

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós Graduação em Zootecnia



Dissertação

**AVALIAÇÃO DO TESTE DE REDUÇÃO DO CROMO NO LEITE DE VACAS COM
CETOSE SUBCLÍNICA**

JÉSSICA HALFEN

Pelotas, 2017

Jéssica Halfen

Avaliação do teste de redução do cromo no leite de vacas com cetose subclínica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Área do conhecimento: Nutrição animal: ênfase em metabolismo e qualidade do leite).

Orientador: Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino
Co-orientador: Dr. Eduardo Schmitt

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

H169a Halfen, Jéssica

Avaliação do teste de redução do cromo no leite de vacas com cetose subclínica / Jéssica Halfen ; Francisco Augusto Burkert Del Pino, orientador ; Eduardo Schmitt, coorientador. — Pelotas, 2017.

36 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Álcool. 2. Butirato. 3. β -hidroxibutirato. 4. Vaca leiteira. I. Pino, Francisco Augusto Burkert Del, orient. II. Schmitt, Eduardo, coorient. III. Título.

CDD : 636.213

Banca examinadora: Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino

Dr. Marcio Nunes Corrêa

Dra. Josiane de Oliveira Feijó

Dr. Cássio Cassal Brauner

Agradecimentos

À minha mãe, pelo exemplo de pessoa e de guerreira, que fez com que eu nunca desistisse dos meus objetivos. Pelo carinho e amor incondicional que me foi dado.

Às minhas irmãs, por me ajudarem a crescer como pessoa, sempre me ensinando a fazer o certo, respeitar ao próximo e nunca desistir dos meus sonhos. Pelo companheirismo e amizade eterna que temos umas pelas outras.

Aos meus amigos queridos, que sempre estiveram junto comigo em todos os momentos bons e ruins.

Aos meus orientadores, que me incentivaram e me ajudaram a chegar até aqui.

Ao NUPEEC, por todo apoio, amizade e suporte.

E a Deus, por me permitir alcançar os meus objetivos e concluir este grande desafio.

Obrigada.

Resumo

HALFEN, Jéssica. **Avaliação do teste de redução do cromo no leite de vacas com cetose subclínica**. 2017. 36f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

A cetose subclínica é uma das principais doenças metabólicas que acometem o rebanho leiteiro. Vacas com elevadas concentrações de corpos cetônicos apresentam consideráveis níveis de álcoois, como o Isopropanol, nos fluidos corporais. Neste sentido, foram realizados dois ensaios, o objetivo do primeiro foi avaliar os efeitos da cetose subclínica sobre a presença de álcool no leite fluído, através do Teste de Redução do Cromo. O segundo ensaio foi desenvolvido com o intuito de avaliar a relação da cetose subclínica causada por elevados níveis de butirato na dieta, sobre a positividade do leite fluído no Teste de Redução do Cromo. No ensaio 1, foram utilizadas 200 vacas Holandês, produzindo em média 20 litros/dia e com \pm 155 dias em lactação, as quais foram submetidas à coleta de leite e sangue. Após a coleta de material biológico, o sangue foi analisado quanto os níveis de β -hidroxibutirato (BHBA), e o leite quanto à presença de álcool pelo Teste de Redução de Cromo. Somente um animal apresentou cetose subclínica (1,3 mmol/L BHBA), sendo que a média do lote foi de 0,69 mmol/L BHBA. Cinco animais positivaram no teste de álcool no leite fluído. Não foi possível, com este estudo, aceitar ou rejeitar a hipótese do projeto devido ao baixo número de casos de cetose. No ensaio 2, realizado em outra propriedade, foram utilizadas 10 vacas leiteiras (4 Holandês e 6 Jersey), as quais foram aleatoriamente divididas entre dois grupos: Grupo controle (n=5), o qual recebeu a dieta padrão da propriedade; Grupo tratamento (n=5), o qual recebeu a dieta padrão acrescida de Butirato (CM3000® – Butirato de Sódio 30% – Microencapsulado, Vetanco, Brasil) a um nível de 1,5 g/kg peso vivo (PV) durante um período de 8 dias. Amostras individuais de leite e sangue foram coletadas diariamente, sendo o leite analisado quanto à presença de álcool e o sangue quanto à concentração de BHBA. Os níveis sanguíneos de BHBA foram maiores ($p < 0,0001$) no GT quando comparado ao GC (0,91 mmol/L e 0,64 mmol/L), respectivamente. No entanto, somente um animal do GT, apresentou amostras positivas para álcool no leite. Com isso, é possível afirmar que neste estudo, doses de 1,5g /kg de PV não causaram cetose subclínica. Logo, devido aos baixos níveis de BHBA encontrados, não foi possível aceitar ou rejeitar a hipótese de que vacas com cetose subclínica positivaram no teste de redução do cromo.

Palavras chave: álcool, butirato, β -hidroxibutirato, vaca leiteira.

Abstract

HALFEN, Jessica. **Evaluation of chromium reduction test in cow's milk with subclinical ketosis**. 2017. 36f. Dissertation (Master in Animal Science) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Subclinical ketosis is one of the major metabolic diseases affecting the dairy herd. Cows with high concentrations of ketone bodies have considerable levels of alcohols, such as Isopropanol, in body fluids. In this sense, two studies were carried out, where the purpose of the first one was to evaluate the effects of subclinical ketosis on the presence of alcohol in fluid milk, through the Chromium Reduction Test. The second study was developed to evaluate the relationship of subclinical ketosis caused by high levels of butyrate in the diet, on the fluid milk positivity in the Chromium Reduction Test. In study 1, 200 Holstein cows were used, producing on average 20 liters / day, with \pm 155 days in milk, which were submitted to individual milk and blood collection. After collection of biological material, the blood was analyzed for levels of β -hydroxybutyrate (BHB), and milk for the presence of alcohol by the chromium reduction test. Only one animal had subclinical ketosis (1.3 mmol / L BHB), the batch average being 0.69 mmol / L BHB. In addition, 5 animals were positive for alcohol in fluid milk. However, it was not possible, with this study, to accept or reject the hypothesis of the project, due to the low number of cases of ketosis. The second study, carried out in another farm, 10 dairy cows (4 Holstein and 6 Jersey) were used, randomly divided into two groups: Control group (n = 5), which received the diet offered at the farm; Treatment group (n = 5), which received the property diet plus Butyrate (CM3000® - Sodium Butyrate 30% - Microencapsulated, Vetanco, Brazil) at a level of 1.5 g / kg body weight (BW) over a period of 8 days. Individual milk and blood samples were collected daily. The milk sample was analyzed for the presence of alcohol and samples of blood for the concentration of BHB. BHB blood levels were higher ($p < 0.0001$) in GT when compared with GC (0,91 mmol/L e 0,64 mmol/L), respectively. However, only one GT animal had positive samples for alcohol in milk. Thus, it is possible to affirm that in this study doses of 1.5 g / kg of PV did not cause subclinical ketosis. Therefore, because of the low levels of BHBA found, it was not possible with this study to accept or reject the hypothesis that cows with subclinical ketosis positivates the ethyl alcohol test.

