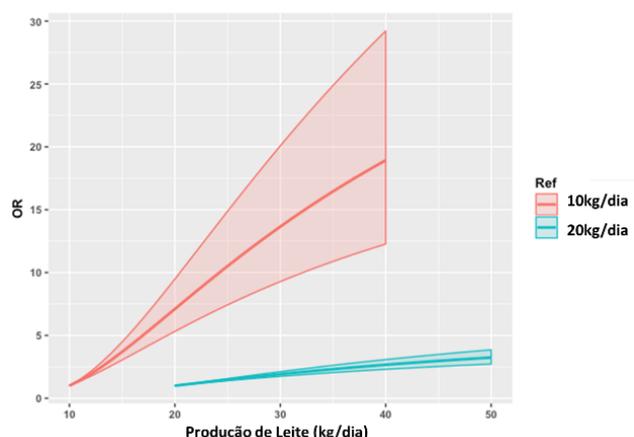


Figura 33 – Razão de possibilidades de uma vaca, que produz 10 ou 20kg de leite diário, ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L, e respectivas bandas de confiança a 95%, quando comparada com outra vaca com diferente produção.

Considerando a Figura 33, constata-se que, quanto maior é a diferença de produção de leite diária entre duas vacas, maior é a possibilidade da vaca de menor produção ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L. Assim como, quanto menor é a produção de leite de uma vaca, maiores são as possibilidades de ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L, para a mesma diferença de produção. Por exemplo, tendo em consideração uma diferença de produção de 20kg/dia, a vaca que produz 10kg/dia tem sensivelmente 13 vezes mais possibilidades de ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L ($OR \approx 13$), do que uma vaca que produz 30kg/dia, enquanto que, uma vaca com uma produção de 20kg/dia tem apenas 2,5 vezes mais possibilidades de ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L ($OR \approx 2,5$), do que uma vaca que produz 40kg/dia.

Considerando os níveis de produção de leite das explorações, constata-se que as explorações H e N são as que têm maior percentagem de contrastes com uma produção de leite inferior a 20kg/dia, e são também as que apresentam as maiores concentrações de BHB,

indicando que a dieta e estratégias alimentares destes animais não são as adequadas originando, desequilíbrios metabólicos como o NEB e a cetose.

Na Figura 34 analisa-se o efeito da fase e número de lactação na concentração de BHB, particularmente, analisa-se a razão de possibilidades de uma vaca, numa determinada fase de lactação, ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L, quando comparada com outra vaca na fase de referência (42 a 55 DEL), tando para primíparas como para múltíparas.

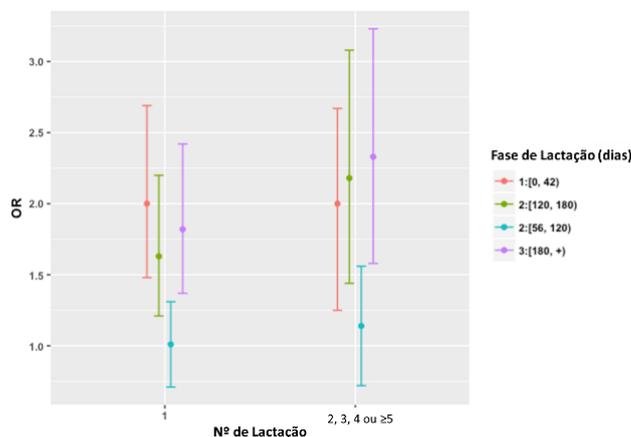


Figura 34 - Razão de possibilidades de uma vaca, numa determinada fase de lactação, ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L, quando comparada com outra vaca na fase de referência (42 a 55 dias), tando para primíparas como para múltíparas.

Constata-se que, tanto nas primíparas como nas múltíparas, quando uma vaca se encontra até aos 41 DEL, apresenta sensivelmente o dobro das possibilidades de ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L, do que uma vaca na fase de referência (42 a 55 DEL) (primíparas com OR=2 e múltíparas com OR=1,89). Por outro lado, uma vaca que se encontre entre o 56 e o 119 DEL, não tem possibilidades diferentes de ter um BHB superior a 0,2mmol/L, do que uma vaca que esteja na fase de referência (42 a 55 DEL), este caso também se verifica para todas as lactações. Contudo, após os 120 dias de lactação, as primíparas têm menor possibilidades de ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L do que as múltíparas. Nesta fase, as múltíparas têm mais do dobro das possibilidades (120 a 179 DEL têm OR=2,18 e após os 180 DEL têm OR=2,33), enquanto que as primíparas têm menos do dobro das possibilidades (120 a 179 DEL têm OR=1,63 e após os 180 DEL têm OR=1,82) (Anexo 29).

O aumento das possibilidades de ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L até aos 41 DEL está em concordância com Koeck *et al.*, (2014), que refere que a concentração de BHB é mais elevada entre os 5 e 40 DEL, assim como com Santaschi *et al.*, (2016) e Tatone *et al.*, (2017), que indicam que a percentagem de animais com a concentração de BHB elevada é maior no início da lactação. Esta variação também está de acordo com a Figura 4 (ponto 2.2.1), dado que, até aos 100 DEL, aproximadamente, os animais estão sob a ocorrência de NEB. Todos

os estudos consultados avaliam somente a concentração de BHB até aos 100 dias de lactação, não havendo nenhuma descrição da variação deste parâmetro após este período.

A Figura 35 demonstra o efeito da SCC, da fase e do número de lactação, através da razão de possibilidades de uma primípara ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L, quando comparada com uma multípara, tendo em conta a SCC e a fase de lactação.

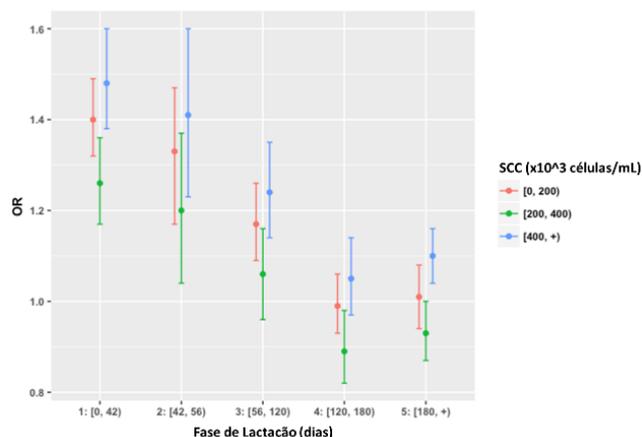


Figura 35 - Razão de possibilidades de primípara ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L, quando comparada com uma multípara, tendo em conta a fase de lactação e a SCC.

Pode observar-se que até aos 55 DEL, independentemente da SCC, a primípara tem sempre mais possibilidades de ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L. A maior possibilidade ocorre quando a SCC é superior a 400x10³células/mL (até 41 DEL, OR=1,48 e entre 42 e 55 DEL, OR=1,41), neste caso, a primípara tem 48 e 41% mais possibilidades de ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L do que a multípara, respetivamente.

Entre os 56 e 119 DEL, a primípara apenas tem mais possibilidades de ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L quando a SCC é inferior a 200x10³células/mL (OR=1,17) ou superior a 400x10³células/mL (OR=1,24).

Entre os 120 e 179 DEL, a primípara não apresenta possibilidades diferentes de ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L do que a multípara quando a SCC é inferior a 200x10³células/mL ou superior 400x10³células/mL, dado que o intervalo de confiança do OR a 95% contém o valor de 1. Quando a SCC está entre os 200 e 400x10³células/mL as primíparas têm 11% menos possibilidade de ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L do que as multíparas.

Após os 180 DEL, a primípara apenas tem mais possibilidade de ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L quando a SCC é superior a 400x10³células/mL (OR=1,1) (Anexo 30).

Esta variação está de acordo com Marcos (2014), que refere que a concentração de BHB diminui com o aumento do número de lactação, mas não está de acordo com Nowroozi *et al.*,

(2011) citado por Marcos (2014), que indicam que a porcentagem de animais com maior concentração de BHB aumenta com o aumento do número de lactação.

A Figura 36 demonstra o efeito da SCC e do número da lactação, com base na razão de possibilidades de uma vaca, com a SCC inferior a 200×10^3 células/mL, ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L, quando comparada com outra vaca que tenha uma SCC entre 200 e 400×10^3 células/mL ou superior a 400×10^3 células/mL, tendo em conta o número de lactação.

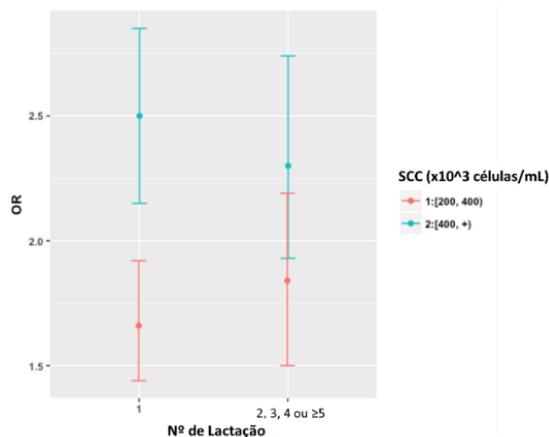


Figura 36 - Razão de possibilidades de uma vaca com a SCC inferior a 200×10^3 células/mL ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L, quando comparada com outra vaca que tenha uma SCC entre 200 e 400×10^3 células/mL ou uma vaca que tenha uma SCC superior a 400×10^3 células/mL, tendo em conta o número de lactação.

Atendendo à Figura 36, constata-se que nas primíparas a maior possibilidade de ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L ocorre quando a SCC é superior a 400×10^3 células/mL, estas têm 2,5 vezes mais possibilidades de ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L, quando comparadas com primíparas com a SCC inferior a 200×10^3 células/mL.

Nas multíparas, existe uma interseção dos intervalos de confiança logo, apenas se pode concluir que os animais com a SCC superior ou igual a 200×10^3 células/mL têm mais possibilidades de ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L, quando comparados com animais com a SCC inferior 200×10^3 células/mL. Deste modo, conclui-se que o efeito da SCC na concentração de BHB tem mais influência quando não se considera a fase de lactação (Anexo 31).

Estes resultados estão de acordo com Koeck *et al.*, (2014), Santaschi *et al.*, (2016) e Vina *et al.*, (2016) que indicam que o aumento da concentração de BHB nos fluidos corporais proporciona o aumento da SCC no leite. Mas é oposto ao obtido por Duffield *et al.*, (2009) e Suthar *et al.*, (2013), que defendem que não existe relação entre o aumento da concentração de BHB nos fluidos corporais e a ocorrência de infeções intra-mamárias.

Por último, uma vaca que tenha uma percentagem de gordura superior a 4,5%, tem 32% mais possibilidades (OR=1,32) de ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L, do que

outra vaca com uma percentagem de gordura inferior. Assim como, uma vaca que tenha uma relação G/P superior ou igual a 1,4 tem, sensivelmente, 2,3 vezes mais possibilidades (OR=2,3) de ter um BHB superior a 0,2mmol/L, do que outra vaca com a relação G/P inferior.

Estes resultados estão de acordo com Campos *et al.*, (2005), que referem que quando os animais estão sob a ocorrência de NEB a síntese de gordura aumenta. Schwartz *et al.*, (2015) e Santaschi *et al.*, (2016) também constataram que a percentagem de gordura é maior em vacas que têm uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L. Em relação à percentagem de proteína, Schwartz *et al.*, (2015) constaram que esta diminui quando a concentração de BHB é superior a 0,2mmol/L e Santaschi *et al.*, (2016) obtiveram a menor percentagem de proteína quando a concentração de BHB se situa entre 0,15 e 0,2mmol/L. Logo, está de acordo com a bibliografia que as vacas com uma relação G/P igual ou superior a 1,4 tem mais possibilidades de ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L.

4.2.6.2 Modelo B (MUN)

De acordo com o descrito anteriormente, as variáveis explicativas do modelo B são a produção de leite diária, a fase e o número de lactação, a percentagem de proteína e a relação G/P do leite. A interpretação dos coeficientes, desvios padrões e valores P obtidos após o ajustamento do modelo (Anexo 28) será realizada através do valor do OR.

Na Figura 37 observa-se o efeito da produção de leite na concentração de MUN, através da razão de possibilidades de uma vaca ter uma concentração de MUN superior a 300mg/kg, consoante a diferença de produção de leite diária, relativamente a outra vaca.

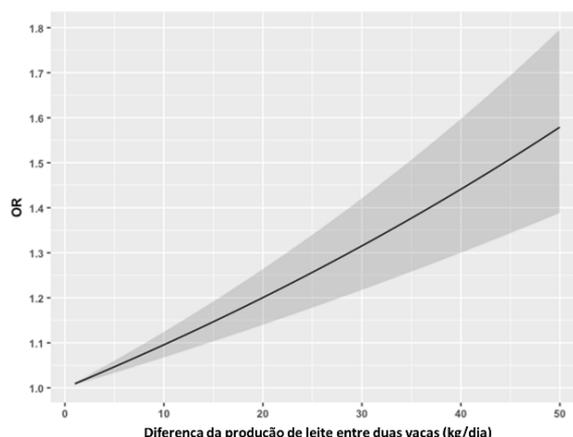


Figura 37 – Razão de possibilidades de uma vaca ter uma concentração de MUN superior a 300mg/kg, consoante a diferença de produção de leite diária relativamente a outra vaca, e respetivas bandas de confiança a 95%.

