

UNIVERSIDADE DE UBERABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E PRODUÇÃO ANIMAL
NOS TRÓPICOS (PPGSPAT) - MESTRADO

ANNA JÚLIA SOUSA MONTEIRO

PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E CONSTITUINTES DO LEITE DE VACAS
A1A1 E A2A2 COMO INDICADORES DE QUALIDADE: COMPOSTOS
NITROGENADOS, NÃO NITROGENADOS

UBERABA, MG

2026

ANNA JÚLIA SOUSA MONTEIRO

**PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E CONSTITUINTES DO LEITE DE VACAS
A1A1 E A2A2 COMO INDICADORES DE QUALIDADE: COMPOSTOS
NITROGENADOS, NÃO NITROGENADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba (Uniupe) como requisito para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos.

Orientador: Prof. Dr. André Belico Vasconcelos

Coorientador: Prof. Dr. José Roberto Delalibera Finzer

UBERABA, MG

2026

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

Monteiro, Anna Júlia Sousa.
M764p Parâmetros físico-químicos e constituintes do leite de vacas A1A1 e A2A2 como indicadores de qualidade: compostos nitrogenados, não nitrogenados. / Anna Júlia Sousa Monteiro. – Uberaba (MG), 2026.
64 f. : il., color.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos.
Orientador: Prof. Dr. André Belico Vasconcelos.
Coorientador: Prof. Dr. José Roberto Delalibera Finzer.

1. Leite – Composição. 2. Leite. 3. Nitrogênio. 4. Bovinos de leite. I. Vasconcelos, André Belico. II. Finzer, José Roberto Delalibera. III. Universidade de Uberaba. Programa de Pós -Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos. IV. Título.

CDD 641.371

Tatiane da Silva Viana – Bibliotecária – CRB-6/3171

ANNA JÚLIA SOUSA MONTEIRO


PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E CONSTITUINTES DO LEITE DE VACAS A1A1 E
A2A2 COMO INDICADORES DE QUALIDADE: COMPOSTOS NITROGENADOS, NÃO
NITROGENADOS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

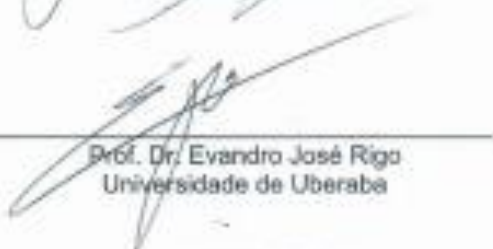
Área de concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos

Aprovada em: 06/02/2026

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. André Balico de Vasconcelos
Universidade de Uberaba



Prof. Dr. Evandro José Rigo
Universidade de Uberaba

 gov.br

Documento assinado digitalmente
CLAUDEMIR OLIVEIRA SOUZA
Data: 2026/02/06 11:00:27-0500
https://brasil.gov.br

Prof. Dr. Claudemir Oliveira Souza
Instituto Federal do Triângulo Mineiro

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pela força, sabedoria e amparo ao longo de toda esta trajetória.

De forma especial, à minha mãe, por ser minha maior fonte de força, incentivo e amor. Seu apoio constante foi essencial para que eu seguisse acreditando no meu caminho, especialmente na área da pesquisa, mesmo diante dos desafios.

À minha família e amigos, que estive ao meu lado em todos os momentos, oferecendo suporte, compreensão e acolhimento nos períodos mais difíceis desta jornada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Belico de Vasconcelos pelo apoio, paciência e confiança ao longo do desenvolvimento deste trabalho, contribuindo não apenas para a minha formação acadêmica, mas também para o meu crescimento pessoal.

À Universidade de Uberaba, pela oportunidade de realização deste mestrado e por toda a formação proporcionada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, à Empresa Agronelli, à Clínica do Leite Ltda. e ao Instituto Federal do Triângulo Mineiro, pelo suporte e incentivo à realização deste trabalho.

A todos que, de alguma forma, estiveram presentes durante este percurso, deixo aqui minha gratidão.

RESUMO

O leite apresenta composição variável, em aspectos quantitativos e qualitativos, podendo ser influenciado por múltiplos fatores. Dentre eles, destacam-se fatores zootécnicos e sanitários, associados à alimentação, potencial genético dos rebanhos, estado fisiológico dos animais (saúde, estágio e número de lactação, nível de produção, idade e intervalo entre ordenhas), bem como ao manejo e às condições ambientais (clima e estação do ano). O objetivo deste trabalho é investigar a composição de proteínas nitrogenadas e compostos não nitrogenados no leite de animais com aptidão leiteira, genotipicamente classificados A2, utilizando o método analítico de Kjeldahl, conforme a metodologia descrita pela AOAC. As amostras de leite foram coletadas na Fazenda da Agronelli, de 18 vacas holandesas. Uma alíquota foi encaminhada ao Laboratório Clínica do Leite Ltda, para realização de análises complementares (teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e sólidos não gordurosos e contagem de células somáticas) conforme os parâmetros da Rede Brasileira de Qualidade do Leite (RBQL/MAPA). Uma segunda alíquota foi enviada ao laboratório do Instituto Federal do Triângulo Mineiro, onde foi realizado o método de Kjeldahl. Os resultados foram obtidos pelo teste de anova e correlação de pearson, que mostraram que os teores de nitrogênio total e proteína bruta foram semelhantes entre os genótipos A1A1 e A2A2. Indicando que, nas condições avaliadas, o genótipo da β -caseína exerceu pouca influência sobre a fração nitrogenada do leite. Esses resultados são relevantes para a indústria de laticínios, pois o leite rico em proteínas melhora o rendimento e o valor nutricional de queijos e derivados.

Palavras-chave: Características. Genótipo. Leite. Método de Kjeldahl. Nitrogênio Total.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AOAC	Association of Official Analytical Chemists
BHB*	Beta-hidroxibutirato (mmol/L)
CCS	Contagem de células somáticas por citometria de fluxo (x mil céls./mL)
GOR	Teor de Gordura (g/100g)
IN	Instrução Normativa
LACT	Teor de Lactose (g/100g)
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	Miligrama
ml	Mililitro
nm	Newton-metro (torque) ou para o nanômetro (comprimento)
NU	Nitrogênio ureico do leite (mg/dL)
PA	Peso amostra
P.A	Para Análise
PREF	Ácidos graxos pré-formados (g/100g de leite)
PROT	Teor de Proteína (g/100g)
ST	Teor de Sólidos Totais (g/100g)
µm	Micrômetro

LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1 - NITROGÊNIO = $V_{HCL} \times N_{HCL} \times 14 \times FC_{HCL} \times 100$	35
EQUAÇÃO 2 - $PB(\%) = NT(\%) \times TAS$	35

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- LOCALIZAÇÃO E ESTRUTURA ANATÔMICA DA GLÂNDULA MAMÁRIA BOVINA.....	13
FIGURA 2- SISTEMA DE SUPORTE E SEPARAÇÃO DOS QUARTOS MAMÁRIOS DO ÚBERE. ...	14
FIGURA 3- ESTRUTURA DA GLÂNDULA MAMÁRIA.....	15
FIGURA 4- DIFERENCIAÇÃO NA POSIÇÃO 67 RESPONSÁVEIS PELA CLIVAGEM DIFERENCIAL E LIBERAÇÃO DE BCM-7.	26