Keywords: alcohol, butyrate, β -hydroxybutyrate, dairy cow.

Lista de Figuras

Figura 1. Porcentagem de vacas leiteiras da raça Holandês com escore de condição corporal entre 1-1,5; 2-2,5; 3-3,5 e 4-4,5..... 18

Lista de Tabelas

Tabela 1. Níveis sanguíneos de β -hidroxibutirato e escore de condição corporal das vacas positivas para o teste de Redução do Cromo no Leite Fluído.....	18
--	----

Sumário

1	Introdução geral.....	10
2	Objetivo Geral	15
2.1	Objetivos Específicos	15
2.2	Hipótese	15
3	Etapa I.....	16
4	Etapa II.....	20
4.1	Artigo I.....	20
5	Conclusão Geral	32
	Referências.....	33

1 Introdução geral

Na produção leiteira o período de transição, que compreende o último mês de gestação e as primeiras semanas de lactação (Drackley,1999), é considerado um momento crítico, onde a vaca passa por diversos transtornos metabólicos que podem causar prejuízos, até mesmo nas lactações subsequentes. Este período é comumente caracterizado por um estado de balanço energético negativo (BEN), onde as demandas energéticas requeridas para o desenvolvimento final do bezerro e produção de leite, superam a energia adquirida a partir da ingestão de matéria seca (Bell 1995; Drackley,1999).

No pós-parto recente, a fim de garantir a produção de leite, o organismo da vaca direciona a glicose circulante, assim como seus precursores, o propionato e lactato, para produção de lactose na glândula mamária (Mattmiller, 2011; Gonzáles et al., 2014), causando assim um déficit de precursores gliconeogênicos no ciclo de Krebs. Diante dessa baixa concentração de glicose circulante, o organismo lança mão das suas reservas energéticas, iniciando assim a mobilização lipídica (lipólise) (Gordon et al., 2013; Esposito et al., 2014).

Constantemente, níveis basais de lipólise liberam na corrente sanguínea pequenas quantidades de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e glicerol, que são re-esterificados (Vernon, 1980). No entanto, em condições de déficit energético como no BEN, a lipólise é rapidamente aumentada, mediante ação de diversos hormônios, principalmente insulina e glucagon, que respondem a diminuição de glicose sanguínea (Grummer, 1993; Drackley,1999). Neste momento, grandes quantidades de AGNE são liberados na corrente sanguínea e transportados pela albumina aos tecidos periféricos, para servirem como fonte de energia, sendo também, captados pelo fígado (Gonzáles et al., 2014).

No fígado os AGNE são ativados à acil-CoA na membrana externa da mitocôndria, podendo então ser transportado mediante complexo enzimático carnitina-palmitoil transferase-I (CPT-I), para o espaço mitocondrial interno onde serão direcionados à β -oxidação. O principal produto da β -oxidação é o acetil-CoA, que pode entrar no ciclo de Krebs ou pode ser direcionado à síntese de corpos cetônicos (Bell, 1980; Bruss 2008). Em condições de déficit energético, o ciclo de Krebs pode ter sua atividade decrescida devido a elevada concentração de acetil-CoA gerada pela intensa mobilização lipídica, ou até mesmo, devido a reduzida disponibilidade de oxalacetato mediante baixas concentrações de precursores, como o propionato (Baird, 1968; Bell, 1980).

Nessas condições, o acetil-CoA será convertido em corpos cetônicos: acetoacetato, acetona e β -hidroxibutirato (BHBA). Estes metabólitos serão exportados via corrente sanguínea para tecidos periféricos, onde servirão como fonte de energia a partir da oxidação no ciclo de Krebs (Bruss 2008). O resultado deste processo será o acúmulo de corpos cetônicos nos fluídos corporais do animal (Gordon et al., 2013), estabelecendo assim, um quadro de cetose, que de acordo com a intensidade poderá ser caracterizada como subclínica ou clínica.

A melhor forma de diagnosticar um quadro de cetose subclínica, caracterizado pela ausência de sinais clínicos, é mensurando a concentração de BHBA no sangue (Oetzel et al., 2004), que segundo Raboisson et al. (2014), fica em torno de 1,2mmol/L a 1,4mmol/L de BHBA. Cerca de 90% dos casos que envolvem este transtorno ocorrem entre o primeiro e segundo mês pós-parto, onde a taxa de prevalência gira em torno de 34%, já na forma clínica esta taxa fica entre 3 – 7% (Suthar et al., 2013; Gonzáles et al., 2014).

No entanto, não é somente neste período que os animais estão sujeitos a adquirirem este transtorno, tendo em vista que o aumento dos corpos cetônicos também pode ocorrer devido a ingestão de alimentos com elevada concentração de ácido butírico. Segundo Oetzel (2007) o ruminante é capaz de metabolizar 750g/dia de butirato, porém, quando esta concentração é aumentada devido a presença de precursores como o ácido butírico na dieta, a capacidade de metabolização é ultrapassada. Sabe-se que 75% do butirato produzido no rúmen é oxidado à BHBA

no epitélio ruminal pela enzima Butiril-CoA sintetase, entretanto, em casos de elevadas concentrações de butirato ruminal, conseqüentemente, elevadas concentrações de BHBA serão liberadas na corrente sanguínea, resultando em cetose subclínica ou clínica (Valadares Filho e Pina, 2011; Santos, 2011).

A principal fonte de ácido butírico na dieta de vacas leiteiras se dá pela má conservação da silagem. O processo de fermentação da silagem deve ser anaeróbico, favorecendo a proliferação de bactérias produtoras de ácido láctico. Quando o ambiente anaeróbico não é mantido (ensilagem inadequada), a presença de oxigênio resultará na proliferação de bactérias indesejadas, como o *Clostridium tyrobutyricum* (Dinié et al., 2010), que segundo Kalac (2011), é capaz de fermentar ácido láctico à ácido butírico.

Todavia, além dos três metabólitos agrupados como corpos cetônicos (acetoacetato, acetona e BHBA), diversos estudos relatam a presença de mais um composto no fluído ruminal, urina, sangue e leite de vacas cetóticas, o Isopropanol (Robertson e Thin, 1953; Bruss e Lopez, 2000). Esse metabólito, segundo alguns autores, é derivado da redução da acetona pela enzima álcool desidrogenase (ADH), presente no fígado de humanos, ruminantes e outras espécies (Shibusawa et al., 2004; Baik et al., 2009; Cederbaum, 2012). Esta reação é dependente de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo na forma reduzida (NADH), onde por intermédio da enzima ADH serão utilizados elétrons do NADH presente no citosol do hepatócito, para formar isopropanol a partir da acetona (Jones e Summers, 2000; Jones e Rössner, 2007).

Devido à volatilidade da acetona, esta é rapidamente direcionada do citosol do hepatócito para a corrente sanguínea, a fim de ser excretada na urina, leite, saliva, respiração, eructação e transpiração (Gonzáles et al., 2014). Neste sentido, alguns autores levantam a hipótese da acetona, mediante corrente sanguínea, sofre no rúmen o processo de redução a isopropanol por ação de microrganismos (Bruss e Lopez, 2000; Sato, 2009). Estes mesmos autores acreditam que o isopropanol sintetizado no rúmen chegue ao fígado, via corrente sanguínea, onde será oxidado pela enzima ADH (reação de dupla direção). Neste processo o isopropanol estará carregando do rúmen para o fígado dois elétrons, que serão utilizados como fonte de

energia via NADH na cadeia respiratória. Porém, ainda não se sabe qual seria o microrganismo presente no rúmen capaz de sintetizar esta reação.