Verifica-se que quanto maior é a diferença da produção de leite diária, maior é a possibilidade da vaca de maior produção apresentar uma concentração de MUN superior a 300mg/kg. Por exemplo, uma vaca que produza mais 20kg de leite, tem 20% mais possibilidades de ter uma concentração de MUN superior a 300mg/Kg (OR=1,2), enquanto que uma vaca que

produza mais 40kg tem, sensivelmente, 45% mais possibilidades de ter uma concentração de MUN superior a 300mg/kg (OR≈1,45).

O aumento das possibilidades de uma vaca apresentar uma concentração de MUN superior a 300 mg/kg devido ao aumento da produção de leite está em concordância com todos os estudos consultados, excetuando Godden *et al.*, (2001c), que refere que a média de MUN do efetivo não está associada à produção de leite.

Na bibliografia, alguns autores analisaram o aumento da concentração de MUN por cada aumento de 2000kg de leite numa lactação de 305 dias (aumento de 6,6kg/dia), obtendo um aumento de 3,3mg/kg (Arunvipas *et al.*, 2003), 28,5mg/kg (Jonker *et al.*, 1998 citado por Cabrita & Fonseca, 2004) e 26 mg/kg (Jonker *et al.*, 1999 citado por Jilek *et al.*, 2006). De acordo com este modelo, este aumento de produção de leite diária proporciona um aumento de 6% de possibilidades de ter uma concentração de MUN superior a 300mg/kg (OR≈1,06).

Na Figura 38 observa-se o efeito da fase e número de lactação, através da razão de possibilidades de uma vaca, numa determinada fase de lactação, ter uma concentração de MUN superior a 300mg/kg, quando comparada com outra da mesma lactação, mas que se encontra na fase de referência (42 a 55 dias).

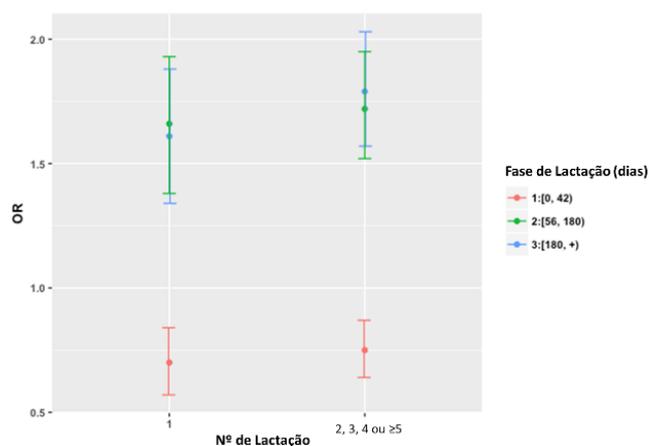


Figura 38 - A razão de possibilidades de uma vaca, numa determinada fase de lactação, ter uma concentração de MUN superior a 300mg/kg, quando comparada com outra da mesma lactação, mas que se encontra na fase de referência (42 a 55 dias).

Verifica-se que, em todas as lactações (primíparas e múltíparas), os animais que têm menor possibilidade de ter uma concentração de MUN superior a 300mg/kg são os que se encontram até aos 41 DEL. Por sua vez, as primíparas têm menos 30% de possibilidades (OR=0,70) e as múltíparas menos 25% de possibilidades (OR=0,85) de ter uma concentração de MUN superior a 300mg/kg, comparativamente aos animais que estão na fase de referência (42 a 55 DEL). Após a fase de referência, são as múltíparas que apresentam uma maior possibilidade de ter uma concentração de MUN superior a 300mg/kg (entre 56 e 179 DEL, OR=1,72 e após os 180 DEL, OR=1,79) (Anexo 32).

Esta variação está parcialmente de acordo com o descrito na bibliografia, dado que, tendo em conta a Tabela 15, até aos 60 DEL a concentração de MUN é baixa, corroborando estes resultados, mas no final da lactação, os autores indicam que a concentração de MUN diminui, o que é contrário aos resultados obtidos.

O facto da menor possibilidade de ter uma concentração de MUN superior a 300mg/kg ocorrer até aos 41 DEL, em todas as lactações, está de acordo com o possível aumento da energia fermentescível das dietas nesta fase produtiva, assim como a maior eficiência da utilização do azoto para fins produtivos (Oldham, 1984 citado por Carita & Fonseca, 2004).

Comparando as possibilidades, entre primíparas e multíparas, de ter uma concentração de MUN superior a 300mg/kg, pode constatar-se que, apenas existe uma diferença significativa após os 180 dias de lactação, indicando que neste período as primíparas têm, sensivelmente, mais 7% de possibilidades de ter uma concentração de MUN superior a 300mg/kg do que as multíparas. Esta diferença pode ser justificada pelo facto de as primíparas ainda estarem em crescimento e, conseqüentemente utilizarem os AA de forma mais eficiente (Oltner *et al.*, 1985 citado por Cabrita & Fonseca, 2004) (Anexo 33)

A percentagem de proteína do leite também influencia as possibilidades de um animal ter uma concentração de MUN superior a 300mg/kg (Figura 39).

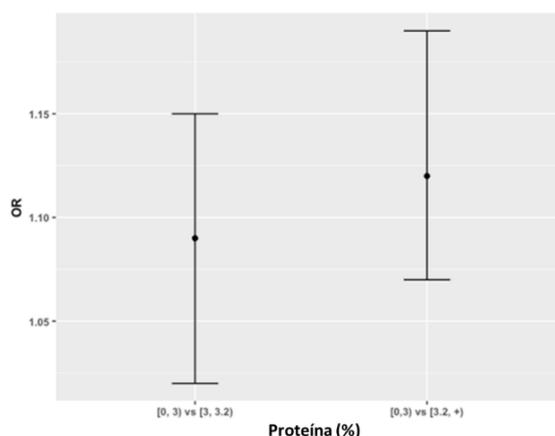


Figura 39 - Razão de possibilidades de uma vaca, com uma percentagem de proteína inferior a 3%, ter uma concentração de MUN superior a 300mg/kg, quando comparada com outra vaca com uma percentagem de proteína superior.

Quando a proteína do leite é inferior a 3%, o animal tem 9% mais possibilidades (OR=1,09) de ter uma concentração de MUN superior a 300mg/kg do que outro animal com um valor de proteína entre 3 e 3,2% e mais 12% de possibilidades (OR=1,12) quando comparado com um animal com uma proteína superior ou igual a 3,2%.

Por último, a relação G/P do leite também tem um efeito sobre a possibilidade de um animal ter uma concentração de MUN superior a 300mg/kg. Quando a G/P é superior ou igual a

1,4, o animal tem 7% mais possibilidades (OR=1,07) de ter uma concentração de MUN superior a 300mg/kg, quando comparado com animal com a G/P inferior.

Estes resultados estão de acordo com Godden *et al.*, (2001a), Arunvipas *et al.*, (2003), Hojman *et al.*, (2004), Márquez, (2006), Meyer *et al.*, (2006) e Jonker *et al.*, (1998) e Roy *et al.*, (2001) citados por Miranda, (2014), que indicam que a relação entre a percentagem de proteína e a concentração de MUN é negativa, dado que quanto maior é a eficiência da utilização do azoto para a síntese de proteína, menor é a quantidade de MUN excretada.

5 CONCLUSÃO

Esta dissertação foi efetuada com o objetivo de analisar a variação da produção de leite diária, percentagem de lactose, gordura e proteína, relação gordura/proteína (G/P), concentração de azoto ureico (MUN) e β -hidroxibutirato (BHB), assim como a contagem de células somáticas (SCC), em função dos fatores não-nutricionais (exploração, fase e número de lactação, número de ordenhas diárias e mês do ano) e as inter-relação entre os parâmetros.

Transtorno nutricionais, metabólicos e infecciosos

Constatou-se que, nas 27 explorações amostradas nas 4 regiões do Alentejo (Alto, Baixo, Litoral e Central), a produção de leite diária e a percentagem de gordura e proteína apresentaram valores médios mais elevados do que a média nacional de 2016.

Verificou-se um considerável efeito dos fatores não-nutricionais na produção de leite e na concentração de gordura, BHB, MUN e SCC e, um efeito relativo na concentração e proteína e na relação G/P. A variação da percentagem de lactose consoante estes fatores foi pequena.

A exploração e fase de lactação foram os fatores que proporcionaram a maior variação dos parâmetros. O número de lactação foi o fator que, no geral, originou a menor variação.

Considerando o resultado das correlações de Spearman, verificou-se que, apesar dos baixos valores absolutos, os sinais das correlações corresponderam à relação esperada entre todos os parâmetros.

Os modelos lineares generalizados mistos (GLMM) possibilitaram a interpretação dos resultados com maior facilidade, apresentando maior consistência em termos da ordem de grandeza dos valores dos coeficientes ajustados e da respetiva significância do que os modelos de equações generalizadas (GEE). Verificou-se também, que o GLMM para a concentração de BHB apresentou maior consistência do que para a concentração de MUN.

No modelo A as variáveis explicativas que mais influenciam a concentração de BHB são a produção de leite diária e as interações (fase e número de lactação) e (número de lactação e SCC). No modelo B as variáveis explicativas que mais influenciam a concentração de MUN são a produção de leite diária e a interação (fase e número de lactação).

Estes modelos demonstraram que o efeito das diversas variáveis é diferente consoante as variáveis que integram o modelo. Nomeadamente, no modelo A o efeito da SCC é superior quando o modelo apenas integra a variável SCC e o número de lactação, comparativamente ao modelo que integra a SCC, o número e a fase de lactação.

Desta forma deve salientar-se que os fatores não-nutricionais influenciam, de forma significativa, os parâmetros analisados no contraste leiteiro. Para se conhecer este efeito deve-se utilizar modelos matemáticos que o quantifiquem. A interpretação dos resultados não deve

ser efetuada de forma uni fatorial e deve-se ter em consideração toda a informação do animal e da exploração.

6 BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, M., Hanigan, M. D., Tucker, H. A., Jones, B. L., Garbade, S. K., McGilliard, M. L., ... & James, R. E. (2012). Cow and herd variation in milk urea nitrogen concentrations in lactating dairy cattle. *Journal of dairy science*, 95(12), 7261-7268.
- Albaaj, A., Foucras, G., & Raboisson, D. (2017a). High somatic cell counts and changes in milk fat and protein contents around insemination are negatively associated with conception in dairy cows. *Theriogenology*, 88, 18-27.
- Albaaj, A., Foucras, G., & Raboisson, D. (2017b). Changes in milk urea around insemination are negatively associated with conception success in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100(4), 3257-3265.
- Allen, M. S. & Piantoni, P (2017). *Metabolic Control of Feed Intake - Implications for Metabolic Disease of Fresh Cows*. [On-line]. Retirado de <https://veteriankey.com/control-of-feed-intake/>
- Almeida, B. A. D. S. (2012). Modelo de rentabilidade das explorações leiteiras em S. Miguel: influência dos fatores de produção: da classificação morfológica e da produção leiteira dos bovinos. Tese de Mestrado em Zootecnia. Universidade dos Açores. Açores. Portugal.
- Alvarenga, E. A. (2013). Perfil metabólico de vacas da raça Holandesa durante o período de transição, locais de colheita e métodos de análise de beta hidroxibutirato. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária. Universidade Federal De Minas Gerais. Belo Horizonte. Brasil.
- Amaral-Philips, D. M. (s.d.a). *Tools for Diagnosing Nutritional Problems in Dairy Herds*. [On-Line]. Retirado de:
https://afs.ca.uky.edu/files/tools_for_diagnosing_nutritional_problems_in_dairy_herds.pdf.
- Amaral-Philips, D. M. (s.d.b). *Resolving Nutritional Problems*. [On-Line]. Retirado de:
https://afs.ca.uky.edu/files/resolving_nutritional_problems.pdf
- Amaral-Philips, D. M. (s.d.c). *Using MUN to Monitor your Dairy Feeding and Management Program* [On-Line]. Retirado de: https://afs.ca.uky.edu/files/using_mun_to_monitor_dairy_feeding.pdf
- Amaral-Philips, D. M. (s.d.d). *Using DHIA and PCDART Records to Evaluate Incidences of Mastitis*. [On-Line]. Retirado de: <https://afs.ca.uky.edu/content/using-DHIA-and-pcdart-records-evaluate-incidences-mastitis>
- Amaral-Philips, D. M. (s.d.e). *Early Detection of Potential Nutrition and Management Problems in Dairy Herds Using DHIA-Monthly Milk Production and Composition Data*. [On-Line]. Retirado de <https://afs.ca.uky.edu/dairy/early-detection-potential-nutrition-and-management-problems-dairy-herds-using-DHIA-monthly>.
- Amaral-Philips, D. M. (s.d.f). *Using DHIAA Records for Somatic Cell Count Management*. [On-Line]. Retirado de <http://www2.ca.uky.edu/agcomm/pubs/ID/ID212/ID212.pdf>
- ANABLE (2016). *Publicação de Resultados de 2016*. [On-line]. Disponível em: <https://www.bovinfor.pt/Bovinform/bovinfor.php>.