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - QUANTIDADE DE COMPONENTES SELECIONADOS DO COLOSTRO BOVINO COMO PORCENTAGEM EM RELAÇÃO AO NÍVEL ENCONTRADO NO LEITE NORMAL.....	16
TABELA 2 - TÉCNICAS UTILIZADAS PARA AVALIAÇÃO DO LEITE, DE ACORDO COM A INº 76 E IN 77º	18
TABELA 3 - VARIAÇÃO NOS TEORES DE GORDURA E PROTEÍNA NO LEITE DE VACAS PERTENCENTES A DIFERENTES RAÇAS.	22
TABELA 4 - TRANSIÇÃO DA COMPOSIÇÃO LÁCTEA EM VACAS HOLANDESAS: COLOSTRO, LEITE DE TRANSIÇÃO E AO LEITE.....	23
TABELA 5 - FATORES ESPECÍFICOS PARA ALGUNS TIPOS DE AMOSTRAS UTILIZADOS NO CÁLCULO DE PROTEÍNA.....	29
TABELA 6 - MÉDIA DOS RESULTADOS DA PADRONIZAÇÃO DO EXPERIMENTO COM AMOSTRAS DE 100 MG E 300 MG DE LEITE A1A1 E A2A2: PRECISÃO ANALÍTICA E PORCENTAGEM DE NITROGÊNIO E PROTEÍNAS.....	31
TABELA 7 - DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS NOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	32
TABELA 8 - ANÁLISES E METODOLOGIAS UTILIZADAS PELO LABORATÓRIO CLÍNICA DO LEITE LTDA.	37
TABELA 9 - ANIMAIS SUBMETIDOS AO TESTE DE CCS (N=18).....	39
TABELA 10 - PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS MÉDIOS DO LEITE BOVINO EM DUAS COLETAS EXPERIMENTAIS.	41
TABELA 11 - PESAGEM PARA DETERMINAÇÃO DE PORCENTAGEM DE PROTEÍNA BRUTA. ...	42
TABELA 12 - QUANTIFICAÇÃO DA MÉDIA DO TEOR DE NITROGÊNIO TOTAL E PROTEÍNAS BRUTA NAS AMOSTRAS DE LEITE A1 E A2 POR MEIO DO MÉTODO DE KJELDAHL,DURANTE A 1º E 2º COLETA.....	43
TABELA 13 - QUANTIFICAÇÃO DA MÉDIA DO TEOR DE NITROGÊNIO TOTAL E PROTEÍNAS BRUTA NAS AMOSTRAS DE LEITE A1 E A2 POR MEIO DO MÉTODO DE KJELDAHL,DURANTE A 3ª COLETA, REALIZADA EM MOMENTOS DISTINTOS DE UMA MESMA ORDENHA.	45
TABELA 14 - MÉDIAS, ERRO PADRÃO E SIGNIFICÂNCIA DA ANOVA PARA VARIÁVEIS DO LEITE SEGUNDO OS GRUPOS GENÉTICOS A1A1 E A2A2.....	47
TABELA 15 - PRINCIPAIS CORRELAÇÕES ENTRE VARIÁVEIS METABÓLICAS, LIPÍDICAS E PROTEICAS DO LEITE.	52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA	12
2.1 FISIOLOGIA DAS GLÂNDULAS MAMÁRIAS	13
2.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE	17
2.4 CARACTERÍSTICAS LEITE A1A1 E A2A2	24
2.5 MERCADO LEITE A2A2	27
2.6 MÉTODO KJELDAHL	29
3 OBJETIVO	30
3.1 OBJETIVO GERAL:	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 PRÉ- EXPERIMENTO - PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE KJELDAHL ... 30	
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	32
4.3 ESTATÍSTICA	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	40
5.3 % DE NITROGÊNIO E PROTEÍNA BRUTA	43
5.4 ANÁLISE DE VARIÁVEIS	46
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
7 CONCLUSÃO	55
8 REFERÊNCIAS	56
9 ANEXOS	63
9.1 COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	63
9.2 DECLARAÇÃO DE CONCLUSÃO	64

1 INTRODUÇÃO

O leite destaca-se como uma das principais commodities agropecuárias do Brasil. Segundo a Pesquisa Trimestral do Abate, Leite e Ovos (IBGE, 2024), analisada pela CNA, a captação de leite em 2024 totalizou 25,37 bilhões de litros, com crescimento de 3,1% em relação a 2023, configurando o segundo maior volume da série histórica.

Esse crescimento na produção tem sido fortemente impulsionado pelo aumento da demanda por alimentos nutricionalmente densos, especialmente em países em desenvolvimento, onde há uma crescente necessidade por fontes de proteína de alta qualidade. (Houssard *et al.*, 2021; Üçtuğ, 2019).

Do ponto de vista do consumo humano, a definição legal do leite descrita no artigo 235 obtido, no Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA (Brasil, 2017) define-se por leite, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas.

É um alimento natural, sem aditivos químicos, além de possuir riqueza nutricional e características físico-químicas que propiciam para o desenvolvimento de variados produtos lácteos (iogurte, queijo, requeijão etc.) (APN, 2016).

Da perspectiva físico-química, o leite pode ser descrito como uma solução aquosa que contém lactose, sais orgânicos e inorgânicos, na qual se encontram partículas coloidais de diferentes dimensões: proteínas do soro totalmente dissolvidas, caseínas organizadas em grandes agregados coloidais chamados micelas, com tamanho entre 50 e 500 nm, e lipídios emulsificados formando glóbulos que variam de 1 a 20 μm (Fox, 2004).

O leite é composto por cerca de 87% de água e 12 a 13% de sólidos. Entre esses sólidos, os principais componentes são a lactose (3,5% a 6%), gordura (2,5% a 6%), e proteínas (2,8% a 4,5%), além de sais minerais e vitaminas em menor quantidade. Caracterizando-se em um alimento essencial para a saúde, ajudando na construção de tecidos, no desenvolvimento físico e intelectual, e fornecendo cálcio, vitaminas, potássio, aminoácidos e fósforo (Nelson, 2019; Silva; Veloso, 2011).

É válido ressaltar, que o leite é um produto complexo e nutritivo que contém mais de 100 substâncias que estão em solução, suspensão ou emulsão em água (Wattiaux, 2015).

Por ser um fluido biológico, o leite apresenta composição muito variável, tanto no aspecto quantitativo, quanto no qualitativo pois é influenciado por múltiplos fatores, dentre os quais se destacam: os fatores zootécnico e sanitário, associados à alimentação, potencial genético dos rebanhos, estado fisiológico (saúde, estágio, número de lactação, nível de produção, idade do animal e intervalo de ordenhas), manejo e ambiente (clima e estação do ano) (Brito, *et. al*, 2020; Noro *et al.*, 2004).