A presença de corpos cetônicos no leite, principalmente o BHBA, já está bem elucidada devido a sua importância para síntese de gordura (Mahrt et al., 2014). Contudo, a presença de um álcool secundário, como o Isopropanol, no leite fluído, pode ser tomada como fraude pela indústria de laticínios, mesmo sendo este um álcool proveniente do metabolismo energético do animal. Segundo Mereze et al. (2015), a presença de álcool em amostras de leite cru refrigerado, além de não ser um constituinte normal da composição do leite, é considerada fraude, pois mascara a adição de água. Em um estudo realizado por Silva et al. (2011), constatou-se que a adição de 0,05% de álcool à uma amostra de leite contendo 3,8% de água, seria o suficiente para adequar a crioscopia ($-0,530^{\circ}\text{H}$) do leite aos parâmetros determinados pela legislação.

Existem na indústria diversos testes e procedimentos realizados rotineiramente com intuito de evitar que, leite adulterado ou em condições sensoriais e físico-químicas inadequadas, passem para o processo de industrialização e cheguem ao consumidor (Rodrigues et al., 2013). Estas alterações podem acontecer de forma ilegal durante o transporte até a indústria ou até mesmo dentro da propriedade, caracterizando fraude na matéria prima (Mereze et al., 2015). No entanto, grande parte das alterações na qualidade do leite estão intimamente relacionadas com a higiene na ordenha, manejo nutricional e saúde dos animais.

Dentre estes testes e procedimentos está a determinação qualitativa de álcool no leite fluído, determinada pelo MAPA, código MET POA/SLAV/42/02/01, emitida em 2014, a qual visa detectar a presença de álcool no leite que chega na indústria. Este teste se baseia na coloração da solução sulfocrômica ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + \text{H}_2\text{SO}_4$), que na presença de álcoois primários e secundários é alterada de laranja para verde, sendo um teste inteiramente qualitativo, onde não é possível determinar qual é o álcool presente na amostra e nem a quantidade presente.

Frente a esta problemática o presente estudo tem como intuito relacionar o quadro de cetose subclínica com a positividade do leite fluído no teste de redução do cromo proposto pelo MAPA.

2 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da cetose subclínica causada pelo excesso de butirato de sódio na dieta de vacas lactantes, sobre a presença de álcool no leite fluido, através do teste de redução do cromo proposto pelo MAPA.

2.1 Objetivos Específicos

1. Determinar a positividade do teste do álcool no leite fluído de vacas ingerindo elevadas concentrações de butirato de sódio.
2. Avaliar o efeito da ingestão de butirato de sódio proveniente da dieta com o metabolismo energético e presença de corpos cetônicos.
3. Avaliar através de marcadores bioquímicos a relação dos corpos cetônicos com a presença de álcool no leite fluído.

2.2 Hipótese

Vacas com níveis subclínicos e clínicos de corpos cetônicos positivam no teste de Determinação Qualitativa de Álcool Etílico em Leite Fluído.

3 Etapa I

Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da cetose subclínica sobre a presença de álcool no leite fluido, através do teste de redução do cromo.

Metodologia

Todos os procedimentos realizados neste experimento passaram pela aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas estando registrado e aprovado sob número 9379-2016.

Este estudo foi conduzido em novembro de 2016, nas dependências de uma propriedade leiteira localizada na cidade de Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. Os animais utilizados (n=200 vacas Holandês) pertenciam ao grupo alta produção, em média 20 litros/dia e \pm 155 dias em lactação.

As coletas de material biológico foram realizadas em um único dia, 23 de novembro, onde foram coletadas amostras de leite e sangue de cada animal, conferindo uma análise pontual do dia.

Coleta de material biológico e análises

Com frascos de vidro previamente esterilizados, foram coletados aproximadamente 200mL de leite/vaca durante a ordenha da manhã, com o auxílio de copos coletores. Logo após a coleta, as amostras foram acondicionadas em caixas térmicas a uma temperatura de 4°C.

Seguinte a coleta de leite, os animais foram liberados da sala de ordenha e direcionados à praça de alimentação, onde se deu a coleta de sangue, feita através de venopunção da veia coccígea em tubos *vacutainer* sem anticoagulante. Os tubos já identificados pós coleta foram acondicionados em caixa térmica a uma temperatura de 4°C até o processamento no laboratório. Concomitante a coleta de sangue, avaliou-se o escore de condição corporal (ECC), utilizando uma escala de 1 a 5 descrita por Edmonson et al. (1989), sendo 1 extremamente magra e 5 extremamente gorda.

No laboratório, o sangue foi centrifugado a 1800 x g por 15 minutos (centrifuga SIEGER, Sirius 4000) para a separação completa do soro, o qual foi transferido para microtubos tipo eppendorf previamente identificados e congelados a -20°C. As concentrações de β -hidróxibutirato (BHBA) no soro foram analisadas em duplicata pelo equipamento Bioquímico automático LABTEST Pleno, utilizando um Kit comercial (BHBA: Ranbut, Randox® Laboratories Ltd, UK).

A determinação qualitativa de álcool no leite fluído foi realizada segundo metodologia determinada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), código MET POA/SLAV/42/02/01, emitida em 2014. Para isso, foi acrescentado 3 mL de antiespumante 3% (TEC-Lab®) em 100 mL de leite cru, o qual foi aquecido em kitassato mantendo a fervura por 5 minutos. Em um tubo de ensaio contendo 2 mL de solução sulfocrômica, submergiu-se uma ponteira de vidro de Pasteur conectada a um tubo de silicone ligado ao kitassato contendo o leite em fervura. Este circuito fechado, permite que o álcool presente no leite evapore durante a fervura e chegue, a partir do tubo de silicone, na solução sulfocrômica onde por oxirredução ocorre a alteração na coloração do reagente, indicando assim a presença ou ausência de álcool. Nas amostras em que o resultado foi duvidoso, o teste foi refeito.

Resultados

No total foram passíveis de análise 178 amostras, onde cada amostra representa uma vaca, das quais somente um animal apresentou cetose subclínica (1,3 mmol/L BHBA), sendo que a média do lote foi de 0,69 mmol/L BHBA. Além disso, 5 animais positivaram (Tabela 1) no teste de álcool etílico proposto pelo MAPA.

Tabela 1. Níveis sanguíneos de β -hidroxibutirato e escore de condição corporal das vacas positivas para o teste de Redução do Cromo no Leite Fluido.

Vaca	Escore de Condição Corporal	β -hidroxibutirato (mmol/L)
1	2,5	0,97
2	2,5	0,71
3	2,5	0,64
4	3,5	0,75
5	2,5	0,71

Na figura abaixo é possível observar a porcentagem de animais em cada ponto de ECC.