- Arunvipas, P., Dohoo, I. R., Van Leeuwen, J. A., & Keefe, G. P. (2003). The effect of non-nutritional factors on milk urea nitrogen levels in dairy cows in Prince Edward Island, Canada. *Preventive Veterinary Medicine*, 59(1), 83-93.
- Arunvipas, P., VanLeeuwen, J. A., Dohoo, I. R., Leger, E. R., Keefe, G. P., Burton, A. S., & Lissemore, K. D. (2007). Milk urea-nitrogen negatively affected first-service breeding success in commercial dairy cows in Prince Edward Island, Canada. *Preventive veterinary medicine*, 82(1), 42-50.
- Bates, D. M. (2010). *lme4: Mixed-effects modeling with R*, Springer.
- Barros, J. F. F. (2010). Estudo do pH urinário antes do parto e da temperatura rectal e corpos cetónicos pós-parto, como indicadores para as doenças mais comuns na fase inicial da lactação de vacas leiteiras. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária. Lisboa
- Bastin, C., Laloux, L., Gillon, A., Miglior, F., Soyeurt, H., Hammami, H., ... & Gengler, N. (2009). Modeling milk urea of Walloon dairy cows in management perspectives. *Journal of dairy science*, 92(7), 3529-3540.
- Beaudeau, F., Fourichon, C., Seegers, H., & Bareille, N. (2002). Risk of clinical mastitis in dairy herds with a high proportion of low individual milk somatic-cell counts. *Preventive veterinary medicine*, 53(1), 43-54.
- Bendelja, D., Prpić, Z., Mikulec, N., Ivkić, Z., Havranek, J., & Antunac, N. (2011). Milk urea concentration in Holstein and Simmental cows. *MLjekarstvo*, 61(1), 45-55.
- Berge, A. C., & Vertenten, G. (2014). 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*, 97(4), 2145-2154.
- Berry, D. P., Lee, J. M., Macdonald, K. A., Stafford, K., Matthews, L., & Roche, J. R. (2007). Associations among body condition score, body weight, somatic cell count, and clinical mastitis in seasonally calving dairy cattle. *Journal of dairy science*, 90(2), 637-648.
- Borne, B. H. P., Vernooij, J. C. M., Lupindu, A. M., Van Schaik, G., Frankena, K., Lam, T. J. G. M., & Nielen, M. (2011). Relationship between somatic cell count status and subsequent clinical mastitis in Dutch dairy cows. *Preventive veterinary medicine*, 102(4), 265-273.
- Burgos, S. A., Fadel, J. G., & DePeters, E. J. (2007). Prediction of ammonia emission from dairy cattle manure based on milk urea nitrogen: Relation of milk urea nitrogen to urine urea nitrogen excretion. *Journal of dairy science*, 90(12), 5499-5508.
- Buttchereit, N., Stamer, E., Junge, W., & Thaller, G. (2010). Evaluation of five lactation curve models fitted for fat: protein ratio of milk and daily energy balance. *Journal of Dairy Science*, 93(4), 1702-1712.
- Cabrita, A. R. J. & Fonseca, A. J. M. (2004). A concentração de ureia no leite como método de diagnóstico na alimentação da vaca leiteira— revisão. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, 1, 37-60.
- Campos Gaona, R., Díaz González, F., Coldebella, A., & Lacerda, L. D. A. (2005). Determinação de corpos cetônicos na urina como ferramenta para o diagnóstico rápido de cetose subclínica bovina e relação com a composição do leite. *Archives of Veterinary Science*, 10(2), 49-54.

- Castro, D., Ribeiro, C., & Simões, J. (2009). Medicina da produção: monitorização do balanço energético negativo (BEN) em vacas leiteiras. REDVET. Revista Eletrónica de Veterinária, 10(4).
- ČEJNA, V., & CHLÁDEK, G. (2006). The importance of monitoring changes in milk fat to milk protein ratio in Holstein cows during lactation. Journal of Central European Agriculture, 6(4), 539-546.
- Chaveiro, A. E., Andrade, M., Borba, A. E. S. D., & Silva, J. F. M. D. (2011). Association between plasma and milk urea on the insemination day and pregnancy rate in early lactation dairy cows. Journal of Physiology and Pharmacology Advances, 1(1), 9-14.
- Cinar, M., Serbester, U., Ceyhan, A., & Gorgulu, M. (2015). Effect of somatic cell count on milk yield and composition of first and second lactation dairy cows. Italian Journal of Animal Science, 14(1), 3646.
- Coignard, M., Guatteo, R., Veissier, I., des Roches, A. D. B., Mounier, L., Lehébel, A., & Bareille, N. (2013). Description and factors of variation of the overall health score in French dairy cattle herds using the Welfare Quality® assessment protocol. Preventive veterinary medicine, 112(3), 296-308.
- Cruz, M. L. P. (2015). Distúrbios do metabolismo energético em vacas de alta produção. Tese de Mestrado de Medicina Veterinária. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Porto.
- DeLaval (2011). *Catálogo de productos y soluciones de DeLaval*. [On-line]. Retirado de <http://np.netpublicator.com/netpublication/n76903496>.
- Denis-Robichaud, J., Dubuc, J., Lefebvre, D., & DesCôteaux, L. (2014). Accuracy of milk ketone bodies from flow-injection analysis for the diagnosis of hyperketonemia in dairy cows. Journal of dairy science, 97(6), 3364-3370.
- Diogo C. (2016). O leite faz bem... à economia – produção gera 712 milhões de euros e garante 50 mil empregos. [On-line]. Retirado de <https://www.agroportal.pt/o-leite-faz-bem-a-economia-producao-gera-712-milhoes-de-euros-e-garante-50-mil-empregos/>.
- Dairy Herd Improvement Association (DHIAA) (s.d.a). Explanations and Definitions of SCC on the 302 Herd Summary. [On-line]. Retirado de <https://www.extension.umn.edu/agriculture/dairy/milk-quality-and-mastitis/new-DHIA-mastitis-scc-reports.pdf>
- Dairy Herd Improvement Association (DHIAA) (s.d.b). Milk urea nitrogen (MUN) testing: MUN testing and profitability. [On-line]. Retirado de <http://www.mnDHIAa.org/mun-testing.html>.
- Dias, S. D. F. (2006). Diferentes regimes alimentares sobre a qualidade do leite produzido. Tese de Mestrado em Produção Animal. Universidade do Açores, Açores.
- Doska, M. C., Silva, D. F. F. D., Horst, J. A., Valloto, A. A., Rossi Junior, P., & Almeida, R. D. (2012). Sources of variation in milk urea nitrogen in Paraná dairy cows. Revista Brasileira de Zootecnia, 41(3), 692-697.
- Drift, S. G. A., Jorritsma, R., Schonewille, J. T., Knijn, H. M., & Stegeman, J. A. (2012). Routine detection of hyperketonemia in dairy cows using Fourier transform infrared spectroscopy analysis of β -hydroxybutyrate and acetone in milk in combination with test-day information. Journal of dairy science, 95(9), 4886-4898.

- Duarte, V. L. G. (2010). Alterações quantitativas e qualitativas no perfil dos ácidos gordos da gordura do leite de vaca relacionadas com mudanças na dieta. Tese de Mestrado de Engenharia Zootécnica. Universidade dos Açores. Açores.
- Duffield, T. F., Lissemore, K. D., McBride, B. W., & Leslie, K. E. (2009). Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *Journal of dairy science*, 92(2), 571-580.
- Dürr, J. W., Cue, R. I., Monardes, H. G., Moro-Méndez, J., & Wade, K. M. (2008). Milk losses associated with somatic cell counts per breed, parity and stage of lactation in Canadian dairy cattle. *Livestock Science*, 117(2), 225-232.
- EDIT, (2013). Box Plot: como analisar e interpretar esse gráfico? [On-line]. Retirado de <http://www.escolaedti.com.br/o-que-e-um-box-plot/>
- Ehret, A., Hochstuhl, D., Krattenmacher, N., Tetens, J., Klein, M. S., Gronwald, W., & Thaller, G. (2015). Use of genomic and metabolic information as well as milk performance records for prediction of subclinical ketosis risk via artificial neural networks. *Journal of dairy science*, 98(1), 322-329.
- Enjalbert, F., Nicot, M. C., Bayourthe, C., & Moncoulon, R. (2001). Ketone bodies in milk and blood of dairy cows: Relationship between concentrations and utilization for detection of subclinical ketosis. *Journal of Dairy Science*, 84(3), 583-589.
- eXtension, (2012). *Managing Measures of Feed Costs: Benchmarking Physical and Economic Feed Efficiency*. [On-line]. Retirado de <http://articles.extension.org/pages/26242/managing-measures-of-feed-costs:-benchmarking-physical-and-economic-feed-efficiency>.
- Fatehi, F., Zali, A., Honarvar, M., Dehghan-banadaky, M., Young, A. J., Ghiasvand, M., & Eftekhari, M. (2012). Review of the relationship between milk urea nitrogen and days in milk, parity, and monthly temperature mean in Iranian Holstein cows. *Journal of dairy science*, 95(9), 5156-5163.
- Finch, W.H., Bolin, J.E. and Kelley, K., 2014. *Multilevel modeling using R*. Crc Press.
- Fonseca P. M. D. (2010). Boas práticas agrícolas e certificação de explorações de bovinos de leite. Relatório Final de Estágio de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Porto.
- Frank, B., & Swensson, C. (2002). Relationship between content of crude protein in rations for dairy cows and milk yield, concentration of urea in milk and ammonia emissions. *Journal of Dairy Science*, 85(7), 1829-1838.
- Fuenzalida, M. J., Fricke, P. M., & Ruegg, P. L. (2015). The association between occurrence and severity of subclinical and clinical mastitis on pregnancies per artificial insemination at first service of Holstein cows. *Journal of dairy science*, 98(6), 3791-3805.
- Geerts, N. E., De Brabander, D. L., Vanacker, J. M., De Boever, J. L., & Botterman, S. M. (2004). Milk urea concentration as affected by complete diet feeding and protein balance in the rumen of dairy cattle. *Livestock production science*, 85(2), 263-273.
- Godden, S. M., Lissemore, K. D., Kelton, D. F., Leslie, K. E., Walton, J. S., & Lumsden, J. H. (2001a). Factors associated with milk urea concentrations in Ontario dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 84(1), 107-114.

- Godden, S. M., Kelton, D. F., Lissemore, K. D., Walton, J. S., Leslie, K. E., & Lumsden, J. H. (2001b). Milk urea testing as a tool to monitor reproductive performance in Ontario dairy herds. *Journal of dairy science*, 84(6), 1397-1406.
- Godden, S. M., Lissemore, K. D., Kelton, D. F., Leslie, K. E., Walton, J. S., & Lumsden, J. H. (2001c). Relationships between milk urea concentrations and nutritional management, production, and economic variables in Ontario dairy herds. *Journal of dairy science*, 84(5), 1128-1139
- Gosselin, B. & Adam, S. (2004). Urée du lait. Les rations de vos vaches sont-elles bien équilibrées? *La revue Le producteur de lait québécois* 6, 24-26
- Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral (GPP) (2017). Preços de Produtos Agrícolas. [On-line] Retirado de <http://www.gpp.pt/index.php/sima/precos-de-produtos-agricolas>.
- Grande, P. A., & Santos, G. (2010). Níveis de ureia no leite como ferramenta para utilização das fontes de proteínas na dieta das vacas em lactação. [On-line]. Retirado de <http://www.nupel.uem.br/niveis-ureia-leite.pdf>.
- Guliński, P., Salamończyk, K. M., & Młynek, K. (2016). Improving nitrogen use efficiency of dairy cows in relation to urea in milk—a review. *Animal Science Papers and Reports*, 34(1), 24.
- Haile-Mariam, M., & Pryce, J. E. (2017). Genetic parameters for lactose and its correlation with other milk production traits and fitness traits in pasture-based production systems. *Journal of Dairy Science*, 100(5), 3754-3766.
- Hand, K. J., Godkin, A., & Kelton, D. F. (2012). Milk production and somatic cell counts: A cow-level analysis. *Journal of dairy science*, 95(3), 1358-1362.
- Hardin, J. W., Hilbe, J. M. (2013). *Generalized Estimating Equations*, 2nd Ed., Crc Press.
- Henao-Velásquez, A. F., Múnera-Bedoya, O. D., Herrera, A. C., Agudelo-Trujillo, J. H., & Cerón-Muñoz, M. F. (2014). Lactose and milk urea nitrogen: fluctuations during lactation in Holstein cows. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 43(9), 479-484.
- Hojman, D., Kroll, O., Adin, G., Gips, M., Hanochi, B., & Ezra, E. (2004). Relationships between milk urea and production, nutrition, and fertility traits in Israeli dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 87(4), 1001-1011.
- Hojman, D., Gips, M., & Ezra, E. (2005). Association between live body weight and milk urea concentration in Holstein cows. *Journal of dairy science*, 88(2), 580-584.
- Hosseini-Zadeh, N. G., & Ardalan, M. (2011). Estimation of genetic parameters for milk urea nitrogen and its relationship with milk constituents in Iranian Holsteins. *Livestock Science*, 135(2), 274-281.
- Hristova, V. K., Tomovska, J., Bonev, G., Dimitrov, S., & Ahmad, M. A. (2014). Study of Seasonal Dynamics of Blood Metabolic Profile and Milk Urea Nitrogen (MUN) Level of Cows with Reproductive Disorders. *Asian Academic Research Journal of Multidisciplinary (AARJMD)*, 1(22), 246-260.
- Huhtanen, P., Cabezas-Garcia, E. H., Krizsan, S. J., & Shingfield, K. J. (2015). Evaluation of between-cow variation in milk urea and rumen ammonia nitrogen concentrations and the association with nitrogen utilization and diet digestibility in lactating cows. *Journal of dairy science*, 98(5), 3182-3196.