Dentre os principais componentes do leite que podem sofrer variação em função desses fatores, destacam-se as proteínas, que possuem grande importância nutricional e tecnológica. No caso da raça Holandesa, por exemplo, o leite apresenta cerca de 3,2% de proteína. Dentro desse total, aproximadamente 80% são caseínas (CN), enquanto os 20% restantes correspondem às proteínas do soro do leite. (Rentero, 2023).

O mercado tem demonstrado crescente interesse pela produção de leite A2, potencializado pelos benefícios à saúde atribuídos ao seu consumo. Esse tipo de leite está associado à redução de desconfortos gastrointestinais, como inchaço e gases, uma vez que não contém a β -caseína A1, proteína relacionada a sintomas digestivos em indivíduos sensíveis (Milkpoint, 2021).

Partindo destas conjecturas, o presente estudo tem como objetivo principal determinar o teor de nitrogênio total no leite por meio do método de Kjeldahl, com o intuito de quantificar tanto as frações proteicas nitrogenadas quanto os compostos não nitrogenados.

Essa análise foi realizada em amostras provenientes de animais com aptidão leiteira, previamente genotipados como A2A2 pela empresa parceira Agronelli, que já realizou a caracterização genética dos animais do rebanho. A seleção desse genótipo específico justifica-se pelo crescente interesse científico e mercadológico em leites provenientes de vacas A2A2, associados a potenciais benefícios digestivos e nutricionais em comparação ao leite convencional (A1A1 ou A1A2).

A escolha do método de Kjeldahl fundamenta-se em seu reconhecimento internacional como referência analítica para a determinação de proteínas em indústrias lácteas, conforme preconizado pela AOAC (2016 — Association of Official Analytical Chemists). Trata-se de um procedimento robusto, amplamente validado e capaz de fornecer resultados precisos e reprodutíveis, essenciais para estudos que

buscam correlacionar a composição proteica com aspectos nutricionais, tecnológicos e de qualidade do leite.

Paralelamente, foram avaliados parâmetros complementares de qualidade do leite como teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e não gordurosos (analisados por espectrometria no infravermelho médio, ISO 9622) e contagem de células somáticas (CCS, por citometria de fluxo, ISO 13368-2) em parceria (Laboratório Clínica do Leite Ltda). Essas análises permitiram estabelecer correlações entre o perfil de proteínas nitrogenadas (obtido por Kjeldahl) e os indicadores de qualidade e sanidade do leite, contribuindo para uma avaliação integrada do potencial produtivo e funcional do leite de animais A2A2.

As análises pelo método de Kjeldahl foram conduzidas no laboratório do Instituto Federal do Triângulo Mineiro, sob responsabilidade da pesquisadora deste trabalho, após treinamento prévio na técnica, garantindo o rigor metodológico necessário para a execução do procedimento.

Este trabalho também se reveste de relevância teórico-prática por desenvolver e aprimorar uma parceria de pesquisa entre a Universidade do Agro e o Instituto Federal do Triângulo Mineiro como também a parceria com a empresa Agronelli e o Laboratório Clínica do Leite (LTDA), empresas com relevância nesta área do estudo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Um tema que está sempre em voga atualmente, refere-se à questão da produção e qualidade do leite, e sua importância para o desenvolvimento dos seres humanos. A partir dessas indagações, o conhecimento do que é leite, suas características físico-químicas e as propriedades dos nutrientes, torna-se um dos eixos centrais para estudos sobre como produzir mais e com melhor qualidade, visando atender uma maior parcela da sociedade e da indústria, lembrando que o leite é a matéria-prima primordial para uma ampla variedade de produtos.

Sobre este prisma, antes de abordar o objetivo central deste estudo que consiste em avaliar a composição proteica e os compostos nitrogenados no leite de vacas leiteiras dos genótipos A1A1 e A2A2, é essencial compreender os fundamentos biológicos e químicos que envolvem a secreção e a composição do leite bovino.

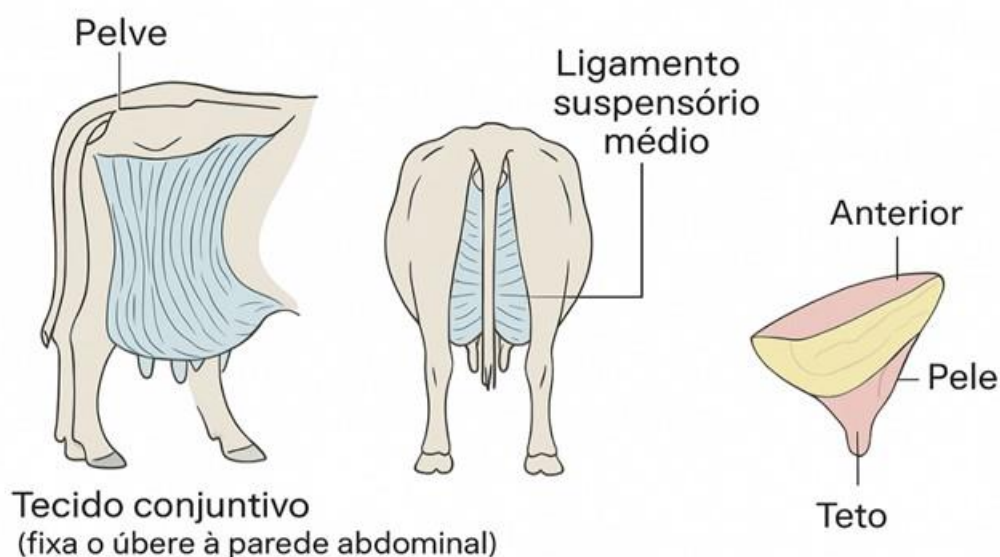
Neste sentido, para dar fundamentação teórica sobre estes questionamentos, foi realizado uma pesquisa bibliográfica, tendo como base estudiosos sobre leite, qualidade do leite e suas propriedades. Dentre os principais pesquisadores optamos por utilizar trabalhos acadêmicos, livros e artigos nacionais e internacionais em que os seguintes pesquisadores tem se dedicado a estudar sobre o tema, destaque para os estudos de: (Colville; Bassert, 2010; Fontaneli, 2001; Fontanel; Stelwagen, 2003; Brito et al., 2020; Souza, 2005)

Essa análise é pertinente para compreendermos em que proporção criação, manejo e tipo de animal interfere na produção e qualidade do leite, assim como singularidades.

2.1 FISIOLOGIA DAS GLÂNDULAS MAMÁRIAS

As glândulas mamárias em bovinos estão localizadas na região inguinal, como demonstrado na Figura 1, e normalmente apresentam-se em número de quatro glândulas. Refere-se a glândulas da pele altamente especializadas, no qual a função principal é a produção de colostro e leite, alimento indispensável para a sobrevivência do neonato nas primeiras horas, dias e semanas de vida. (Colville; Bassert, 2010).