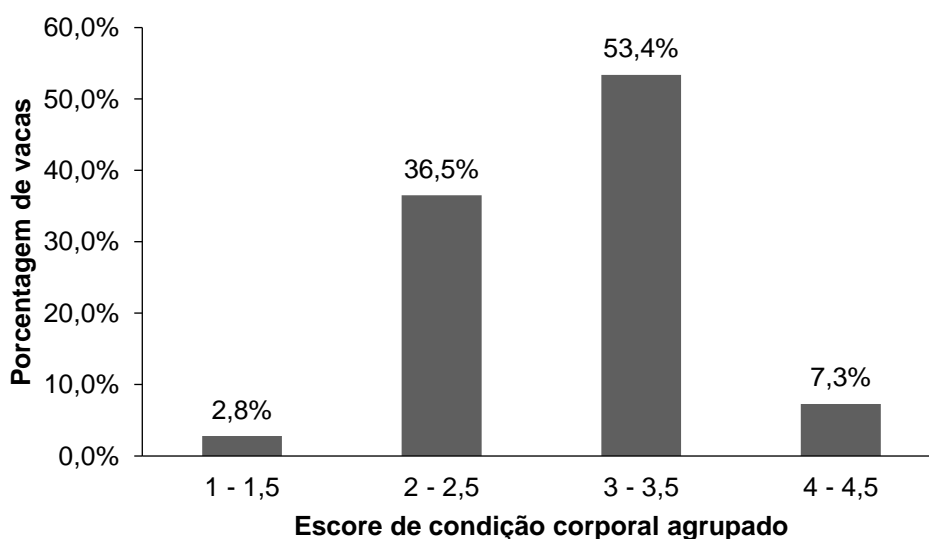


Figura 1. Porcentagem de vacas leiteiras da raça Holandês com escore de condição corporal entre 1-1,5; 2-2,5; 3-3,5 e 4-4,5.

Contudo, diante do baixo número de casos de cetose subclínica, ocorrido principalmente devido aos animais estarem fora do período crítico para

desenvolvimento deste transtorno metabólico (DEL 155), não foi possível, com esta etapa da pesquisa, aceitar ou rejeitar a hipótese do projeto.

Referências

Edmonson, A. J; Lean, I. J.; Weaver, L. D.; Farver, T.; Webster, G. A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**. v 72, p.68-78. 1989.

4 Etapa II

4.1 Artigo I

Artigo formatado conforme normas da revista **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**.

1 Elevados Níveis de β -hidroxibutirato sanguíneo e a Presença de Álcool no Leite de
2 Vacas.

3
4 High Levels of Blood β -hydroxybutyrate and the Presence of Alcohol in Milk from
5 Cows.

6
7 Resumo – O objetivo deste estudo foi avaliar a relação da cetose subclínica causada por
8 elevados níveis de butirato na dieta, sobre a positividade do leite fluído no teste de
9 redução do cromo. Para isso, foram utilizadas 10 vacas leiteiras (4 Holandês e 6 Jersey),
10 as quais foram aleatoriamente divididas entre dois grupos: Grupo controle (n=5), o qual
11 recebeu a dieta padrão; Grupo tratamento (n=5), o qual recebeu a dieta padrão acrescida
12 de Butirato (CM3000® – Butirato de Sódio 30% – Microencapsulado, Vetanco, Brasil)
13 a um nível de 1,5 g/kg peso vivo (PV) durante um período de 8 dias. Amostras
14 individuais de leite e sangue foram coletadas diariamente, sendo o leite analisado
15 quanto à presença de álcool e o sangue quanto à concentração de β -hidroxibutirato
16 (BHBA). Os níveis sanguíneos de BHBA foram maiores ($p < 0,0001$) no GT quando
17 comprado ao GC (0,91 mmol/L e 0,64 mmol/L), respectivamente. No entanto, somente
18 um animal do GT, apresentou amostras positivas para álcool no leite. Com isso, é
19 possível afirmar que neste estudo, doses de 1,5g /kg de PV não causaram cetose
20 subclínica. Logo, não foi possível aceitar ou rejeitar a hipótese de que vacas com cetose
21 subclínica positivam no teste de álcool etílico.

22
23 Palavras-chave: Alcoois, Cetose, Butirato, Vaca leiteira.

24 Abstract – The objective of this study was to evaluate the relationship of subclinical
25 ketosis caused by high levels of butyrate in the diet, on the fluid milk positivity in the
26 chromium reduction test. For this, 10 dairy cows (4 Holstein and 6 Jersey) were used,
27 which were randomly divided into two groups: Control group (n = 5), which received
28 the diet offered at the farm; Treatment group (n = 5), which received the farm diet plus
29 Butyrate (CM3000® - Sodium Butyrate 30% - Microencapsulated, Vetanco, Brazil) at a
30 level of 1.5 g / kg body weight (BW). Over a period of 8 days. Individual milk and
31 blood samples were collected daily. The milk sample was analyzed for the presence of
32 alcohol and samples of blood for the concentration of β -hydroxybutyrate (BHB). BHB
33 blood levels were higher (p <0.0001) in GT when compared with GC (0,91 mmol/L e
34 0,64 mmol/L), respectively. However, only one GT animal had positive samples for
35 alcohol in milk. Thus, it is possible to affirm that in this study doses of 1.5 g / kg of PV
36 did not cause subclinical ketosis. Therefore, it was not possible to accept or reject the
37 hypothesis that cows with subclinical ketosis positivates the ethyl alcohol test.

38

39 Keywords: Alcohols, ketosis, butyrate, dairy cow.

40

41 Introdução

42 A ocorrência de transtornos metabólicos como a cetose são muito comuns
43 durante o parto de vacas de elevada produção de leite. Neste período, os corpos
44 cetônicos, produtos fisiológicos do metabolismo de lipídios, representam a principal
45 fonte de energia utilizada para manutenção e produção de leite (Zhang et al., 2016). Dentre
46 os corpos cetônicos envolvidos neste transtorno, se destacam o acetoacetato, acetona e
47 β -hidroxibutirato (BHBA), sendo este último o mais utilizado para diagnóstico, onde
48 concentrações de 1,2 a 1,4 mmol/L de BHBA caracterizam um quadro de cetose
49 subclínica (Chapinal et al., 2012; Raboisson et al., 2014).

50 No entanto, não é somente neste período que os animais estão sujeitos à
51 desenvolverem este transtorno, tendo em vista que o aumento dos corpos cetônicos
52 também pode estar relacionado a ingestão de alimentos com elevada concentração de
53 ácido butírico. Segundo Oetzel (2007) o ruminante é capaz de metabolizar 750g/dia de
54 butirato, porém, quando esta concentração é aumentada devido a presença de
55 precursores como o ácido butírico na dieta, a capacidade de metabolização é

56 ultrapassada, podendo assim aumentar consideravelmente os níveis de BHBA
57 sanguíneos (Valadares Filho & Pina, 2011; Santos, 2011).