- International Committee for Animal Recording (ICAR) (2016). *ICAR Guidelines*. [On-line]. Retirado de <http://www.icar.org/index.php/icar-recording-guidelines/>.
- Instituto Nacional de Estatísticas (INE) (2015). *Nuts 2013 - As novas unidades territoriais para fins estatísticos*. [On-line]. Retirado de [http://www.poci-competite2020.pt/admin/images/NUTS2013_\(1\).pdf](http://www.poci-competite2020.pt/admin/images/NUTS2013_(1).pdf)
- Instituto Nacional de Estatísticas (INE) (2016). *Estatísticas da Produção e Consumo de Leite 2015*. Lisboa - Portugal.
- Jadhav, P. V., Tarate, S. B., Bhuvana, M., Das, D. N., & Shome, B. R. (2016). Somatic cell count as a monitoring system for hygienic milk production in India: A review. *Asian Journal Of Dairy and Food Research*, 35(4), 270-277.
- Jankowska, M., Anna, S. A. W. A., & Wojciech, N. E. J. A. (2010). Effect of milk urea and protein levels on fertility indices in cows. *Journal of Central European Agriculture*, 11(4).
- Jílek, F., Rehak, D., Volek, J., Stipkova, M., Nemcova, E., Fiedlerová, M., ... & Svestkova, D. (2006). Effect of herd, parity, stage of lactation and milk yield on urea concentration in milk. *Czech Journal of Animal Science*, 51(12), 510.
- Johnson, R. G., & Young, A. J. (2003). The association between milk urea nitrogen and DHIA production variables in western commercial dairy herds. *Journal of dairy science*, 86(9), 3008-3015.
- Jonker, J. S., & Kohn, R. A. (2001). Using milk urea nitrogen to evaluate diet formulation and environmental impact on dairy farms. *The Scientific World Journal*, 1, 852-859.
- Jorge, D. M. M. A. (2009). *Monitorização da Cetose subclínica*. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto. Porto. Portugal.
- Jorjong, S., van Kneysel, A. T. M., Verwaeren, J., Bruckmaier, R. M., De Baets, B., Kemp, B., & Fievez, V. (2015). Milk fatty acids as possible biomarkers to diagnose hyperketonemia in early lactation. *Journal of dairy science*, 98(8), 5211-5221.
- Kauffman, A. J., & St-Pierre, N. R. (2001). The relationship of milk urea nitrogen to urine nitrogen excretion in holstein and jersey cows¹. *Journal of dairy science*, 84(10), 2284-2294.
- Kneysel, A. T. M., Van Der Drift, S. G. A., Horneman, M., de Roos, A. P. W., Kemp, B., & Graat, E. A. M. (2010). Ketone body concentration in milk determined by Fourier transform infrared spectroscopy: Value for the detection of hyperketonemia in dairy cows. *Journal of dairy science*, 93(7), 3065-3069.
- Kgole, M. L., Visser, C., & Banga, C. B. (2012). Environmental factors influencing milk urea nitrogen in South African Holstein cattle. *South African Journal of Animal Science*, 42(5), 459-463.
- Koeck, A., Jamrozik, J., Schenkel, F. S., Moore, R. K., Lefebvre, D. M., Kelton, D. F., & Miglior, F. (2014). Genetic analysis of milk β -hydroxybutyrate and its association with fat-to-protein ratio, body condition score, clinical ketosis, and displaced abomasum in early first lactation of Canadian Holsteins. *Journal of Dairy Science*, 97(11), 7286-7292.

- Konjačić, M., Kelava, N., Ivkić, Z., Ivanković, A., Prpić, Z., Vnućec, I., ... & Mijić, P. (2010). Non-nutritional factors of milk urea concentration in Holstein cows from large dairy farms in Croatia. *MLjekarstvo*, 60(3), 166-174.
- Laeger, T., Metges, C. C., & Kuhla, B. (2010). Role of β -hydroxybutyric acid in the central regulation of energy balance. *Appetite*, 54(3), 450-455.
- Larsen, T., & Nielsen, N. I. (2005). Fluorometric determination of β -hydroxybutyrate in milk and blood plasma. *Journal of dairy science*, 88(6), 2004-2009.
- Lavon, Y., Ezra, E., Leitner, G., & Wolfenson, D. (2011). Association of conception rate with pattern and level of somatic cell count elevation relative to time of insemination in dairy cows. *Journal of dairy science*, 94(9), 4538-4545.
- LeBlanc, S. (2010). Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *Journal of reproduction and Development*, 56(S), S29-S35.
- Lomander, H., Svensson, C., Hallén-Sandgren, C., Gustafsson, H., & Frössling, J. (2013). Associations between decreased fertility and management factors, claw health, and somatic cell count in Swedish dairy cows. *Journal of dairy science*, 96(10), 6315-6323.
- Mahrt, A., Burfeind, O., & Heuwieser, W. (2015). Evaluation of hyperketonemia risk period and screening protocols for early-lactation dairy cows. *Journal of dairy science*, 98(5), 3110-3119.
- Marcos, R. A. R. (2014). Avaliação de Fatores de Risco da Cetose Subclínica em Bovinos Leiteiros na Ilha de São Miguel – Açores. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária. Universidade de Trás-os-Montes e Alto douro. Vila Real.
- Marques F. I. R. (2013). Efeito do B.E.N. da Recuperação Metabólica, Produtiva e Reprodutiva em Bovinos Leiteiros. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Lusófona de Humanidade e Tecnologia. Lisboa.
- Márquez, A. C. (2006). Urea en leche: uso, interpretacion y relacion con la proteína lactea. University of Prince Edward Island. Charlottetown. Canada.
- Martinez, J. (2010). Guia rápido para nutrição de vacas leiteiras. [On-line]. Retirado de <https://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/nutricao/guia-rapido-para-nutricao-de-vacas-leiteiras-60707n.aspx>
- Martins, A. M., Silvestre, A. M., Petim-Batista, M. F., & Colaço, J. A. (2011). Somatic cell score genetic parameter estimates of dairy cattle in Portugal using fractional polynomials. *Journal of animal science*, 89(5), 1281-1285.
- McAllister, J. (s.d.a). *Measuring and Managing Using DHIA Records*. [On-line]. Retirado de https://afs.ca.uky.edu/files/measuring_and_managing_using_DHIA_records.pdf.
- McAllister, J. (s.d.b). *DHIA Records Pay*. [On-line]. Retirado de https://afs.ca.uky.edu/files/DHIA_records_pay.pdf
- McArt, J. A., Nydam, D. V., Oetzel, G. R., Overton, T. R., & Ospina, P. A. (2013). Elevated non-esterified fatty acids and β -hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. *The Veterinary Journal*, 198(3), 560-570.

- McArt, J. A. A., Nydam, D. V., & Overton, M. W. (2015). Hyperketonemia in early lactation dairy cattle: A deterministic estimate of component and total cost per case. *Journal of dairy science*, 98(3), 2043-2054.
- McArt, J. (2016). *Industry presentation - Impact and economic evaluation of negative energy balance in transition dairy cattle*. Documento apresentado na Conferência de Planos Elevados para a Indústria do Leite. Lubbock. Estados Unidos da América.
- McGill University (s.d.). *Feeding the dairy cow during lactation*. [On-line]. Retirado de http://smallfarms.oregonstate.edu/sites/default/files/feeding_milking_cow.pdf.
- Meyer, P. M., Machado, P. F., Coldebella, A., Cassoli, L. D., Coelho, K. O., & Rodrigues, P. H. M. (2006). Effects of non-dietary factors on milk urea nitrogen in lactating Holstein cows. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35(3), 1114-1121.
- Miglior, F., Sewalem, A., Jamrozik, J., Lefebvre, D. M., & Moore, R. K. (2006). Analysis of milk urea nitrogen and lactose and their effect on longevity in Canadian dairy cattle. *Journal of dairy science*, 89(12), 4886-4894.
- Miglior, F., Sewalem, A., Jamrozik, J., Bohmanova, J., Lefebvre, D. M., & Moore, R. K. (2007). Genetic analysis of milk urea nitrogen and lactose and their relationships with other production traits in Canadian Holstein cattle. *Journal of Dairy Science*, 90(5), 2468-2479.
- Miguens, P. F. M. (2016). *Implicações do Balanço Energético Negativo durante o Período Seco – Um estudo preliminar*. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Lusófona de Humanidade e Tecnologia. Lisboa.
- Miller, R. H., Clay, J. S., & Norman, H. D. (2001). Relationship of somatic cell score with fertility measures. *Journal of dairy science*, 84(11), 2543-2548.
- Miranda, P. M. M. (2014). *Análise das concentrações de ureia no leite de vacas frísias holstein da ilha de São Miguel (Açores): estudo da sua relação com o arraçamento e dos seus efeitos nos índices reprodutivos*. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária. Lisboa
- Moreira, B. E. S. (2015). *Avaliação do ph ruminal de vacas leiteiras em Portugal - relação com parâmetros ambientais, produtivos e fisiológicos*. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária. Lisboa
- Mutsvangwa, T., Davies, K. L., McKinnon, J. J., & Christensen, D. A. (2016). Effects of dietary crude protein and rumen-degradable protein concentrations on urea recycling, nitrogen balance, omasal nutrient flow, and milk production in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 99(8), 6298-6310.
- Nielsen, N. I., Friggens, N. C., Chagunda, M. G., & Ingvarsen, K. L. (2005). Predicting risk of ketosis in dairy cows using in-line measurements of β -hydroxybutyrate: A biological model. *Journal of Dairy Science*, 88(7), 2441-2453.
- Nousiainen, J., Shingfield, K. J., & Huhtanen, P. (2004). Evaluation of milk urea nitrogen as a diagnostic of protein feeding. *Journal of Dairy Science*, 87(2), 386-398.
- Nunes A. F. (2004). *Leite – Mecanismo de Produção*.

- Oetzel, G. R. (2004). Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 20(3), 651-674.
- Ospina, P. A., Nydam, D. V., Stokol, T., & Overton, T. R. (2010a). Association between the proportion of sampled transition cows with increased nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate and disease incidence, pregnancy rate, and milk production at the herd level. *Journal of Dairy Science*, 93(8), 3595-3601.
- Ospina, P. A., Nydam, D. V., Stokol, T., & Overton, T. R. (2010b). Associations of elevated nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the Northeastern United States. *Journal of dairy science*, 93(4), 1596-1603.
- Ospina, P. A., Nydam, D. V., Stokol, T., & Overton, T. R. (2010c). Evaluation of nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *Journal of Dairy Science*, 93(2), 546-554.
- Ospina, P. A., McArt, J. A., Overton, T. R., Stokol, T., & Nydam, D. V. (2013). Using nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate concentrations during the transition period for herd-level monitoring of increased risk of disease and decreased reproductive and milking performance. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 29(2), 387-412.
- Pacheco, S. M. F. (2013). Estudo de alguns índices reprodutivos em vacaria de bovinos leiteiros. Tese de Mestrado de Engenharia Zootécnica – Produção Animal. Instituto superior de Agronomia. Lisboa.
- Pantoja, J. C. F., Hulland, C., & Ruegg, P. L. (2009). Somatic cell count status across the dry period as a risk factor for the development of clinical mastitis in the subsequent lactation. *Journal of dairy science*, 92(1), 139-148.
- Pimentel, P. M. D. S. (2011). Azoto ureico no leite (AUL/MUN): uma ferramenta de gestão da qualidade. Tese de Mestrado de Tecnologia e Segurança Alimentar. Universidade dos Açores. Açores.
- Pinheiro, J. C. & Chao, E. C. (2006). Efficient Laplacian and Adaptive Gaussian Quadrature Algorithms for Multilevel Generalized Linear Mixed Models. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 15(1), pp 58-81.
- Portaria nº 1066/91 de 22 de outubro. 1991, Série I-B de 1991-10-22. Regulamento do Contraste Leiteiro da Espécie Bovina.
- Prentice, R.L. and Zhao, L.P. (1991). Estimating equations for parameters in means and covariances of multivariate discrete and continuous responses. *Biometrics*, 47 825-839.
- Queiroga, M. C. (2016). O que são as células somáticas do leite? [On-line]. Retirado de <https://www.milkpoint.pt/seccao-tecnica/qualidade-do-leite/o-que-sao-as-celulas-somaticas-do-leite-99020n.aspx>.
- Quist, M. A., LeBlanc, S. J., Hand, K. J., Lazenby, D., Miglior, F., & Kelton, D. F. (2008). Milking-to-milking variability for milk yield, fat and protein percentage, and somatic cell count. *Journal of dairy science*, 91(9), 3412-3423.