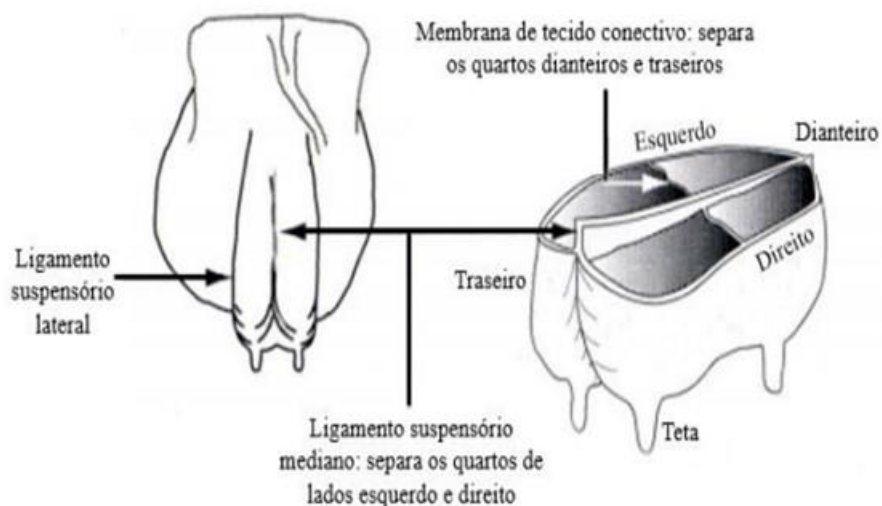
Figura 1- Localização e estrutura anatômica da glândula mamária bovina



Fonte: Adaptado de: IPEAyT 242 Morteros (2020)

Cada glândula mamária corresponde a um quarto, sendo independentes entre si (Figura 2). Cada quarto possui um sistema próprio de secreção e ductos que afluem para as tetas, de modo que a perda funcional de uma glândula não prejudica diretamente as demais. A unidade secretora fundamental da glândula (Figura 3), é o alvéolo, que é uma estrutura formada por células epiteliais secretoras organizadas em formato sacular, responsáveis pela síntese e liberação dos componentes do leite.

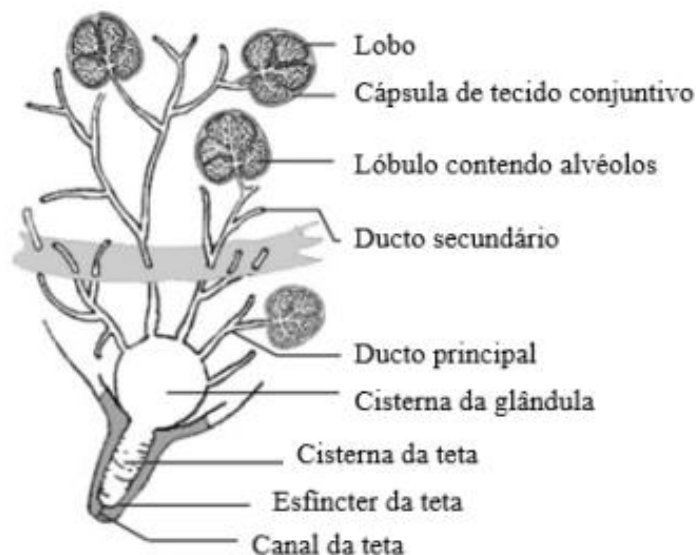
Figura 2- Sistema de suporte e separação dos quartos mamários do úbere.



Fonte: Adaptado de: BRITO; SALES, 2007.

O conteúdo produzido nos alvéolos é conduzido ao ducto alveolar, que se comunica com a cavidade da glândula, localizada dorsalmente e acima da teta. Essa cavidade é contínua à cavidade da teta, funcionando como reservatório transitório de leite. Nesses compartimentos, o leite acumula-se após o estímulo da ejeção, podendo ser removido tanto pela sucção do bezerro, quanto pela aplicação de vácuo controlado durante a ordenha mecânica. (Colville; Bassert, 2010; Klein, 2013).

Figura 3- Estrutura da glândula mamária.



Fonte: Adaptado de: BRITO; SALES, 2007.

A microbiota ruminal desempenha um papel fundamental tanto na produção direta de componentes do leite, quanto na geração de precursores metabólicos que são utilizados pela glândula mamária na síntese de leite, incluindo proteínas e vitaminas. O leite é constituído por nutrientes sintetizados nas glândulas mamárias a partir de precursores presentes na corrente sanguínea, os quais são filtrados e metabolizados pelas células alveolares. (Brito, *et al.*, 2020; Lokuge *et al.*, 2024).

Fontaneli (2001.), evidencia que a fermentação ruminal é extremamente importante pois está ligada a produção e composição do leite, já que é por meio de aminoácidos e peptídeos absorvidos a nível intestinal que serão disponibilizados para a síntese de proteínas do leite, apenas as albuminas e imunoglobulinas, por estarem presentes no sangue, são transferidas diretamente às células secretoras da glândula mamária.

De acordo com Klein (2013) do ponto de vista celular, a síntese dos componentes do leite envolve diferentes organelas. As proteínas, em especial a caseína, são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e posteriormente transportadas ao aparelho de Golgi, onde sofrem processos de fosforilação e organização em micelas, que ficam armazenadas em vesículas. A lactose, principal carboidrato do leite, também é sintetizada nas vesículas de Golgi e liberada de forma

concomitante às proteínas (Klein, 2013). A secreção desses constituintes segue o mecanismo de exocitose, resultante da fusão das vesículas à membrana celular. Tal processo difere do mecanismo de liberação da gordura do leite, que ocorre por via distinta, destacando a complexidade e a especificidade funcional da glândula mamária) (Colville; Bassert, 2010; Klein, 2013).

Aproximadamente, um terço da proteína dietética é utilizado por bactérias e protozoários do rúmen, sendo convertido em proteína microbiana, a qual fornece a maior parte dos aminoácidos necessários para a síntese de proteína do leite nas glândulas mamárias (Stelwagen, 2003).

Com relação ao colostro bovino, ele se diverge da composição do leite, caracterizando-se pela elevada concentração de sólidos totais, lipídeos, vitaminas e, principalmente, proteínas. Dentre essas, destacam-se a caseína, a albumina e, sobretudo, as imunoglobulinas. Simões (2005) descreve que o colostro é uma secreção da glândula mamária, por aproximadamente 72 horas, sendo as primeiras 24 horas, as mais abundantes em imunoglobulinas e proteínas, conforme apresentado na tabela 1.

Tabela 1 - Quantidade de componentes selecionados do colostro bovino como porcentagem em relação ao nível encontrado no leite normal.

Constituinte	0 dias	3 dias	4 dias
Matéria seca	220	100	100
Lactose	45	90	100
Lipídeos	150	90	100
Minerais	120	100	100
Proteínas			
Caseína	210	110	110
Albumina	500	120	105
Globulina	3500	300	200
Vitaminas			
A	600	120	100
Caroteno	1200	250	125
E	500	200	125
Tiamina	150	150	150
Riboflavina	320	130	110
Ácido pantotênico	45	110	105

Fonte: Adaptado de Jacobson NL, McGilland AD: The mammary gland and lactation. In Swenson MJ, editor: Dukes' physiology of domestic animals, ed 10, Ithaca, NY, 1984, Cornell University Press.-

Cunningham tratado de fisiologia veterinária, Capítulo 39: A Glândula Mamária| Bradley G. Klein, PhD

Nos primeiros dias após o parto, observa-se que a quantidade de proteínas totais no colostro é significativamente superior à do leite normal. A caseína, principal proteína estrutural do leite, apresenta-se em concentrações mais altas no leite do dia do parto, reduzindo gradualmente até atingir valores próximos à normalidade no terceiro e quarto dia. Essa proteína tem papel essencial na digestibilidade do leite, além de atuar como fonte de aminoácidos para o crescimento do bezerro.