58 Todavia, além dos três metabólitos agrupados como corpos cetônicos
59 (acetoacetato, acetona e BHBA), diversos estudos relatam a presença de mais um
60 composto no fluído ruminal, urina, sangue e leite de vacas cetóticas, o Isopropanol
61 (Robertson et al, 1950; Robertson & Thin,1953; Bruss e Lopez., 2000). A grande
62 questão envolvendo o Isopropanol, é que por se tratar de um álcool secundário, a sua
63 presença no leite fluído pode ser tomada como fraude pela indústria de laticínios,
64 mesmo sendo este um álcool proveniente do metabolismo energético do animal.
65 Segundo Mereze et al. (2015), a presença de álcool em amostras de leite cru refrigerado,
66 além de não ser um constituinte normal da composição do leite, é considerada fraude,
67 pois mascara a adição de água. Em um estudo realizado por Silva et al. (2011),
68 constatou-se que a adição de 0,05% de álcool à uma amostra de leite contendo 3,8% de
69 água, seria o suficiente para adequar a crioscopia (-0,530°H) do leite aos parâmetros
70 determinados pela legislação.

71 Neste sentido, existem na indústria diversos testes e procedimentos realizados
72 rotineiramente com intuito de evitar que, leite adulterado ou em condições sensoriais e
73 físico-químicas inadequadas, passem para o processo de industrialização e cheguem ao
74 consumidor (Rodrigues et al., 2013. Dentre os métodos utilizados para avaliar a
75 presença de resíduos químicos na matéria prima, está a determinação qualitativa de
76 álcool etílico no leite fluído, determinada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e
77 Abastecimento (MAPA), código MET POA/SLAV/42/02/01, emitida em 2014. Este
78 teste se baseia na coloração da solução sulfocrômica, que na presença de álcoois
79 primários e secundários é alterada de amarelo para verde, sendo um teste inteiramente
80 qualitativo. Neste sentido é possível que o leite de animais acometidos por cetose
81 subclínica apresentem traços de álcool e, por isso, seja descartado por suspeita de
82 fraude. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a relação da cetose
83 subclínica causada por elevados níveis de butirato na dieta, sobre a positividade do leite
84 fluído no teste de redução do cromo.

85

86 Metodologia

87

88 Todos os procedimentos realizados neste experimento passaram pela aprovação
89 da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de
90 Pelotas, estando registrado e aprovado sob número 9379-2016.

91 Este estudo foi conduzido nas dependências do Centro Agropecuário da Palma,
92 localizado na cidade de Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. Para isso, foram
93 utilizadas 10 vacas leiteiras (4 Holandês e 6 Jersey), com escore de condição corporal
94 de 2,0, ordenhadas duas vezes ao dia, produzindo em média $10,78 \pm 3,0$ e $9,37 \pm 3,93$
95 litros de leite/dia, entre grupo controle e tratamento, respectivamente (Tab. 1).

96 Tabela 1. Dias em lactação, escore de condição corporal, produção de leite, peso vivo e
97 ingredientes da dieta dos grupos controle e tratamento.

Item	Grupos	
	Controle	Tratamento
Dias em Lactação	155±52	153±52
Escore de condição corporal	2,0	2,0
Produção de leite (kg/dia)	10,78±3,0	9,37±3,93
Peso vivo (kg)	456	470
<i>Dieta</i> ¹		
Concentrado (kg MS) ²	2,8	2,8
Silagem (kg MS) ³	0,92	0,92
Butirato 3% (g/ kg PV) ⁴	-	1,5

98 ¹Dieta ofertada diariamente; MS: matéria seca; ²Concentrado a base de: farelo de soja, farelo de trigo,
99 milho integral moído, gordura vegetal, triguilho, proteína bruta: 18%, extrato etéreo: 3,5%. ³Silagem de
100 milho de planta inteira com 35% MS. ⁴CM3000® – Butirato de Sódio 30% – Microencapsulado,
101 Vetanco, Brasil.

102

103 As vacas foram divididas aleatoriamente entre dois grupos: Grupo controle
104 (n=5), o qual recebeu a dieta padrão; Grupo tratamento (n=5), o qual recebeu a dieta
105 padrão acrescida de Butirato de sódio (CM3000® – Butirato de Sódio 30% –
106 Microencapsulado, Vetanco, Brasil) a um nível de 1,5 g/kg de peso vivo (PV), como
107 sugerido por Herrick et al. (2017). Ambos os grupos receberam um acréscimo de 4kg de
108 silagem de milho na dieta, no entanto, segundo cálculo de energia realizado no
109 programa NRC 1.1.9 (2001), a oferta de alimento disponível na propriedade (12kg
110 MS/vaca/dia) não supria adequadamente os requerimentos energéticos dos animais, os
111 quais encontravam-se em balanço energético negativo (BEN), com um déficit de 18,2
112 Mcal/dia.

113 As concentrações de ácidos graxos voláteis da silagem de milho (Tab. 2) foram
 114 avaliadas em laboratório comercial (3rLab, Lavras – MG, Brasil), onde não foram
 115 detectados níveis de ácido butírico, eliminando assim um possível efeito da silagem
 116 sobre os tratamentos.

117 Tabela 2. Concentrações de produtos da fermentação da silagem de milho ofertada aos
 118 animais.

Produtos de fermentação	Concentração
Matéria seca (%)	23,29
Ácido láctico (%MS)	0,57
Ácido acético (%MS)	4,78
Ácido butírico (%MS)	ND*

119 *Não detectado. MS: matéria seca.

120 O período de avaliação foi de 8 dias e, diariamente, foram coletadas amostras
 121 individuais de leite e sangue. Além disso, também foram coletadas amostras para avaliar
 122 as concentrações de BHBA dos animais no dia zero (10 janeiro), antes de iniciar o
 123 experimento (GC: 0,33mmol/LBHBA; GT: 0,54mmol/LBHBA).

124 Com frascos de vidro previamente esterilizados, foram coletados 400ml de
 125 leite/vaca/dia, divididos entre ordenha da manhã e da tarde. Logo após a coleta, as
 126 amostras foram acondicionadas em caixas térmicas a uma temperatura de 4°C.

127 Seguinte ao término da ordenha, ambos os grupos (GC e GT) receberam a dieta
 128 disponibilizada pela propriedade experimental, sendo que o GT teve a inclusão de
 129 1,5g/kg PV de Butirato de sódio 30%. Após o término da alimentação
 130 (aproximadamente uma hora), realizou-se a coleta de sangue através de venopunção da
 131 veia coccígea em tubos *vacutainer* sem anticoagulante. Os tubos já identificados pós
 132 coleta foram acondicionados em caixa térmica a uma temperatura de 4°C até o
 133 processamento no laboratório.

134 No laboratório, o sangue foi imediatamente centrifugado a 1800 x G por 15
 135 minutos (centrifuga SIEGER, Sirius 4000) para a separação completa do soro, o qual foi
 136 transferido para microtubos tipo eppendorf, previamente identificados e congelados a -
 137 20°C. As concentrações de β -hidroxibutirato (BHBA) no soro foram analisadas em
 138 equipamento Bioquímico automático LABTEST Pleno, utilizando um Kit comercial
 139 (BHBA: Ranbut, Randox ® Laboratories Ltd, UK).