- R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [On-line] Disponível em <https://www.R-project.org/>.
- Raboisson, D., Mounie, M., Khenifar, E., & Maigne, E. (2015). The economic impact of subclinical ketosis at the farm level: tackling the challenge of over-estimation due to multiple interactions. *Preventive veterinary medicine*, 122(4), 417-425.
- Rajala-Schultz, P. J., Saville, W. J. A., Frazer, G. S., & Wittum, T. E. (2001). Association between milk urea nitrogen and fertility in Ohio dairy cows. *Journal of dairy science*, 84(2), 482-489.
- Rajala-Schultz, P. J., & Saville, W. J. A. (2003). Sources of variation in milk urea nitrogen in Ohio dairy herds. *Journal of dairy science*, 86(5), 1653-1661.
- Roberts, T., Chapinal, N., LeBlanc, S. J., Kelton, D. F., Dubuc, J., & Duffield, T. F. (2012). Metabolic parameters in transition cows as indicators for early-lactation culling risk. *Journal of dairy science*, 95(6), 3057-3063.
- Rodrigues, A. M., Guimarães, J., & Oliveira, C. (2012). Rentabilidade das explorações leiteiras em Portugal-dados técnicos e económicos. V Jornadas de Bovinicultura, IAAS-UTAD, 30-31 março 2012, 109-129.
- Roos, A. P. W., Van Den Bijgaart, H. J. C. M., Hørlyk, J., & De Jong, G. (2007). Screening for subclinical ketosis in dairy cattle by Fourier transform infrared spectrometry. *Journal of dairy science*, 90(4), 1761-1766.
- Salamończyk, E., & Guliński, P. (2015). Differences in the level of urea in milk between standard and extended lactation period and the impact on the environment. *Acta Scientiarum Polonorum. Zootechnica*, 14(2).
- Ruralban (2017). Medidor de leite Waikato Mark V 30 kg – original. [On-line]. Retirado de <https://www.ruralban.com/ordenhadeira-mecanica/acessorios/medidor-de-leite-waikato-mark-v-30-kg-original>.
- Salvador, N. (2014, março). *Contraste Leiteiro*. Apresentação feita na 7ª Jornada Agrícola da Praia da Vitória, Porto Martins, Portugal.
- Santschi, D. E., Lacroix, R., Durocher, J., Duplessis, M., Moore, R. K., & Lefebvre, D. M. (2016). Prevalence of elevated milk β -hydroxybutyrate concentrations in Holstein cows measured by Fourier-transform infrared analysis in Dairy Herd Improvement milk samples and association with milk yield and components. *Journal of dairy science*, 99(11), 9263-9270.
- Schwarz, D., Lefebvre, D. M., van den Bijgaart, H., Davière, J. B., van der Linde, R., & Kold-Christensen, S. (2015). Global experience on ketosis screening by FTIR technology. In Proc. Technical Meeting of the International Committee for Animal Recording (ICAR) (pp. 5-10). ICAR, Rome, Italy.
- Sharma, N., Singh, N. K., & Bhadwal, M. S. (2011). Relationship of somatic cell count and mastitis: An overview. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24(3), 429-438.
- Shin, E. K., Jeong, J. K., Choi, I. S., Kang, H. G., Hur, T. Y., Jung, Y. H., & Kim, I. H. (2015). Relationships among ketosis, serum metabolites, body condition, and reproductive outcomes in dairy cows. *Theriogenology*, 84(2), 252-260.

- Shingfield, K. J., Bonnet, M., & Scollan, N. D. (2013). Recent developments in altering the fatty acid composition of ruminant-derived foods. *animal*, 7(s1), 132-162.
- Signoretti, R (2010). Manejo Nutricional de vacas leiteiras em produção. Retirado de <http://www.coanconsultoria.com.br/noticias.asp?id=102>
- Silvestre, A., Petim-Batista, F., & Colaço, J. (2003a). Longitudinal study of the milk production and composition. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, 2, 23-33.
- Silvestre, A., Petim-Batista, F., & Colaço, J. (2003b). Approach to the characterization of dairy cow productive cycle in Portugal. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, 1, 23-36.
- Silvestre, A., Petim-Batista, F., & Colaço, J. (2005). Study of daily milk yield data. Part I: the daily deviation and the milking interval. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, 1, 49-5
- Skrondal, A. & Rabe-Hesketh, S. (2004). Generalized Latent Variable Modeling: Multilevel, longitudinal, and structural equation models. Chapman & Hall/CRC Press.
- Spek, J. W., Dijkstra, J., Van Duinkerken, G., & Bannink, A. (2013). A review of factors influencing milk urea concentration and its relationship with urinary urea excretion in lactating dairy cattle. *The Journal of Agricultural Science*, 151(3), 407-423.
- Spek, J. W., Dijkstra, J., & Bannink, A. (2016). Influence of milk urea concentration on fractional urea disappearance rate from milk to blood plasma in dairy cows. *Journal of dairy science*, 99(5), 3880-3888.
- Suthar, V. S., Canelas-Raposo, J., Deniz, A., & Heuwieser, W. (2013). Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows. *Journal of dairy science*, 96(5), 2925-2938.
- Tatone, E. H., Gordon, J. L., Hubbs, J., LeBlanc, S. J., DeVries, T. J., & Duffield, T. F. (2016). A systematic review and meta-analysis of the diagnostic accuracy of point-of-care tests for the detection of hyperketonemia in dairy cows. *Preventive veterinary medicine*, 130, 18-32.
- Tatone, E. H., Duffield, T. F., LeBlanc, S. J., DeVries, T. J., & Gordon, J. L. (2017). Investigating the within-herd prevalence and risk factors for ketosis in dairy cattle in Ontario as diagnosed by the test-day concentration of β -hydroxybutyrate in milk. *Journal of dairy science*, 100(2), 1308-1318.
- Tavares M. R. (2015). Boas Práticas de Higiene na ordenha – uma proposta de intervenção. Tese de Mestrado de Tecnologia e Segurança Alimentar. Universidade dos Açores. Açores.
- The Dairy Nutrition Specialist (2017). Seis fases para melhorar a nutrição e a produção de leite. [On-line]. Retirado de <https://dairynutritionspecialists.co.nz/dairy-nutrition/six-stages-to-better-nutrition-and-higher-milk-production/>
- Toni, F., Vincenti, L., Grigoletto, L., Ricci, A., & Schukken, Y. H. (2011). Early lactation ratio of fat and protein percentage in milk is associated with health, milk production, and survival. *Journal of dairy science*, 94(4), 1772-1783.
- Vanholder, T., Papen, J., Bemers, R., Vertenten, G., & Berge, A. C. B. (2015). Risk factors for subclinical and clinical ketosis and association with production parameters in dairy cows in the Netherlands. *Journal of dairy science*, 98(2), 880-888.

- Vaz, P. (2016). *Contraste Leiteiro – Bovinfor*. Manuscrito não publicado. Universidade de Évora, Évora.
- Viña, C., Fouz, R., Camino, F., Sanjuán, M. L., Yus, E., & Diéguez, F. J. (2016). Study on some risk factors and effects of bovine ketosis on dairy cows from the Galicia region (Spain). *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 101(5), 835-845.
- Walsh, R. B., Walton, J. S., Kelton, D. F., LeBlanc, S. J., Leslie, K. E., & Duffield, T. F. (2007). The effect of subclinical ketosis in early lactation on reproductive performance of postpartum dairy cows. *Journal of dairy science*, 90(6), 2788-2796.
- Wattiaux, M. A. (2011). Bovinocultura de Leite - 12 pt. [On-line]. Retirado de <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAf1FUAC/bovinocultura-leite-12-pt>
- Weller, J. I., & Ezra, E. (2016). Genetic and phenotypic analysis of daily Israeli Holstein milk, fat, and protein production as determined by a real-time milk analyzer. *Journal of dairy science*, 99(12), 9782-9795.
- Weeks, H. L., & Hristov, A. N. (2017). Analytical method and amount of preservative added to milk samples may alter milk urea nitrogen measurements. *Journal of dairy science*, 100(2), 1502-1506.
- Wilson, D. J., & Goodell, G. M. (2013). Comparison of blood strips, milk strips and automated milk measurement of beta-hydroxybutyrate in periparturient dairy cattle and resultant diagnoses of ketosis. *J. Vet. Sci. Technol.*, 4, 136-138.
- Zeger, S.L. and Liang, K.Y. (1986) longitudinal data analysis for discrete and continuous outcomes. *Biometrics*, 42 121–130.
- Zoche-Golob, V., Heuwieser, W., & Krömker, V. (2015). Investigation of the association between the test day milk fat–protein ratio and clinical mastitis using a Poisson regression approach for analysis of time-to-event data. *Preventive veterinary medicine*, 121(1), 64-73.
- Zuur, A. F.; Ieno, E. N.; Walker, N. J.; Saveliev, A., A.; Smith, G., M. (2009). *Mixed Effect Models and Extensions in Ecology*, Springer.

7 ANEXOS

Anexo 1 – Métodos internacionais de referência (Adaptado de ICAR, 2016).

Parâmetro	Método	
Gordura (%)	Método Gravimétrico (Röse-Gottlieb)	ISO 1211 IDF 1 AOAC 905.02 (IDF-ISO-AOAC-Codex)
	Método Gravimétrico (Mojonnier modificado)	AOAC 989.05 (IDF-ISO-AOAC) ISO 8968 IDF 20
Proteína (%)	Método Tetramétrico (Kjeldahl)	AOAC 991:20 (IDF-ISO-AOAC)
		AOAC 991:21
		AOAC 991:22 (IDF-ISO-AOAC) AOAC 991:23 (IDF-ISO-AOAC-Codex)
Concentração de MUN (mg/kg)	Método diferencial de pH (Método de Referência)	ISO 14637 IDF 195
SCC (x10 ³ células/mL)	Método da Microscopia (Método de Referência)	ISO 13366-1 IDF 148-1

Anexo 2 - Métodos de rotina instrumentais (Adaptado de ICAR, 2016)

Parâmetro	Método	Instrumento / Método
Gordura (%)	Método Turbidimétrico	MilkoTester (Foss Electric, DK)
Gordura (%) e Proteína (%)	Método Turbidimétrico / Ligação de Corantes	MTA-PMA (Foss Electric, DK)
		102, 103, 104, 104 (A/B), 133 A, 133 B, 134 (A/B), 203 A, 203 B, 300, 255 (A ou B), 605 (A or B), series 4000 (A ou B) FT 120 (FTIR), FT 6000 (FTIR)
Gordura (%), Proteína (%) (e Lactose (%))	Espectrometria de infravermelhos média	Milkoscan (Foss Electric, DK)
		Multispec (Multispec, UK)
		Bentley (Bentley, USA)
		Lactoscope (Instrumentos Delta, NL)
Concentração de MUN (mg/kg)	Método Colorimétrico	Aegys (Instrumentos Anadis, F)
		MI 600 (FTIR)
		1-4 paradimetilaminobenzaldeído método (DMAB)
		Método de diacetil monoxime (DAM)
Concentração de MUN (mg/kg)	Métodos enzimáticos automatizados	Conductimetria
		PH diferencial
		Fotometria UV
		Injeção de fluxo de análise (FIA)
Concentração de MUN (mg/kg)	Espectrometria de infravermelho média:	Chemspec 150 (Bentley, EUA), Skalar fluxo segmentado de análise
		Fotometria-Visível
		Milkoscan (Foss Electric, DK)
		4000, FT 120 (FTIR), FT 6000 (FTIR)
Concentração de MUN (mg/kg)	Contagem de Partículas	Lactoscópio (Instrumentos Delta)
		FTIR Auto 400
Concentração de MUN (mg/kg)	Citrometria de Disco	Fluoro-opto-eletrônico
		Coultronic (UK)
		Couter Counter
		Foss Eletrônico (DK)
SCC (x10 ³ células/mL)	Citrometria de Fluxo	Fossomatic 90, 180, 215, 250, 360, 400
		Contador de Células Somáticas 300, 500
		Anadis (F)
		Somacount 150, 300, 500
SCC (x10 ³ células/mL)	Citrometria de Fluxo	Bentley (USA)
		Chemunex (D)
		Partec CA 11
		Somascope MKII Manual, MKII Auto
SCC (x10 ³ células/mL)	Citrometria de Fluxo	Instrumentos Delta (NL)
		200, MKII Auto 400
SCC (x10 ³ células/mL)	Citrometria de Fluxo	Foss Eletrônico (DK)
		Fossomatic 5000