2.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE

Os constituintes principais do leite são água, lactose, gordura, proteínas como a caseína e albumina, minerais e vitaminas, os quais são fatores determinantes para a qualidade da composição do leite (Brito, et. al., 2020).

A quantidade de cada componente é influenciada, em diferentes graus, pela nutrição e estado metabólico do animal que o produz, sendo a alimentação responsável por 50% das variações de gordura e proteínas do leite. (Freedon.1996).

Gonzáles e Campos (2003), afirmam que a quantidade de água no leite depende diretamente da síntese de lactose, principal fator osmótico, pois durante a síntese do leite a lactose atrai a água para as células epiteliais do tecido mamário.

A gordura está presente no leite em glóbulos pequenos e suspensos, cada glóbulo é revestido por uma camada de fosfolipídios que evita os glóbulos de se agregarem, por repulsão dos outros glóbulos de gordura e atração de água. (Pereira, 2008).

As normativas vigentes para a produção de leite no Brasil são a Instrução Normativa nº 76 e a Instrução Normativa nº 77, estabelecidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Ambas foram publicadas em 30 de novembro de 2018, e estão vigor desde junho de 2019 em todo o território nacional. A INº 76, estabelece padrões de identidade e qualidade do leite cru refrigerado, pasteurizado e do leite tipo A. Objetivando garantir a segurança alimentar e a padronização da matéria-prima utilizada na indústria. E a INº 77 estabelece os requisitos para a obtenção de leite de qualidade, desde a produção nas propriedades rurais até a captação pela indústria. Suas diretrizes incluem boas práticas agropecuárias, controle da saúde do rebanho e condições higiênico-sanitárias,

visando assegurar um produto de alto valor nutricional e seguro para o consumidor (Brasil, 2018).

O leite cru refrigerado deve cumprir com as normativas descritas na IN^o 76, dentre elas as características sensoriais do leite sendo que o mesmo deve ser líquido branco opalescente homogêneo e com odor característico. E atender aos parâmetros físico-químicos instituídos, como a acidez titulável entre 0,14 e 0,18 g de ácido láctico/100mL, estabilidade ao alizarol a no mínimo 72% v/v, proporção do volume de um líquido em relação ao volume total da solução, densidade relativa entre 1,028 e 1,034 a 15°C e índice crioscópico variando entre -0,530^oH e -0,555^oH análise diária para a recepção do leite *in-natura* refrigerado é realizada utilizando desses parâmetros. (Brasil, 2018).

Adicionalmente, o leite cru refrigerado não pode conter substâncias incomuns à sua composição, como agentes inibidores do crescimento microbiano, neutralizantes da acidez e aditivos que alterem sua densidade ou índice crioscópico. Também deve estar livre de resíduos de produtos veterinários e contaminantes em níveis superiores aos permitidos pelas normas complementares. (BRASIL, 2018).

A IN^o 76 padroniza os parâmetros físico-químicos do leite cru refrigerado, como por exemplo o teor mínimo de gordura deve ser de 3,0g/100g. E a IN 77^o padroniza as análises que serão realizadas mensalmente pôr a Rede Brasileira de Laboratórios de Qualidade do Leite (RBQL), as análises descritas na tabela 2 estão expostas em anexo na normativa 77, descrevendo apenas os métodos das análises que são padronizadas por todos os laboratórios- RBQL, a metodologia do teor de gordura é escolhida de acordo com cada laboratório credenciado. (Brasil, 2018).

Tabela 2- Técnicas utilizadas para avaliação do leite, de acordo com a IN^o 76 e IN 77^o .

TEOR MÍNIMO DE:	PARÂMETROS	MÉTODO:	UNIDADE:
	FÍSICO-QUÍMICO:		
PROTEÍNA TOTAL	2,9g/100g	Método ISO 9622 / IDF 141 ancorado por calibração ao método ISO 8968-1 / IDF 20-1 (método de referência)	g/100 g

LACTOSE ANIDRA	4,3g/100g	Método ISO 9622 / IDF 141 ancorado por calibração ao método ISO 22662 / IDF 198 (método de referência).	g/100 g
SÓLIDOS NÃO GORDUROSOS	8,4g/100g	Método ISO 9622 / IDF 141 ancorado por calibração aos métodos IDF 001 / ISO 1211 (método de referência) e IDF 021 / ISO 6731 (método de referência).	g/100 g
SÓLIDOS TOTAIS	1,4g/100g	Método ISO 9622 / IDF 141 ancorado por calibração ao método ISO 6731 / IDF 021 (Método de referência).	g/100 g
CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS	Máximo 500.000 CS/TA (quinhentas mil células por mililitro).	Método citométrico em fluxo segundo ISO 13366-2 / IDF 148-2 ancorado por calibração ao método ISO 13366-1 / IDF 148-1 (Método de referência).	Células somáticas por mililitro (CS/mL)
CONTAGEM PADRÃO EM PLACAS	Máximo 300.000 UFC/mL (trezentas mil unidades formadoras de colônia por mililitro)	Método citométrico em fluxo segundo ISO 13366-2 / IDF 148-2 ancorado por calibração ao método ISO 13366-1 / IDF 148-1 (Método de referência).	Unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL)

Tabela adaptada: INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 77, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2018; INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 76, DE 26 DE NOVEMBRO DE 2018.

Os laboratórios são credenciados à Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite (RBQL), estrutura oficial coordenada pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). A RBQL é composta por nove laboratórios distribuídos em diferentes estados brasileiros, formando uma rede nacional voltada à padronização e ao monitoramento analítico da qualidade do leite. Esses laboratórios adotam procedimentos metodológicos harmonizados e seguem protocolos de controle de qualidade que asseguram rastreabilidade, precisão e comparabilidade dos resultados. Entre os laboratórios credenciados à RBQL estão: a Gerência de Diagnóstico Laboratorial (GEDLAB), no Espírito Santo; o Centro de Pesquisa em Alimentos (CPA/UFG), em Goiás; o Laboratório de Análise da Qualidade do Leite da Escola de Veterinária da UFMG, em Minas Gerais; o Laboratório Centralizado de Análise de Leite do Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros, no Paraná; o Centro de Pesquisa em Alimentação (CEPA/UPF), no Rio Grande do Sul; e a Clínica do Leite (ESALQ/USP), em São Paulo, que atuou como responsável pelas análises deste trabalho, citadas na tabela 2.