140 A determinação qualitativa de álcool no leite fluído foi realizada segundo
141 metodologia determinada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
142 (MAPA), código MET POA/SLAV/42/02/01, emitida em 2014. Para isso, foi
143 acrescentado 3 ml de antiespumante 3% (TEC-Lab®) em 100 ml de leite cru, o qual foi
144 aquecido em kitassato de 500ml mantendo a fervura por 5 min. Em um tubo de ensaio
145 contendo 2 ml de solução sulfocrômica, submergiu-se uma ponteira de vidro de Pasteur
146 conectada a um tubo de silicone ligado ao kitassato contendo o leite em fervura. Este
147 circuito fechado, permite que o álcool presente no leite evapore durante a fervura e
148 chegue, a partir do tubo de silicone, na solução sulfocrômica ($K_2Cr_2O_7 + H_2SO_4$), que
149 por oxirredução gera a alteração na coloração do reagente, indicando assim a presença
150 ou ausência de álcool.

151 Para avaliação dos níveis sanguíneos de BHBA dos grupos, utilizou-se a análise
152 MIXED models considerando os dias e os grupos e sua interação (Dias*Grupos). O
153 nível de significância admitido foi de 95% e o programa estatístico utilizado foi o SAS
154 9.3 (2013).

155

156 Resultados e Discussão

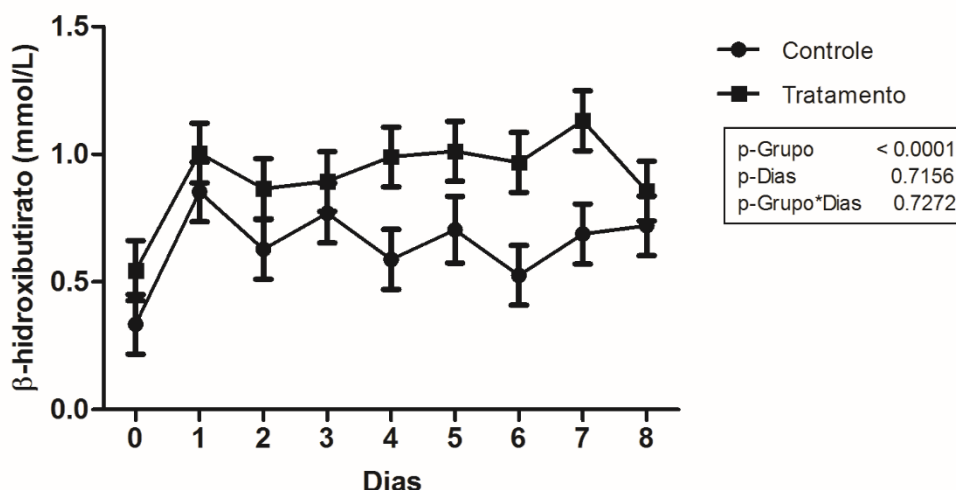
157

158 Somente uma vaca, do GT, teve o leite positivo para presença de álcool
159 mediante teste qualitativo determinado pelo MAPA, código MET
160 POA/SLAV/42/02/01, sendo que do total de 14 amostras coletadas deste animal, 3
161 foram positivas. Segundo alguns autores, a presença de álcoois no leite cru é comum
162 (Toso et al., 2002; Hougaard et al., 2011), principalmente quando os animais
163 apresentam quadros de cetose, caracterizada pela elevação dos níveis de corpos cetônicos
164 e isopropanol, um álcool secundário (Robertson et al, 1950; Robertson & Thin,1953).
165 Neste sentido, sabendo que o leite possui álcoois na sua constituição e, sabendo que o
166 teste proposto pelo MAPA não reage somente com álcool etílico, visto que três
167 amostras de leite cru positivaram durante o experimento, fica clara a ineficácia deste
168 teste em condenar por fraude ou não amostras de leite fluído.

169 Durante o experimento os níveis sanguíneos de BHBA do animal que apresentou
170 amostras positivas no teste de álcool tiveram vários picos, onde somente em um
171 momento ultrapassou o limite de 1,2 mmol/L BHBA (Raboisson et al., 2014),

172 caracterizando cetose subclínica. No entanto, sabe-se que com o aumento dos níveis
173 séricos de BHBA, tem-se também, o aumento das concentrações dos demais corpos
174 cetônicos, acetoacetato e acetona (Esposito et al., 2014). Segundo alguns autores, a
175 acetona, via corrente sanguínea, sofre no rúmen o processo de redução a isopropanol
176 por ação de microrganismos (Bruss e Lopez, 2000; Sato, 2009), já outros autores
177 especulam sobre a redução da acetona pela enzima álcool desidrogenase (ADH),
178 presente no fígado de humanos, ruminantes e outras espécies (Shibusawa et al., 2004;
179 Baik et al., 2009; Cederbaum, 2012). Portanto, é possível que este animal tenha
180 excretado no leite uma concentração considerável de isopropanol, que por ser um álcool
181 secundário, fez com que o leite positivasse no teste qualitativo proposto pelo MAPA.

182 Contudo, mesmo os níveis de BHBA do GT sendo mais elevados que os do GC
183 ($p < 0,0001$) (0,91 mmol/L e 0,64 mmol/L) respectivamente, a suplementação de 1,5g/ kg
184 PV de butirato de sódio não foi o suficiente para causar cetose subclínica nos animais
185 tratados. Entretanto, se esperava um aumento ainda maior dos níveis sanguíneos de
186 BHBA, visto que 75% do butirato produzido no rúmen é oxidado à BHBA no epitélio
187 ruminal pela enzima Butiril-CoA sintetase (Huhtanen et al., 1993; Santos, 2011;
188 Vicente et al., 2014), e o excedente, no fígado, pode ser direcionado a síntese de corpos
189 cetônicos ou ciclo de Krebs via acetil-Coa (Kozloski et al., 2011). Porém, é possível
190 observar na Fig. 1. que os níveis mantiveram-se constantes durante todo o experimento,
191 ao contrário do relatado por Huhtanen et al., (1993) e Miettinen e Huhtanen (1996), que
192 ao suplementar vacas leiteiras com 600g/dia e 750g/dia de butirato de sódio,
193 concentrações ainda menores que as do presente estudo, observaram um aumento linear
194 nas concentrações sanguíneas de BHBA de 1,73 mmol/L e 1,8mmol/L,
195 respectivamente. Ainda neste contexto, Herrik et al. (2017), avaliando a infusão
196 intraruminal durante uma hora de butirato de sódio para vacas em balanço energético
197 positivo a um nível de 1 a 2g/ kg PV, obteve elevação dos níveis sanguíneos de 2,77
198 mmol/L e 3,58 mmol/L de BHBA.



199
 200 Figura 1. Níveis sanguíneos médios de β -hidroxibutirato de vacas suplementadas com
 201 1,5 g/ kg PV butirato de sódio 30% (Tratamento; GT) ou sem suplementação (Controle;
 202 GC) durante o período experimental de 8 dias. $P < 0,0001$ são considerados
 203 significativos.