Anexo 3 – Exemplo de um ficheiro de Excel (2013), por exploração, fornecidos pela EABL.

exploracao	data	idpart	snirb	tipocontraste	dataparto	nlac	diaslac	leite1	leite2	leite3	total	netiqueta	proteina	gordura	ccs	ureia	extratoseco	lactose	bhb	contrastador
K	2015-01-15 00:00:00.0			5	2014-02-12 00:00:00.0	537	106	12.0	0.0	22.6		4.3	4.02	2711	206	9.84	4.85	0.0		
K	2015-01-15 00:00:00.0			5	2014-07-10 00:00:00.0	189	12.0	14.0	0.0	26.0		3.78	3.75	1130	531	9.12	4.65	0.04		
K	2015-01-15 00:00:00.0			5	2014-07-19 00:00:00.0	180	12.0	10.7	0.0	22.7		3.28	3.55	5724	191	8.63	4.78	0.01		
K	2015-01-15 00:00:00.0			5	2014-10-06 00:00:00.0	101	18.4	20.0	0.0	38.4		3.51	3.33	193	211	9.01	4.98	0.0		
K	2015-01-15 00:00:00.0			5	2014-04-24 00:00:00.0	266	10.0	10.0	0.0	20.0		3.89	4.87	1259	289	9.18	4.65	0.02		
K	2015-01-15 00:00:00.0			5	2014-08-09 00:00:00.0	128	18.4	17.4	0.0	33.8		3.27	4.0	119	290	8.6	4.82	0.0		
K	2015-01-15 00:00:00.0			5	2014-08-26 00:00:00.0	234	13.2	15.4	0.0	28.99998		4.25	3.79	419	324	9.72	4.84	0.0		
K	2015-01-15 00:00:00.0			5	2014-05-01 00:00:00.0	259	10.4	10.0	0.0	20.4		3.8	3.75	511	223	9.21	5.0	0.0		
K	2015-01-15 00:00:00.0			5	2014-06-09 00:00:00.0	220	10.0	9.0	0.0	18.0		3.44	2.81	48	219	8.93	4.88	0.08		
K	2015-01-15 00:00:00.0			5	2014-07-16 00:00:00.0	183	17.4	18.4	0.0	35.8		3.28	3.74	18	184	8.62	4.69	0.02		
K	2015-01-15 00:00:00.0			5	2014-10-06 00:00:00.0	101	18.8	15.5	0.0	32.3		3.12	0.0	57	249	8.66	5.02	0.0		
K	2015-01-15 00:00:00.0			5	2014-11-09 00:00:00.0	67	8.8	14.0	0.0	22.8		3.49	2.69	21	340	9.26	5.24	0.0		
K	2015-01-15 00:00:00.0			5	2014-08-10 00:00:00.0	219	11.8	13.0	0.0	24.8		4.07	3.42	110	254	9.78	5.08	0.0		
K	2015-01-15 00:00:00.0			5	2014-02-04 00:00:00.0	345	10.0	11.8	0.0	21.8		3.68	3.68	35	288	9.39	5.18	0.01		
K	2015-01-15 00:00:00.0			5	2014-11-29 00:00:00.0	47	8.5	10.0	0.0	19.5		3.89	4.08	292	297	9.16	4.28	0.0		
K	2015-01-15 00:00:00.0			5	2014-07-31 00:00:00.0	168	11.8	14.0	0.0	25.8		4.07	5.24	116	281	9.82	5.03	0.0		
K	2015-01-15 00:00:00.0			5	2014-11-05 00:00:00.0	71	20.0	18.0	0.0	38.0		3.24	4.98	2430	224	8.58	4.72	0.02		
K	2015-01-15 00:00:00.0			5	2014-10-01 00:00:00.0	108	19.6	20.2	0.0	39.800003		3.1	3.07	147	306	8.39	4.75	0.0		
K	2015-01-15 00:00:00.0			5	2014-08-10 00:00:00.0	158	14.8	13.6	0.0	28.2		3.96	4.15	678	259	9.25	4.64	0.0		
K	2015-01-15 00:00:00.0			5	2014-09-04 00:00:00.0	133	12.4	12.8	0.0	25.2		3.48	4.8	1455	259	8.88	4.63	0.08		
K	2015-01-15 00:00:00.0			5	2014-08-18 00:00:00.0	150	18.0	14.8	0.0	32.8		3.21	3.77	25	323	8.84	5.11	0.0		
K	2015-01-15 00:00:00.0			5	2014-08-08 00:00:00.0	160	25.1	14.4	0.0	39.5		3.89	2.49	293	243	9.47	4.92	0.0		
K	2015-01-15 00:00:00.0			5	2015-01-01 00:00:00.0	14	21.7	17.4	0.0	39.1		3.28	2.92	18	163	8.88	4.88	0.03		
K	2015-01-15 00:00:00.0			5	2014-12-04 00:00:00.0	42	21.0	23.4	0.0	44.4		2.92	3.69	1802	271	8.31	4.79	0.0		
K	2015-01-15 00:00:00.0			5	2014-08-14 00:00:00.0	123	22.4	20.8	0.0	43.199997		3.37	3.34	840	227	8.92	4.94	0.0		

(data – data da realização dos contrastes; idpart – identificação particular do animal; snirb – número de identificação oficial do animal; tipocontrastes; nlac – número de lactação; diaslac – dias em lactação; leite1, leite 2 e leite 3 – produção de leite (Kg) em cada ordenha; total – produção de leite diária total (Kg); netiqueta – número de etiqueta; proteína – percentagem de proteína (%); gordura – percentagem de gordura (%); ccs – contagem de células somáticas (x10³ células/mL); ureia – concentração de MUN (mg/Kg); lactose – percentagem de lactose (%); bhb – concentração de bhb (mmol/L); contrastador – código do contrastador).

Anexo 4 - Ficheiro de Excel (2013) final com todos os dados filtrados compilados.

exploracao	snirb	datacontraste	mescontraste	nlac	classesnlac	diaslac	nordenha	leitediario	proteina	gordura	g.p	ccs	ureia	lactose	bhb
AA		16/07/2016	7	3	3	283	2	21,70	5,75	4,67	0,81	2452	143	1,12	0,00
F		20/11/2015	11	1	1	12	2	22,60	1,04	3,67	3,53	40	71	1,16	0,11
M		29/08/2016	8	1	1	311	2	25,70	3,60	3,68	1,02	6023	72	1,26	0,00
Y		23/05/2016	5	4	4	196	2	34,30	1,09	3,73	3,42	33	67	1,46	0,03
Y		22/12/2015	12	1	1	165	2	28,80	1,18	1,50	1,27	101	130	1,69	0,02
Y		16/11/2016	11	2	2	292	2	20,60	1,32	3,28	2,48	62	78	1,72	0,02
Y		23/06/2016	6	2	2	466	2	19,30	1,54	2,11	1,37	33	98	1,86	0,11
Y		22/10/2015	10	2	2	272	2	32,50	1,50	1,95	1,30	31	105	1,93	0,12
Y		19/09/2016	9	2	2	248	2	37,20	1,68	1,87	1,11	17	79	2,00	0,15
Y		19/10/2016	10	1	1	354	2	30,90	1,65	1,96	1,19	97	93	2,00	0,01
X		12/11/2015	11	3	3	351	4	21,00	1,75	1,72	0,98	153	62	2,01	0,22
Y		21/01/2016	1	6	5	108	2	36,50	1,38	2,01	1,46	40	149	2,03	0,04
I		09/07/2016	7	4	4	301	2	11,30	6,28	7,84	1,25	5261	461	2,04	0,57
Y		16/11/2016	11	1	1	345	2	27,40	1,63	2,10	1,29	99	68	2,11	0,06
O		12/07/2016	7	4	4	390	2	19,20	3,96	4,60	1,16	13448	16	2,11	0,30

Anexo 5 - Correlações de Spearman.

	Gordura (%)	Proteína (%)	Relação G/P	Lactose (%)	Concentração de MUN (mg/kg)	SCC (x10 ³ células/mL)	Concentração de BHB (mmol/L)	Nº de Lactação	DEL	Mês	Nº de Ordenhas
Produção de Leite (kg/dia)	-,190***	-,525***	,036***	,087***	,020***	-,178***	-,070***	,272***	-,486***	-,194***	,240***
Gordura (%)		,335***	,882***	-,140***	-,057***	,010**	,250***	,066***	,098***	,020***	-,204***
Proteína (%)			-,095***	-,062***	,020***	,133***	,003	-,060***	,532***	,125***	-,051***
Relação G/P				-,111***	-,071***	-,051***	,266***	,088***	-,136***	-,037***	-,193***
Lactose (%)					,059***	-,303***	-,223***	-,358***	-,136***	-,119***	,095***
Concentração de MUN (mg/kg)						-,015***	-,148***	-,010**	,070***	-,052***	,077***
SCC (x10 ³ células/mL)							,101***	,125***	,162***	,041***	-,084***
Concentração de BHB (mmol/L)								,037***	,095***	,114***	-,016***
Nº de Lactação									-,009*	-,007*	-,046***
DEL										,260***	-,004
Mês											-,013***

Anexo 6 - Número de animais por exploração.

Exploração	Nº de Animais	DP
A	127	1,33
AA	374	3,93
B	121	1,27
C	373	3,92
D	239	2,51
E	423	4,44
F	1195	12,55
G	861	9,04
H	119	1,25
I	278	2,92
J	461	4,84
K	155	1,63
L	592	6,22
M	134	1,41
N	10	0,11
O	551	5,79
P	583	6,12
Q	157	1,65
R	167	1,75
S	567	5,95
T	221	2,32
U	783	8,22
V	278	2,92
W	288	3,02
X	159	1,67
Y	191	2,01
Z	116	1,22
Total	9523	100,00

Anexo 7 – Médias, desvios padrões e medianas da produção de leite diária e percentagem de lactose, consoante a exploração.

Exploração	Produção de Leite (kg/dia)		Lactose (%)	
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana
A	29,6 ± 6,8	28,9	4,80 ± 0,23	4,82
AA	31,6 ± 8,3	30,4	4,92 ± 0,26	4,96
B	32,1 ± 8,9	30,9	4,84 ± 0,23	4,86
C	34,9 ± 7,9	33,9	4,77 ± 0,21	4,78
D	32,6 ± 9,2	31,9	4,77 ± 0,25	4,81
E	31,0 ± 8,3	30,1	5,00 ± 0,21	5,02
F	34,9 ± 8,6	34	4,88 ± 0,22	4,9
G	38,1 ± 9,2	37,4	4,89 ± 0,25	4,93
H	26,0 ± 6,3	25	4,82 ± 0,25	4,84
I	28,9 ± 8,5	28,3	4,77 ± 0,26	4,8
J	36,9 ± 8,5	35,9	4,94 ± 0,22	4,97
K	30,2 ± 8,2	30	4,89 ± 0,25	4,92
L	40,3 ± 9,2	39,7	4,94 ± 0,22	4,95
M	28,6 ± 6,1	28,1	4,82 ± 0,34	4,88
N	23,8 ± 7,5	23,2	4,82 ± 0,20	4,85
O	30,7 ± 8,6	29,5	4,81 ± 0,24	4,84
P	35,9 ± 9,6	34,9	4,88 ± 0,24	4,9
Q	39,0 ± 11,1	38,7	4,85 ± 0,24	4,88
R	33,6 ± 8,7	33,3	4,94 ± 0,23	4,97
S	41,5 ± 10,5	40,6	4,88 ± 0,20	4,9
T	30,5 ± 7,6	29,6	4,81 ± 0,22	4,83
U	33,9 ± 9,1	33,3	4,91 ± 0,23	4,94
V	34,4 ± 8,9	33,4	4,81 ± 0,20	4,82
W	47,2 ± 11,0	45,5	4,93 ± 0,20	4,96
X	31,5 ± 8,1	30,4	4,90 ± 0,27	4,94
Y	34,2 ± 7,9	33,7	4,74 ± 0,49	4,85
Z	31,9 ± 8,9	31,1	4,88 ± 0,24	4,9

Anexo 8 - Médias, desvios padrões e medianas da percentagem de gordura e de proteína, consoante a exploração.