2.3 PROTEÍNAS DO LEITE

A proteína do leite tem sido o nutriente mais valorizado em sistemas de pagamento por componentes, principalmente por influir diretamente no rendimento industrial de derivados lácteos. (Noro, 2004; Milkpoint, 2021). Especialmente as caseínas, que desempenham papel crucial na indústria de laticínios, influenciando diretamente a qualidade e o rendimento dos produtos. Na fabricação de queijos, por exemplo, um maior teor de caseína no leite resulta em maior rendimento, pois essa fração proteica é responsável pela formação do gel e da massa do queijo. Além disso, em leites fermentados, a consistência elevada é atribuída à formação da rede proteica; quanto maior o teor de caseína, maior a viscosidade dos produtos elaborados (Milkpoint, 2023).

O termo proteoma refere-se ao conjunto completo de proteínas expressas por uma célula, tecido ou organismo em um dado momento. A proteômica, por sua vez, é a abordagem que permite estudar esse conjunto proteico, por meio de técnicas de separação e identificação, incluindo eletroforese, cromatografia, espectrometria de massas e ferramentas de bioinformática (Hein *et al.*, 2013).

Modificações pós-traducionais desempenham um papel crucial na regulação da estrutura e função de diversas proteínas, incluindo aquelas com papéis essenciais em processos biológicos como as proteínas de membrana, proteínas secretoras e histonas. Essas modificações têm um impacto significativo sobre uma variedade de propriedades das proteínas, afetando sua função, a montagem de enzimas e sua estabilidade (Ryšlává et al., 2013).

As proteínas desempenham diversas funções essenciais nas células, incluindo a regulação da expressão gênica, a catalização de reações metabólicas e a constituição da estrutura celular. Alterações genéticas que resultam na ausência de certas proteínas ou em alterações na sua estrutura, comprometendo suas funções, podem levar ao desenvolvimento de doenças ou atuar como indicadores destas, como ocorre na fenilcetonúria, causada pela deficiência ou inatividade da enzima fenilalanina hidroxilase. (ARN, 2014).

As proteínas do leite apresentam propriedades funcionais, como solubilidade, formação de espuma e capacidade emulsificante, que dependem de suas características físico-químicas e influenciam a textura, viscosidade e aceitação dos alimentos, além de favorecer a formação de géis. Essas proteínas podem sofrer modificações químicas ou pós-traducionais — como acetilação, fosforilação, desamidação e glicosilação — que ajustam suas propriedades para aplicações alimentícias ou farmacêuticas. (Imafidon; Farkye; Spanier, 1997).

De acordo, Imafidon *et al.*, (1997), as proteínas do leite são integradas por caseínas, proteínas do soro do leite e proteínas da membrana do glóbulo de gordura do leite (MFGM), além de enzimas. Sendo que as caseínas são fosfoproteínas que precipitam do leite em pH 4,6 e 30 °C. As principais caseínas no leite bovino são α 1-CN, α 2-CN, β -CN e κ -CN, em proporções aproximadas de 0,45:0,11:0,33:0,11.

As proteínas representam cerca de 4% dos sólidos presentes no leite. Essa proporção pode ser influenciada por diversos fatores, como a raça do animal, e geralmente é proporcional ao teor de gordura do leite. De maneira geral, quanto maior o teor de gordura no leite, maior será a concentração de proteína. (Brito, *et al.*, 2020). Conforme apresentado na tabela 3, Fontaneli (2001) destaca que a variação no teor de gordura do leite está diretamente relacionada à raça dos animais e ao tipo de alimentação adotado.

Tabela 3- Variação nos teores de gordura e proteína no leite de vacas pertencentes a diferentes raças.

Raça	Gordura	Proteína	Gordura/Proteína
Holandês	3,74	3,20	0,88
Jersey	4,73	3,78	0,80
Pardo Suíço	4,02	3,56	0,89

Fonte: Adaptado Fontaneli (2001).

O período de lactação influencia na produção de proteínas dos animais, sendo que nos primeiros três meses de lactação é catalogado menores concentrações de proteínas e vai se registrando o aumento progressivamente na proporção em que a lactação evolui, seguindo uma tendência contrária a produção diária. O número de lactação também influencia a concentração de proteínas, sendo que quanto maior o número de lactações, menor a concentração de proteínas. (Noro, 2004 apud Carvalho, 2002; Cunha *et al.*, 2002).

Observa-se que na tabela 4, as concentrações dos componentes do leite mencionados são mais elevadas no colostro, diminuindo gradativamente ao longo das ordenhas seguintes, leite de transição, até atingirem os níveis mais baixos encontrados no leite, como é possível ser observado no leite integral comercializado. (Godden *et al.*, 2019).

Tabela 4 - Transição da composição láctea em vacas Holandesas: colostro, leite de transição e ao leite.

Ordenhas pós-parto					
Variável		Colostro	Leite de Transição		Leite
Sólidos (%)	totais	23,9	17,9	14,1	12,9
Gordura (%)		6,7	5,4	3,9	4,0
Caseína (%)		4,8	4,3	3,8	2,5
Lactose (%)		2,7	3,9	4,4	5,0
Cálcio (%)		0,26	0,15	0,15	0,13
Magnésio (%)		0,24	0,01	0,01	0,01
Potássio (%)		0,14	0,13	0,14	0,15
Sódio (%)		0,07	0,05	0,05	0,04
Vitamina A		295	190	113	34
Vitamina E		84	76	56	15

Fonte: Adaptado de Foley JA, Otterby DE, 1978. Godden *et al.*, 2019; Heisler, 2023).

Em seus estudos Ruska e Jonkus (2014), observaram que o leite bovino apresenta seu nitrogênio total (NT) distribuído em duas frações principais: a proteína verdadeira e o nitrogênio não proteico (NNP). A proteína verdadeira constitui a fração funcional do leite, composta principalmente por caseínas, lactoalbuminas e lactoglobulinas, desempenhando papéis essenciais tanto na nutrição quanto nas propriedades tecnológicas do leite, como a coagulação e o rendimento na fabricação de queijos. Em contraste, o NNP é formado por compostos como ureia, aminoácidos livres, peptídeos de baixo peso molecular e amônia. Embora contribua para o NT, essa fração não possui função proteica significativa no organismo. Segundo Ruska e

Jonkus (2014), a concentração de NNP no leite de vacas leiteiras varia entre 0,194% e 0,232%, dependendo das condições de manejo e alimentação da fazenda.

Entende-se que a quantificação do NNP é realizada subtraindo-se o nitrogênio das proteínas verdadeiras do nitrogênio total, permitindo a distinção clara entre as frações proteicas e não proteicas. Essa diferenciação é fundamental para avaliar a qualidade nutricional do leite e para a formulação de dietas balanceadas, evitando a superestimação da proteína disponível para o organismo e garantindo um correto aproveitamento das proteínas funcionais presentes no leite. (Ruska; Jonkus, 2014).

2.4. CARACTERÍSTICAS LEITE A1A1 E A2A2

Para Sgarbieri (2005), as principais proteínas do leite são a caseína, a β -caseína e a α -lactoalbumina. Os cinco tipos de caseínas representam 80% das proteínas do leite, o restante é constituído pela b-lactoglobulina e α -lactoalbumina com 16% e 4% do total das proteínas, respectivamente. Outras proteínas, como, por exemplo, as enzimas, as imunoglobulinas e os hormônios, são encontrados em pequenas quantidades. Tanto a β -caseína como a α -lactoalbumina são nutricionalmente melhores que a caseína, devido ao maior conteúdo de aminoácidos essenciais, como lisina, metionina e triptofano.