204

205 Durante o BEN, o déficit energético faz com que o organismo passe a utilizar,
 206 como fonte de energia para os tecidos, os corpos cetônicos, principalmente o BHBA
 207 (Zhang et al, 2016), logo, devido aos animais apresentarem BEN com déficit 18,2
 208 Mcal/dia, presume-se que a utilização do BHBA pelos tecidos tenha resultado no
 209 declínio dos níveis sanguíneos deste metabólito. Além disso, não se descarta a hipótese
 210 da provável utilização deste metabólito pela glândula mamária para síntese de gordura
 211 (Huhtanen et al., 1993; Miettinen e Huhtanen 1996; Mahrt et al., 2014).

212

213 Conclusão

214 A suplementação com 1,5g/kg de peso vivo de Butirato de Sódio durante 8 dias,
 215 não causam cetose subclínica em vacas de baixa produção. Com isso, não foi possível
 216 com este estudo aceitar ou rejeitar a hipótese de que vacas com cetose subclínica
 217 positivam no teste de álcool etílico. Logo, sugere-se um novo estudo utilizando doses
 218 mais elevadas de Butirato de Sódio.

219

220 Referências

221

- 222 BAIK, M.; ETCHEBARNE, B. E.; BONG, J. AND M. VANDEHAAR, J. Gene
223 Expression Profiling of Liver and Mammary Tissues of Lactating Dairy Cows. Asian-
224 Aust. J. Animal. Science. v.22, p.871-884. 2009.
225
- 226 BRUSS, M. L. AND LOPEZ, M. J. Mixed Ruminant Microbes of Cattle Produce
227 Isopropanol in the Presence of Acetone But Not 3-D-Hydroxybutyrate. Journal of Dairy
228 Science. V.83, p.2580–2584, 2000.
229
- 230 CEDERBAUM, A. I. Alcohol Metabolism. Clin Liver Dis. v..16, p.667-685. 2012.
231
- 232 CHAPINAL N.; LEBLANC, S. J.; CARSON, M. E. et al. Herd-level association of
233 serum metabolites in the transition period with disease, milk production, and early
234 lactation reproductive performance. Journal of Dairy Science. v. 95, p. 5676–5682.
235 2012
236
- 237 ESPOSITO, G.; IRONS, P. C.; WEBB, E. C.; CHAPWANYA, A. Interactions between
238 negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in
239 transition dairy cows. Animal Reproduction Science, v.144, p.60– 71. 2014.
240
- 241 HOUGAARD, A. B.; VESTERGAARD, J. S.; VARMING, C. et al. Composition of
242 volatile compounds in bovine milk heat treated by instant infusion pasteurisation and
243 their correlation to sensory analysis. International Journal of Dairy Technology. v 64,
244 N. 1, p.34-44. 2011.
245
- 246 HERRICK, K. J.; HIPPEN, A. R.; KALSCHUR, K. F et al. Single-dose infusion of
247 sodium butyrate, but not lactose, increases plasma B-hydroxybutyrate and insulin in
248 lactating dairy cow. Journal of Dairy Science. v 100, p.757–768, 2017.
249
- 250 HUHTANEN, P., H. MIETTINEN, M. YLINEN. Effect of increasing ruminal butyrate
251 on milk yield and blood constituents in dairy cows fed a grass silage-based diet. Journal
252 of Dairy Science. v. 76, p.1114–1122. 1993.
253

- 254 KOZLOSKI, G. V. Bioquímica de Ruminantes. 3.ed. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2011.
255 p.199.
256
- 257 MAHRT, A., BURFEIND, O. AND HEUWIESER, W. Effects of time and sampling
258 location on concentrations of β -hydroxybutyric acid in dairy cows. Journal of Dairy
259 Science. v.97, p.291–298. 2014
260
- 261 MAREZE, J.; MARIOTO, L. R. M.; GONZAGA, N.; DANIEL, G. C.; TAMANINI,
262 R.; BELOTI, V. Detecção de adulterações do leite pasteurizado por meio de provas
263 oficiais. Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina. V. 36, n. 1, p. 283-290,
264 ago. 2015.
265
- 266 MIETTINEN, H., AND P. HUHTANEN. Effects of the ratio of ruminal propionate to
267 butyrate on milk yield and blood metabolites in dairy cows. Journal of Dairy Science.
268 79:851–861. 1996.
269
- 270 NRC. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. Natl. Acad. Sci. ed.2. NRC, Washington,
271 DC. 2001.
272
- 273 OETZEL, G. R. Herd-Level Ketosis – Diagnosis and Risk Factors. American
274 association of bovine practitioners. 40^a Annual Conference, September, – Vancouver,
275 BC, Canada. 2007.
276
- 277 PALMIERE, C., SPORKERT, F., WERNER, D. et al. Blood, urine and vitreous
278 isopropyl alcohol as biochemical markers in forensic investigations. Legal Medicine.
279 v.14, p.17-20. 2012.
280
- 281 RABOISSON, D., MOUNIE, M., MAIGNE, E. Diseases, reproductive performance,
282 and changes in milk production associated with subclinical ketosis in dairy cows: a
283 meta-analysis and review. J. Dairy Sci. v. 97, p. 7547–7563. 2014.
284
- 285 ROBERTSON, A., C. THIN, AND A. M. STIRLING. Isopropyl alcohol in cows
286 suffering from acetonemia. Nature. p.166:954. 1950.

- 287
288 ROBERTSON, A. E THIN, C. A Study of Starvation Ketosis in the Ruminant. Journal
289 Cambridge. 1953.
290
- 291 SANTOS, J. E. P. Distúrbios Metabólicos. In: _____. Nutrição de Ruminantes. 2.ed.
292 Funep, 2011. p.439-416.
293
- 294 SATO H. Increased blood concentration of isopropanol in ketotic dairy cows and
295 isopropanol production from acetone in the rumen. Animal Science Journal. v. 80.
296 p.381–386. 2009
297
- 298 SILVA, L. C.; TAMANINI, R.; BELOTI, V.; GIOMBELLI, C. J. et al. Influência da
299 água e do álcool na densidade e no ponto de congelamento do leite. Revista Higiene
300 Alimentar, Mirandópolis, v. 25, n. 194/195, mar./abr. 2011.
301
- 302 SHIBUSAWA, Y.; FUJIWARA, T.; SHINDO, H.; ITO, Y. Purification of alcohol
303 dehydrogenase from bovine liver crude extract by dye–ligand affinity counter-current
304 chromatography. Journal of Chromatography B, v.799, p.239–244. 2004.
305
- 306 TOSO, B.; PROCIDA, G.; STEFANON, B. Determination of volatile compounds in
307 cows' milk using headspace GC-MS. Journal of Dairy Research. v 69, p.569±577. 2002.
308
- 309 VALADARES S. C. F & PINA, D. S. Fermentação ruminal. In: _____. Nutrição de
310 Ruminantes. 2.ed. Jaboticabal: Funep, 2011. p.161-191.
311
- 312 VICENTE, F.; RODRÍGUEZ, M. L.; FERNÁNDEZ, A. M.; SOLDADO, A. et al.
313 Subclinical Ketosis on Dairy Cows in Transition Period in Farms with Contrasting
314 Butyric Acid Contents in Silages. The Scientific World Journal. 2014.
315
- 316 ZHANG, G.; HAILEMARIAM, D.; DERVISHI, E.; GOLDANSAZ, S. A. et al. Dairy
317 cows affected by ketosis show alterations in innate immunity and lipid and carbohydrate

318 metabolism during the dry off period and postpartum. *Veterinary Science*. v.107, p.246-
319 256.2016.