Exploração	Gordura (%)		Proteína (%)	
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana
A	3,51 ± 0,80	3,46	3,18 ± 0,37	3,14
AA	4,54 ± 0,91	4,45	3,59 ± 0,39	3,57
B	4,30 ± 0,99	4,24	3,25 ± 0,36	3,23
C	3,85 ± 1,02	3,82	3,40 ± 0,39	3,36
D	4,78 ± 1,10	4,71	3,58 ± 0,45	3,55
E	3,80 ± 0,77	3,76	3,41 ± 0,33	3,38
F	4,94 ± 1,01	4,89	3,36 ± 0,40	3,32
G	3,23 ± 0,98	3,11	3,34 ± 0,35	3,32
H	3,98 ± 0,75	3,93	3,29 ± 0,34	3,27
I	4,45 ± 1,28	4,35	3,47 ± 0,44	3,4
J	4,13 ± 0,98	4,02	3,29 ± 0,34	3,27
K	4,32 ± 0,94	4,27	3,38 ± 0,39	3,37
L	4,08 ± 1,06	3,99	3,30 ± 0,38	3,26
M	4,05 ± 1,02	3,94	3,27 ± 0,38	3,24
N	3,70 ± 0,92	3,47	3,26 ± 0,42	3,2
O	4,65 ± 1,08	4,56	3,48 ± 0,40	3,46
P	4,05 ± 1,06	3,96	3,28 ± 0,40	3,24
Q	3,97 ± 0,94	3,93	3,23 ± 0,38	3,19
R	3,66 ± 0,85	3,61	3,29 ± 0,34	3,26
S	4,45 ± 0,90	4,41	3,37 ± 0,38	3,35
T	4,04 ± 0,99	3,98	3,40 ± 0,34	3,37
U	4,01 ± 0,86	3,96	3,48 ± 0,40	3,46
V	4,23 ± 1,04	4,21	3,34 ± 0,36	3,3
W	4,20 ± 1,02	4,11	3,26 ± 0,38	3,22
X	3,37 ± 0,83	3,35	3,16 ± 0,33	3,14
Y	3,78 ± 0,91	3,66	3,21 ± 0,45	3,21
Z	3,82 ± 0,78	3,79	3,28 ± 0,34	3,25

Anexo 9 – Médias, desvios padrões e medianas da relação G/P e da concentração de MUN, consoante a exploração.

Exploração	Relação G/P		Concentração de MUN (mg/Kg)	
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana
A	1,10 ± 0,21	1,1	204 ± 73	193
AA	1,27 ± 0,26	1,23	269 ± 72	262
B	1,33 ± 0,31	1,3	246 ± 70	245
C	1,13 ± 0,27	1,13	213 ± 65	210
D	1,35 ± 0,31	1,31	270 ± 65	264
E	1,11 ± 0,20	1,1	275 ± 60	272
F	1,48 ± 0,33	1,45	202 ± 56	200
G	0,97 ± 0,27	0,94	240 ± 59	240
H	1,21 ± 0,21	1,2	250 ± 67	244
I	1,29 ± 0,39	1,23	260 ± 84	253
J	1,26 ± 0,31	1,22	234 ± 55	232
K	1,29 ± 0,29	1,25	228 ± 66	226
L	1,24 ± 0,31	1,21	253 ± 64	252
M	1,25 ± 0,33	1,21	268 ± 67	265
N	1,14 ± 0,25	1,1	218 ± 76	213
O	1,34 ± 0,32	1,31	236 ± 74	232
P	1,24 ± 0,31	1,21	208 ± 59	203
Q	1,24 ± 0,30	1,2	283 ± 72	279
R	1,12 ± 0,25	1,1	243 ± 72	240
S	1,33 ± 0,27	1,3	246 ± 65	240
T	1,19 ± 0,28	1,17	266 ± 55	267
U	1,16 ± 0,24	1,14	271 ± 59	268
V	1,27 ± 0,31	1,26	236 ± 71	228
W	1,30 ± 0,32	1,26	274 ± 66	271
X	1,07 ± 0,26	1,08	260 ± 62	259
Y	1,19 ± 0,28	1,14	260 ± 65	265
Z	1,17 ± 0,22	1,17	213 ± 62	208

Anexo 10 - Médias, desvios padrões e medianas da concentração de BHB e da SCC, consoante a exploração.

Exploração	Concentração de BHB (mmol/L)		SCC ($\times 10^3$ células/mL)	
	Média \pm DP	Mediana	Média \pm DP	Mediana
A	0,03 \pm 0,04	0,01	359 \pm 928	121
AA	0,05 \pm 0,08	0,03	151 \pm 407	60
B	0,08 \pm 0,09	0,05	209 \pm 725	77
C	0,05 \pm 0,06	0,03	269 \pm 682	90
D	0,05 \pm 0,06	0,04	338 \pm 1049	90
E	0,02 \pm 0,04	0	265 \pm 854	76
F	0,09 \pm 0,10	0,07	185 \pm 620	56
G	0,05 \pm 0,07	0,03	305 \pm 913	107
H	0,08 \pm 0,07	0,07	1111 \pm 1727	464
I	0,07 \pm 0,08	0,05	236 \pm 713	107
J	0,04 \pm 0,07	0,02	220 \pm 569	89
K	0,06 \pm 0,12	0,04	545 \pm 1282	154
L	0,05 \pm 0,07	0,03	230 \pm 704	57
M	0,06 \pm 0,11	0,03	329 \pm 1090	76
N	0,09 \pm 0,09	0,07	662 \pm 1714	210
O	0,04 \pm 0,06	0,03	232 \pm 726	67
P	0,07 \pm 0,08	0,05	146 \pm 565	37
Q	0,05 \pm 0,08	0,03	254 \pm 614	95
R	0,05 \pm 0,07	0,03	259 \pm 681	71
S	0,06 \pm 0,07	0,05	161 \pm 515	48
T	0,07 \pm 0,17	0,03	281 \pm 521	131
U	0,04 \pm 0,06	0,02	314 \pm 986	62
V	0,06 \pm 0,07	0,04	214 \pm 446	105
W	0,07 \pm 0,08	0,05	232 \pm 636	52
X	0,05 \pm 0,08	0,04	277 \pm 526	94
Y	0,06 \pm 0,10	0,04	332 \pm 941	96
Z	0,04 \pm 0,05	0,04	385 \pm 1000	155

Anexo 11 – Médias, desvios padrões e medianas da produção de leite diária e percentagem de lactose, consoante a fase de lactação.

Fase de Lactação (dias)	Leite Diário (Kg)		Lactose (%)	
	Média \pm DP	Mediana	Média \pm DP	Mediana
5 – 13	33,6 \pm 9,3	33,2	4,75 \pm 0,27	4,78
14 – 27	38,3 \pm 9,8	38,2	4,89 \pm 0,22	4,92
28 – 41	41,1 \pm 10,2	40,8	4,93 \pm 0,22	4,94
42 – 55	41,8 \pm 10,0	41,3	4,93 \pm 0,21	4,95
56 – 119	40,9 \pm 9,6	40,4	4,93 \pm 0,22	4,95
120 – 179	37,5 \pm 8,5	36,8	4,90 \pm 0,22	4,92
180 – 239	33,8 \pm 7,5	33,2	4,87 \pm 0,23	4,89
240 – 299	29,7 \pm 7,1	29,4	4,84 \pm 0,26	4,87
≥ 300	26,9 \pm 7,0	26,5	4,80 \pm 0,30	4,84

Anexo 12 - Médias, desvios padrões e medianas da percentagem de gordura e proteína, consoante a fase de lactação.

Fase de Lactação (dias)	Gordura (%)		Proteína (%)	
	Média \pm DP	Mediana	Média \pm DP	Mediana
5 – 13	4,91 \pm 1,21	4,8	3,58 \pm 0,38	3,56
14 – 27	4,43 \pm 1,19	4,31	3,15 \pm 0,29	3,13
28 – 41	4,16 \pm 1,17	4,03	3,01 \pm 0,26	3
42 – 55	4,00 \pm 1,12	3,91	3,01 \pm 0,26	3
56 – 119	3,92 \pm 1,12	3,82	3,13 \pm 0,29	3,12
120 – 179	3,98 \pm 1,06	3,91	3,29 \pm 0,30	3,28
180 – 239	4,11 \pm 1,03	4,05	3,42 \pm 0,32	3,4
240 – 299	4,30 \pm 1,01	4,25	3,58 \pm 0,35	3,56
≥ 300	4,44 \pm 1,01	4,37	3,73 \pm 0,40	3,7

Anexo 13 – Médias, desvios padrões e medianas da relação G/P e da concentração de MUN, consoante a fase de lactação.

Fase de Lactação (dias)	Relação G/P		MUN (mg/Kg)	
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana
5 – 13	1,38 ± 0,37	1,33	216 ± 66	213
14 – 27	1,42 ± 0,41	1,36	220 ± 65	214
28 – 41	1,39 ± 0,41	1,33	224 ± 66	220
42 – 55	1,34 ± 0,39	1,28	230 ± 64	227
56 – 119	1,26 ± 0,36	1,22	242 ± 66	239
120 – 179	1,21 ± 0,32	1,19	250 ± 67	247
180 – 239	1,20 ± 0,28	1,19	246 ± 68	243
240 – 299	1,20 ± 0,26	1,19	243 ± 70	240
≥ 300	1,19 ± 0,24	1,18	243 ± 71	239

Anexo 14 - Médias, desvios padrões e medianas da concentração de BHB e da SCC, consoante a fase de lactação.

Fase de Lactação (dias)	BHB (mmol/L)		SCC (x10 ³ células/mL)	
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana
5 – 13	0,08 ± 0,10	0,05	307 ± 921	87
14 – 27	0,06 ± 0,09	0,04	273 ± 943	63
28 – 41	0,06 ± 0,09	0,03	233 ± 734	51
42 – 55	0,05 ± 0,07	0,02	224 ± 680	49
56 – 119	0,04 ± 0,06	0,03	232 ± 703	53
120 – 179	0,05 ± 0,08	0,04	244 ± 784	63
180 – 239	0,06 ± 0,08	0,04	253 ± 777	76
240 – 299	0,06 ± 0,08	0,04	265 ± 760	93
≥ 300	0,07 ± 0,10	0,04	286 ± 795	115

Anexo 15 – Médias, desvios padrões e medianas da produção de leite diária e percentagem de lactose, consoante o número de lactação.

Nº de Lactação	Produção de Leite (kg/dia)		Lactose (%)	
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana
1	31,3 ± 6,8	31	4,97 ± 0,22	4,99
2	36,2 ± 9,8	35,9	4,87 ± 0,22	4,89
3	37,9 ± 10,9	37,6	4,81 ± 0,24	4,84
4	38,2 ± 11,0	37,8	4,78 ± 0,25	4,82
≥ 5	37,5 ± 11,0	36,9	4,75 ± 0,27	4,79

Anexo 16 - Médias, desvios padrões e medianas da percentagem de gordura e proteína, consoante o número de lactação.

Nº de Lactação	Gordura (%)		Proteína (%)	
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana
1	4,05 ± 0,99	3,99	3,37 ± 0,36	3,35
2	4,20 ± 1,11	4,13	3,40 ± 0,41	3,36
3	4,22 ± 1,14	4,15	3,36 ± 0,41	3,32
4	4,22 ± 1,19	4,13	3,32 ± 0,42	3,28
≥ 5	4,25 ± 1,17	4,21	3,31 ± 0,41	3,27

Anexo 17 – Médias, desvios padrões e mediana da relação G/P e da concentração de MUN, consoante o número de lactação.

Nº de Lactação	Relação G/P		Concentração de MUN (mg/Kg)	
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana
1	1,20 ± 0,29	1,18	242 ± 67	239
2	1,24 ± 0,32	1,21	242 ± 69	238
3	1,26 ± 0,34	1,23	243 ± 70	239
4	1,28 ± 0,36	1,23	241 ± 69	239
≥ 5	1,29 ± 0,36	1,26	239 ± 70	235

Anexo 18 - Médias, desvios padrões e mediana da concentração de BHB e da SCC, consoante o número de lactação.

Nº de Lactação	Concentração de BHB (mmol/L)		SCC (x10 ³ células/mL)	
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana
1	0,05 ± 0,08	0,03	192 ± 574	67
2	0,06 ± 0,08	0,04	222 ± 743	61
3	0,06 ± 0,08	0,04	280 ± 789	87
4	0,06 ± 0,09	0,04	338 ± 942	104
≥ 5	0,06 ± 0,09	0,04	430 ± 1112	123

Anexo 19 – Médias, desvios padrões e medianas da produção de leite diária e da percentagem de lactose, consoante o número de ordenhas diárias.

Nº de Ordenhas	Produção de Leite (kg/dia)		Lactose (%)	
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana
2 Ordenhas Diárias	33,0 ± 8,9	32,1	4,86 ± 0,26	4,88
3 Ordenhas Diárias	38,4 ± 10,3	37,4	4,90 ± 0,23	4,93
Sistema Voluntário de Ordenha	31,5 ± 8,1	30,4	4,90 ± 0,27	4,94

Anexo 20 - Médias, desvios padrões e medianas da percentagem de gordura e proteína, consoante o número de ordenhas diárias.

Nº de Ordenhas	Gordura (%)		Proteína (%)	
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana
2 Ordenhas Diárias	4,34 ± 1,09	4,25	3,38 ± 0,40	3,35
3 Ordenhas Diárias	3,92 ± 1,06	3,87	3,35 ± 0,39	3,32
Sistema Voluntário de Ordenha	3,37 ± 0,83	3,35	3,16 ± 0,33	3,14

Anexo 21- Médias, desvios padrões e medianas da relação G/P e da concentração de MUN, consoante o número de ordenhas diárias.