A composição proteica total do leite reúne várias proteínas específicas, dentre elas a mais importante é a caseína, no qual representa cerca de 80% do nitrogênio proteico e são classificadas em quatro frações principais: α s1-, α s2-, β - e κ -caseína, similares em sua estrutura. (Noro,2001.).

Cada fração possui composição de aminoácidos, fosforilação e propriedades estruturais específicas, que determinam sua função no sistema coloidal do leite e em produtos derivados (Imafidon; Farkye; Spanier, 1997).

A β -caseína é uma das mais abundantes, representando de 30 a 45% das caseínas totais do leite bovino. Essa proteína apresenta um caráter relativamente hidrofóbico, com distribuição assimétrica de regiões polares e apolares ao longo da cadeia polipeptídica. A região N-terminal (1–68) é predominantemente hidrofílica, enquanto a C-terminal (169–209) é fortemente hidrofóbica, característica que favorece sua associação com lipídios e confere elevada flexibilidade conformacional devido ao alto teor de resíduos de prolina. Essa plasticidade estrutural torna a β -caseína fundamental na estabilização de micelas e emulsões, influenciando

propriedades funcionais como solubilidade, formação de espuma e comportamento térmico. (Imafidon; Farkye; Spanier, 1997).

Portanto, a β -caseína, além de representar uma fração expressiva da proteína total do leite, destaca-se também por suas propriedades estruturais e tecnológicas, e por sua variabilidade genética, que pode impactar tanto o processamento industrial quanto a digestibilidade e os efeitos fisiológicos em humanos.

A micela de caseína tem como função servir de fontes de nutrientes para o neonato, fornecendo aminoácidos, cálcio e fosfato de alta digestibilidade. A desestabilização da estrutura da micela de caseína é feita por proteases, desenvolvendo assim o mecanismo da digestão do leite, contrariamente a desestabilização da estrutura das micelas de caseína e a parcial hidrólise da caseína, por exemplo, ao longo do processo inflamatório do tecido mamário (mastite), diminuem a qualidade do leite fluido e a produção de leite. (Noro,2001.).

A caseína não é afetada pela pasteurização, permanecendo estável, porém quando há acidificação do leite ocorre a desestruturação das micelas de caseína e formação de coágulos (Brito, et. al., 2020; Fontaneli 2001). Noro (2001), retrata que a caseína, principal proteína presente no leite, é uma fosfoproteína hidrofóbica encontrada no leite na forma de micelas, densos grânulos de proteína, elas são formadas de alfa, beta e kappa caseína.

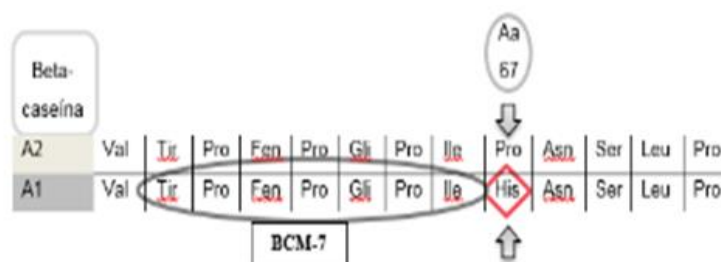
A β -caseína representa de 30 a 45% das caseínas no leite e dentre as 12 variantes genéticas identificadas no leite bovino, que incluem A1, A2, A3, B, C, D, E, F, H1, H2, I e G, decorrentes de mutações pontuais nos genes que codificam a proteína. As mais comuns são as β -caseínas A1 e A2. (Liu, Bin *et al.*,2022).

Os animais leiteiros possuem genótipo expresso como A1A1, A1A2 ou A2A2, com cada cópia do alelo da β -caseína levando à produção do tipo correspondente de β -caseína, podendo ser manifestada em A1 e /ou A2, no qual se origina a denominação leite A1 (será expressa a β -caseína do tipo A1 ou uma mistura de β -caseína A1 e A2, produzidos por vacas A1A2) e leite A2 (no qual será expressa apenas a β -caseína do tipo A2, produzido por vacas A2A2). (Beavers e Doormaal, 2016).

Essas isoformas se diferem por uma substituição de aminoácido na posição 67, Figura 4, da cadeia: prolina (A2) substituída por histidina (A1). Essa alteração estrutural sutil, modifica a susceptibilidade da proteína à hidrólise enzimática,

influenciando a liberação de peptídeos bioativos, como a β -casomorfina-7 (BCM-7), que apresenta potenciais implicações fisiológicas e de saúde pública (Liu Bin *et al.*, 2022; Imafidon; Farkye; Spanier, 1997).

Figura 4- Diferenciação na posição 67 responsáveis pela clivagem diferencial e liberação de BCM-7.



Fonte: Adaptado de; Barbosa, et al., (2019).

Barbosa (2019) relata que o diferencial entre as duas variantes genéticas da β -caseína é a substituição de apenas um aminoácido na posição 67 dos 209 aminoácidos que compõem esta proteína. A β -caseína A1 apresenta um resíduo de histidina, enquanto a β -caseína A2 apresenta um resíduo de prolina.

A mutação do aminoácido prolina para histidina ocasionada na posição 67 presentes na variante A1, produz um peptídeo bioativo betacasomorfina-7 (BCM-7) liberado na digestão enzimática. Enquanto a prolina presente na variante A2 a liberação do BCM-7 é nula ou em pequenas quantidades. (Barbosa, 2019; Liu, Bin *et al.*, 2022).

Liu Bin (2022) faz análises sobre os distúrbios gastrointestinais relacionados a BCM-7 como dor abdominal e alteração da consistência das fezes, diabetes tipo 1, e pode causar distúrbios funcionais da resposta imune, digestão e respiração. Além de que a BCM-7 estar conectada a propensão ao desenvolvimento de alergia à proteína do leite. (Korhonen; Pihlanto, 2006).

Cientistas estimam que, há cerca de oito mil anos atrás as vacas produziam leite exclusivamente A2. No entanto, uma mutação genética nos bovinos fez com que surgissem animais com a capacidade de produzir leite A1. (Embrapa, 2017).

Estudos recentes, analisam variação entre as raças quanto a expressão dos alelos A1 e A2, sendo que raças zebuínas (subespécie indicus) apresentam maior

frequência do alelo A2 e nas raças de origem europeia (subespécie taurus). Porém nas raças Holandesa e Pardo-suíça possuem 50% de chances de produzirem leite A2. Na raça Jersey esse índice é maior: 75%. A exceção da raça Guernsey (subespécie taurus), pouco comum no Brasil, possui 100% de frequência do alelo A2 (Embrapa, 2017; Pacchiarotti *et al.*, 2020).