5 Conclusão Geral

A suplementação com 1,5g/kg de peso vivo de Butirato de Sódio para vacas de baixa produção, durante 8 dias, não resultou em cetose subclínica. Com isso, não foi possível com este estudo aceitar ou rejeitar a hipótese de que vacas com cetose subclínica positivam no teste de álcool etílico. Logo, sugere-se um novo estudo utilizando doses mais elevadas de Butirato de Sódio.

Referências

- Baik, M.; Etchebarne, B. E.; Bong, J. and M. VandeHaar, J. Gene Expression Profiling of Liver and Mammary Tissues of Lactating Dairy Cows. **Asian-Aust. J. Animal. Science.** v.22, p.871-884. 2009.
- Baird, G. D., K. G. Hibbit, G. D. Hunter, P. Lund, M. Stubbs, and H. A. Krebs. Biochemical aspects of bovine ketosis. **Biochemistry Journal.** 107:683. 1968
- Bell, A. W. Lipid metabolism in liver and selected tissues and in the whole body of ruminant animals. In_____ W. W. Christie (Ed.) **Lipid Metabolism in Ruminant Animals.** Pergamon Press, Oxford, U. K. 1980. p 363.
- Bell A.W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. **Journal of Animal Science** 73, 2804–2819. 1995.
- Bruss, M. L. and Lopez, M. J. Mixed Ruminant Microbes of Cattle Produce Isopropanol in the Presence of Acetone But Not 3-D-Hydroxybutyrate. **Journal of Dairy Science.** V.83, p.2580–2584, 2000.
- Bruss, M. L Lipids and Ketones. In_____ **Clinical Biochemistry of Domestic Animals.** San Diego, California, USA. 2008. p.81-111
- Cederbaum, A. I. Alcohol Metabolism. **Clin Liver Dis.** v..16, p.667-685. 2012.
- Dinić, B.; Đorđević, N.; Anđelković, B.; Sokolović, D.; Terzić, D. Management of fermentation process in ensilaged livestock feed. **Biotechnology in Animal Husbandry.** v.26, p.105-115, 2010.
- Drackley, J. K. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? **Journal Dairy Science.** 82:2259- 2273. 1999.
- Esposito, G.; Irons, P. C.; Webb, E. C.; Chapwanya, A. Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. **Animal Reproduction Science,** v.144, p.60–71. 2014.

Gonzáles, Féliz H. D. **Transtornos metabólicos dos animais domésticos.** Félix H. Díaz Gonzáles, Marcio Nunes Corrêa [e] Sérgio Ceroni da Silva – 2. ed. – Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2014. 344 p.

Gordon, J. L., LeBlanc, S. J., Duffield, T. F. Ketosis Treatment in Lactating Dairy Cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.** V.29, p.433-445. 2013.

Grummer, R. R. Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science.** v.76, p.3882. 1993

Jones, A. E. and Summers, R. L. Detection Of Isopropyl Alcohol In A Patient With Diabetic Ketoacidosis. **The Journal of Emergency Medicine,** v. 19, p. 165–168, 2000.

Jones, A. W. and Rössner S. False-positive breath-alcohol test after a ketogenic diet. **International Journal of Obesity** v.31. p.559–561. 2007.

Kalac P. The effects of silage feeding on some sensory and health attributes of cow's milk: A review. **Food Chemistry.** v.125, p.307-317. 2011.

Mattmiller, S. A., C. M. Corl, J. C. Gandy, J. J. Looor, and L. M. Sordillo. Glucose transporter and hypoxia-associated gene expression in the mammary gland of transition cattle. **Journal of Dairy Science.** v.94, p.2912–2922. 2011.

Mahrt, A., Burfeind, O. and Heuwieser, W. Effects of time and sampling location on concentrations of β -hydroxybutyric acid in dairy cows. **Journal of Dairy Science.** v.97, p.291–298. 2014.

Mareze, J.; Marioto, L. R. M.; Gonzaga, N.; Daniel, G. C.; Tamanini, R.; Beloti, V. Detecção de adulterações do leite pasteurizado por meio de provas oficiais. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde,** Londrina. V. 36, n. 1, p. 283-290, ago. 2015.

Oetzel, G. R. Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.** 20:651–674. 2004.

Oetzel, G. R. Herd-Level Ketosis – **Diagnosis and Risk Factors. American association of bovine practitioners. 40^a Annual Conference**, September, – Vancouver, BC, Canada. 2007.

Palmiere, C., Sporkert, F., Werner, D., Bardy, D., Augsburg, M., Mangin, P. Blood, urine and vitreous isopropyl alcohol as biochemical markers in forensic investigations. **Legal Medicine**. v.14, p.17-20. 2012.

Raboisson, D., Mounie, M., Maigne, E. Diseases, reproductive performance, and changes in milk production associated with subclinical ketosis in dairy cows: a meta-analysis and review. **J. Dairy Sci**. v. 97, p. 7547–7563. 2014.

Robertson, A. E Thin, C. A Study of Starvation Ketosis in the Ruminant. **Journal Cambridge**. 1953

Rodrigues, E.; Castagna, A. A.; Dias, M. T.; Aronovich, M. **Qualidade do leite e derivados**: processos, processamento tecnológico e índices. Rio Rural, Niterói, Rio de Janeiro, p. 11. 2013.

Santos, J. E. P. Distúrbios Metabólicos. In: _____. **Nutrição de Ruminantes**. 2.ed. Jaboticabal: Funep, 2011. p.439-520.

Sato H. Increased blood concentration of isopropanol in ketotic dairy cows and isopropanol production from acetone in the rumen. **Animal Science Journal**. v. 80. p.381–386. 2009

Shibusawa, Y.; Fujiwara, T.; Shindo, H.; Ito, Y. Purification of alcohol dehydrogenase from bovine liver crude extract by dye–ligand affinity counter-current chromatography. **Journal of Chromatography B**, v.799, p.239–244. 2004.

Suthar, V. S., Canelas-Raposo, J., Deniz, A. and Heiwieser, W. 2013. Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows. **J. Dairy Sci**. 96:2925–2938.

Silva, L. C.; Tamanini, R.; Beloti, V.; Giombelli, C. J.; Silva, M. R.; Mantovani, F. D. Influência da água e do álcool na densidade e no ponto de congelamento do leite. **Revista Higiene Alimentar**, Mirandópolis, v. 25, n. 194/195, mar./abr. 2011.

Valadares S. C. F & Pina, D. S. Fermentação ruminal. In: _____. **Nutrição de Ruminantes**. 2.ed. Jaboticabal: Funep, 2011. p.161-191.

Vernon R. G. Lipid metabolism in the adipose tissue of ruminant animals. In_____ W. W. Christie (Ed.) **Lipid Metabolism in Ruminant Animals**. Pergamon Press, Oxford, U. K. 1980. p 23-116.