Nº de Ordenhas	Relação G/P		Concentração de MUN (mg/Kg)	
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana
2 Ordenhas Diárias	1,29 ± 0,32	1,25	238 ± 70	234
3 Ordenhas Diárias	1,17 ± 0,31	1,15	247 ± 65	244
Sistema Voluntário de Ordenha	1,07 ± 0,26	1,08	260 ± 62	259

Anexo 22 - Médias, desvios padrões e medianas da concentração de BHB e da SCC, consoante o número de ordenhas diárias.

Nº de Ordenhas	Concentração de BHB (mmol/L)		SCC (x10 ³ células/mL)	
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana
2 Ordenhas Diárias	0,06 ± 0,09	0,04	262 ± 769	82
3 Ordenhas Diárias	0,05 ± 0,07	0,04	241 ± 781	62
Sistema Voluntário de Ordenha	0,05 ± 0,08	0,04	277 ± 526	94

Anexo 23 – Médias, desvios padrões e medianas da produção de leite diária e da percentagem de lactose, consoante o mês do ano.

Mês	Produção de Leite (kg/dia)		Lactose (%)	
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana
janeiro	36,4 ± 10,3	35,5	4,89 ± 0,24	4,92
fevereiro	36,9 ± 10,5	35,9	4,90 ± 0,24	4,92
março	37,6 ± 10,5	36,5	4,90 ± 0,23	4,93
abril	37,8 ± 10,3	36,8	4,92 ± 0,23	4,95
maio	37,2 ± 9,9	36,4	4,92 ± 0,22	4,94
junho	36,2 ± 9,4	35,5	4,90 ± 0,22	4,92
julho	34,8 ± 8,8	34,3	4,88 ± 0,25	4,91
agosto	32,0 ± 7,5	31,5	4,83 ± 0,27	4,86
setembro	32,0 ± 8,3	31,2	4,82 ± 0,25	4,85
outubro	31,9 ± 8,7	31	4,83 ± 0,27	4,86
novembro	32,5 ± 9,3	31,6	4,83 ± 0,27	4,86
dezembro	33,3 ± 10,1	32,1	4,86 ± 0,27	4,89

Anexo 24 - Médias, desvios padrões e medianas da percentagem de gordura e proteína, consoante o mês do ano.

Mês	Gordura (%)		Proteína (%)	
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana
janeiro	4,28 ± 1,11	4,21	3,36 ± 0,39	3,33
fevereiro	4,28 ± 1,16	4,22	3,36 ± 0,39	3,32
março	4,25 ± 1,17	4,18	3,35 ± 0,38	3,32
abril	4,06 ± 1,15	3,96	3,33 ± 0,37	3,3
maio	4,05 ± 1,08	3,97	3,29 ± 0,37	3,26
junho	3,96 ± 1,04	3,9	3,26 ± 0,35	3,23
julho	3,92 ± 1,02	3,85	3,26 ± 0,35	3,24
agosto	4,04 ± 1,06	3,98	3,32 ± 0,36	3,3
setembro	4,18 ± 1,05	4,11	3,39 ± 0,38	3,38
outubro	4,17 ± 1,04	4,11	3,47 ± 0,42	3,44
novembro	4,40 ± 1,06	4,35	3,54 ± 0,43	3,52
dezembro	4,40 ± 1,04	4,31	3,53 ± 0,42	3,51

Anexo 25 – Médias, desvios padrões e medianas da relação G/P e da concentração de MUN, consoante o mês do ano.

Mês	Relação G/P		Concentração de MUN (mg/Kg)	
	Média ± DP	Mediana	Média ± DP	Mediana
janeiro	1,28 ± 0,34	1,24	226 ± 64	221
fevereiro	1,28 ± 0,35	1,24	234 ± 70	234
março	1,27 ± 0,35	1,24	247 ± 74	243
abril	1,22 ± 0,35	1,18	255 ± 71	252
maio	1,24 ± 0,33	1,2	264 ± 65	260
junho	1,22 ± 0,32	1,19	264 ± 65	260
julho	1,21 ± 0,31	1,18	239 ± 65	235
agosto	1,22 ± 0,31	1,19	222 ± 59	218
setembro	1,24 ± 0,31	1,21	227 ± 64	224
outubro	1,21 ± 0,29	1,18	240 ± 67	239
novembro	1,25 ± 0,30	1,22	229 ± 66	223
dezembro	1,25 ± 0,29	1,21	234 ± 72	227

Anexo 26 - Médias, desvios padrões e medianas da concentração de BHB e da SCC, consoante o mês do ano.

Mês	Concentração de BHB (mmol/L)		SCC ($\times 10^3$ células/mL)	
	Média \pm DP	Mediana	Média \pm DP	Mediana
janeiro	0,04 \pm 0,06	0,02	265 \pm 858	73
fevereiro	0,04 \pm 0,07	0,02	251 \pm 702	72
março	0,04 \pm 0,07	0,02	245 \pm 710	68
abril	0,04 \pm 0,07	0,02	242 \pm 795	66
maio	0,06 \pm 0,06	0,04	244 \pm 743	71
junho	0,07 \pm 0,10	0,04	243 \pm 705	68
julho	0,08 \pm 0,12	0,05	259 \pm 806	68
agosto	0,09 \pm 0,11	0,07	259 \pm 789	78
setembro	0,08 \pm 0,07	0,06	271 \pm 817	80
outubro	0,06 \pm 0,08	0,05	242 \pm 748	79
novembro	0,04 \pm 0,06	0,02	274 \pm 847	87
dezembro	0,04 \pm 0,08	0,02	258 \pm 685	86

Anexo 27 - Coeficientes estimados do GLMM, ajustado com a concentração de BHB como variável dicotômica, respetivos desvios padrões, e valores p (teste de Wald) associados. Neste caso, à variável da produção de leite, foi aplicada a transformação inversa depois de uma mudança de escala.

Variáveis	Categorias	Coefficientes	DP	Valores P
Constante		-6,814	0,239	< 0,001
Produção de Leite (kg/dia)		0,392	0,016	< 0,001
	[42, 56)			
	[0, 42)	0,636	0,210	0,002
Fase de Lactação (dias)	[56, 120)	0,088	0,216	0,683
	[120, 180)	0,778	0,211	< 0,001
	[180, +)	0,846	0,198	< 0,001
Nº de Lactação	2, 3, 4, 5			
	1	0,283	0,063	< 0,001
	[0, 200)			
SCC ($\times 10^3$ células/mL)	[200, 400)	0,612	0,104	< 0,001
	[400, +)	0,849	0,098	< 0,001
Gordura (%)	[0, 4,5)			
	[4,5, +)	0,276	0,047	< 0,001
Relação G/P	[0, 1,4)			
	[1,4, +)	0,842	0,047	< 0,001
	[0, 42)*1	0,054	0,067	0,425
Fase de Lactação*Nº de Lactação	[56, 120)*1	-0,126	0,070	0,071
	[120, 180)*1	-0,291	0,070	< 0,001
	[180, +)*1	-0,248	0,064	0,001
	[200, 400)*1	-0,105	0,037	0,005
SCC*Nº de Lactação	[400, +)*1	0,057	0,031	0,068

Anexo 28 – Coeficientes estimados do GLMM, ajustados com a concentração de MUN como variável dicotômica, respetivos desvios padrões, e valores P (teste de Wald) associados.

Variáveis	Categorias	Coeficientes	DP	Valores P
Constante		-2,288	0,168	< 0,001
Produção de Leite (kg/dia)	[42, 56)	0,009	0,001	< 0,001
Fase de Lactação (dias)	[0, 42)	-0,353	0,109	0,001
	[56, 180)	0,506	0,093	< 0,001
	[180, +)	0,478	0,093	< 0,001
Nº de Lactação	2, 3, 4, 5			
	1	-0,041	0,035	0,241
Proteína (%)	[0, 3)			
	[3, 3.2)	-0,085	0,030	0,004
Relação G/P	[3.2, +)	-0,116	0,029	< 0,001
	[0, 1,4)			
	[1,4, +)	0,063	0,023	0,006
Fase de Lactação*Nº de Lactação	[0, 42)*1	0,063	0,041	0,127
	[56, 180)*1	0,036	0,035	0,304
	[180, +)*1	0,103	0,035	0,003

Anexo 29 - Razão de possibilidades de uma vaca, numa determinada fase de lactação, ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L, quando comparada com outra vaca na fase de referência (42 a 55 dias), tando para primíparas como para múltiparas.

Nº de Lactação	Fase de Lactação (dias)	Razão de Possibilidades
1	0 - 41	Têm o dobro das possibilidades (IC95%(OR) = (1,48; 2,69))
	56 - 119	Não têm possibilidades diferentes (IC95%(OR) = (0,71; 1,31))
	120 -179	Têm 63% mais possibilidades (IC95%(OR) = (1,21; 2,20))
	≥ 180	Têm quase o dobro das possibilidades (OR=1,82; IC95%(OR) = (1,37; 2,42))
	0 - 41	Têm quase o dobro das possibilidades (OR=1,89; IC95%(OR) = (1,25; 2,67))
2, 3, 4 ou ≥ 5	56 - 119	Não têm possibilidades diferentes (IC95%(OR) = (0,72; 1,56))
	120 -179	Têm mais do dobro das possibilidades (OR=2,18; IC95%(OR) = (1,44; 3,08))
	≥ 180	Têm mais do dobro das possibilidades (OR=2,33; IC95%(OR) = (1,58; 3,23))

Anexo 30 - Razão de possibilidades de primípara ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L, quando comparada com uma múltipara, tendo em conta a fase de lactação e a SCC.

Fase de Lactação (dias)	SCC (x10 ³ células/mL)	Razão de Possibilidades
0 – 41	< 200	40% (IC95%(OR) = (1,32; 1,49))
	200 - 400	26% (IC95%(OR) = (1,17; 1,36))
	≥ 400	48% (IC95%(OR) = (1,38; 1,60))
42 - 55	< 200	33% (IC95%(OR) = (1,17; 1,47))
	200 - 400	20% (IC95%(OR) = (1,04; 1,37))
	≥ 400	41% (IC95%(OR) = (1,23; 1,60))
56 - 119	< 200	17% (IC95%(OR) = (1,09; 1,26))
	200 - 400	não significativa (IC95%(OR) = (0,96; 1,16))
	≥ 400	24% (IC95%(OR) = (1,14; 1,35))
120 - 179	< 200	não significativa (IC95%(OR) = (0,93; 1,06))
	200 - 400	-11% (IC95%(OR) = (0,82; 0,98))
	≥ 400	não significativa (IC95%(OR) = (0,97; 1,14))
> 180	< 200	não significativa (IC95%(OR) = (0,94; 1,08))
	200 - 400	-7% (IC95%(OR) = (0,87; 1,00))
	≥ 400	10% (IC95%(OR) = (1,04; 1,16))

Anexo 31 - Razão de possibilidades de uma vaca com a SCC inferior a 200x10³ células/mL ter uma concentração de BHB superior a 0,2mmol/L, quando comparada com outra vaca com a SCC superior a 200x10³ células/mL, tendo em conta o número de lactação

Nº de Lactação	SCC (x10 ³ células/mL)	Razão de Possibilidades
1	200 – 399	Aumenta 66% (IC95%(OR) = (1,44; 1,92))
	≥ 400	2,5 vezes superiores (IC95%(OR) = (2,15; 2,85))
2, 3, 4 ou ≥ 5	200 – 399	Aumenta quase para o dobro (OR=1,84; IC95%(OR) = (1,50; 2,19))
	≥ 400	2,3 vezes superiores (IC95%(OR) = (1,93; 2,74))

Anexo 32 - Razão de possibilidades de uma vaca, numa determinada fase de lactação, ter uma concentração de MUN superior a 300mg/kg, quando comparada com outra da mesma lactação, mas que se encontra na fase de referência (42 a 55 dias).

Nº de Lactação	Fase de Lactação (dias)	Razão de Possibilidades
1	0 - 41	tem 30% menos de possibilidades (IC95%(OR) = (0,57; 0,84))
	56 - 179	tem mais 66% possibilidades (IC95%(OR) = (1,38; 1,93))
	≥ 180	tem mais 61% das possibilidades (OR=1,82; IC95%(OR) = (1,34; 1,88))
2, 3, 4 ou ≥ 5	0 - 41	tem 25% menos de possibilidades (IC95%(OR) = (0,64; 0,87))
	56 - 179	tem mais 72% possibilidades (IC95%(OR) = (1,52; 1,95))
	≥ 180	tem mais 79% das possibilidades (IC95%(OR) = (1,57; 2,03))

Anexo 33 –Razão de possibilidades de uma vaca de primeira lactação ter uma concentração de MUN superior a 300mg/kg, quando comparada com outra vaca de outra lactação, consoante a fase de lactação.

Fase de Lactação (dias)	Razão de Possibilidades
0 – 41	não significativa (IC95%(OR) = (0,97; 1,07))
42 - 55	não significativa (IC95%(OR) = (0,90; 1,02))
56 - 179	não significativa (IC95%(OR) = (0,97; 1,02))
≥ 180	aumento de cerca de 7% (IC95%(OR) = (1,04; 1,09))