A determinação do tipo de leite que um animal pode produzir, seja A1 ou A2, pode ser identificada por meio da análise de seu perfil genético, a caracterização genética é feita usando material biológico do próprio animal (como pelos, sangue ou swabs), em vez de utilizar o leite produzido em conformidade com as normas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). (Barbosa,2019).

2.5. MERCADO LEITE A2A2

Tem sido observado nas últimas décadas, o declínio no consumo de leite. Os hábitos alimentares da população têm-se transformado por meio do interesse do consumidor por práticas nutricionais mais saudáveis. Nesse contexto, destaca-se a introdução do leite A2, um produto diferenciado por conter exclusivamente a beta-caseína A2. Esse tipo de leite tem se consolidado em diversos países como um alimento funcional, sendo associado a possíveis benefícios à saúde e representando uma alternativa ao leite convencional para determinados grupos de consumidores. (Bentivoglio *et al.*, 2020).

Pesquisadores desenvolveram recentemente a “hipótese A1/A2”, no qual sugerem que a presença da variante A1 da β -caseína pode representar um potencial fator de risco alimentar associado a doenças cardiovasculares, diabetes tipo 1, síndrome da morte súbita infantil e distúrbios neurológicos, em razão da liberação de β -casomorfina-7 durante a digestão. Em contraste, não há evidências que associem a β -caseína A2 a esses mesmos efeitos adversos. (Mayer *et al.*, 2021).

No ano de 2003, surge a A2 Milk Company Limited, localizada na Nova Zelândia, com o intuito de comercializar leite e seus derivados lácteos isentos da variante A1 da β -caseína, ocorrendo uma revolução no mercado consumidor com uma rápida aceitação do produto neste país, o leite A2 alcançou cerca de 10% de participação no mercado Australiano. (Fernández-Rico *et al.*, 2022).

A viabilidade econômica da produção de leite A2 depende da condição do consumidor em pagar um preço mais alto, devido aos custos adicionais com

separação do leite A2 e A1 e controle mais rigoroso ao longo da cadeia produtiva. Enquanto consumidores italianos demonstraram interesse em pagar cerca de €0,20/litro a mais por esse produto, no Brasil apenas 38% afirmaram estar dispostos a pagar um valor extra. Esses dados indicam um potencial de mercado limitado no país, reforçando a necessidade de estratégias de sensibilização e divulgação científica sobre os possíveis benefícios do leite A2 para aumentar sua aceitação. (Fernández-Rico *et al.*, 2022).

No Brasil, o mercado de leite A2A2 está em expansão, embora de forma mais tímida. Estima-se que o segmento de leite A2 nacional seja de cerca de R\$100 milhões anuais. Empresas como a Piracanjuba têm investido nesse nicho, lançando produtos como o leite A2 de caixinha, produzido por vacas com genótipo A2A2, que oferece uma digestão mais fácil devido à ausência do BCM-7 no processo digestivo. (Piracanjuba, 2022).

Segundo a CNA Brasil (2019), as iniciativas de certificação, como o selo VACAS A2A2 da FairFood, têm sido implementados para garantir a origem e rastreabilidade do leite A2, proporcionando maior confiança ao consumidor e agregando valor à produção leiteira.

Com o aumento da conscientização dos consumidores sobre saúde e bem-estar, o leite A2A2 representa uma oportunidade para produtores e indústrias se diferenciarem no mercado, atendendo a uma demanda crescente por produtos lácteos mais saudáveis e de fácil digestão.

Diante do exposto neste capítulo a crescente demanda por leites diferenciados, como o proveniente de animais genotipados como A2A2, justifica a necessidade de estudos que avaliem sua composição química e nutricional, gerando informações estratégicas para produtores, indústrias lácteas e consumidores. Nesse contexto, este estudo propõe a utilização do método de Kjeldahl para a determinação do nitrogênio total no leite. Ressalta-se que o método quantifica todo o nitrogênio presente na amostra, incluindo frações proteicas e não proteicas, sendo a estimativa de proteína bruta obtida por meio da aplicação de fator de conversão.

2.6 MÉTODO KJELDAHL

Para determinar a conformidade e segurança do leite e seus subprodutos às normativas regulatórias, é essencial a aplicação de métodos analíticos seguros para determinação do teor proteico. Os métodos de determinação de proteínas em alimentos normalmente baseiam-se na determinação de nitrogênio presente na amostra. (Hayes, 2020).

O método Kjeldahl, é referência para determinação de proteína do leite (AOAC International, 2000). O método é baseado na análise de nitrogênio presente na amostra e consiste em três etapas: Digestão, destilação e titulação para quantificação do nitrogênio, normatizado pela ISO 1871:2020. A partir do valor da titulação, a quantidade de proteína é calculada usando um fator de conversão — geralmente 6,25, ou outro fator, de acordo com a amostra que está sendo analisada, descrito na tabela 5, assume que a proteína contém aproximadamente 16% de nitrogênio (Hayes, 2020).

Tabela 5 - Fatores específicos para alguns tipos de amostras utilizados no cálculo de proteína.

AMOSTRA	FATOR
FATOR GERAL	6,25
Gelatina	5,55
Ovos	6,68
Produtos lácteos	6,38
Soja	6,25
Farinha de trigo	5,70
Arroz	5,95
Carnes	6,25

Fonte: Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003.

Em 1883 Johan Kjeldahl desenvolveu o método de Kjeldahl, no qual se tornou um teste de referência para a determinação de nitrogênio total em alimentos. A metodologia baseia-se na digestão da amostra com ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄) associando a catalisadores que auxiliam a conversão nitrogênio orgânico em amônio. Subsequente o amônio é destilado e quantificado por titulação, permitindo a estimativa indireta do teor de proteína. (AOAC, 1984).

É válido ressaltar que, esse método é complexo, demanda um tempo maior e requer instrumentação e agentes químicos específicos, além de que, normalmente usa grandes volumes de amostra e é um procedimento destrutivo.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL:

O objetivo deste trabalho é investigar a composição proteínas nitrogenadas e compostos nitrogenados não proteicos no leite de animais com aptidão leiteira, genotipicamente classificados como A1 ou A2 pela empresa Agronelli.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Aplicar o método de Kjeldahl para a determinação de proteínas nitrogenadas em animais com caracterização genotípica A2 e A1 previamente realizada pela Agronelli;

Avaliar parâmetros complementares: teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e sólidos não gordurosos por espectrometria no infra-vermelho médio e contagem de células somáticas por citometria de fluxo (Laboratório Clínica do Leite).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O pré-experimento foi essencial para testar e padronizar os procedimentos de coleta, conservação e análise das amostras de leite, assegurando a confiabilidade dos métodos antes do experimento principal. Essa etapa permitiu ajustar os detalhes práticos, averiguar a eficiência das análises de nitrogênio total e proteína bruta e certificar-se da estabilidade das amostras. Assim, o pré-experimento foi de suma importância para garantir a qualidade das análises e a reprodutibilidade dos resultados, assegurando que condições estabelecidas fossem adequadas para a avaliação da composição proteica e dos compostos nitrogenados no leite de vacas leiteiras dos genótipos A1A1 e A2A2, de acordo com a proposta deste estudo.

4.1 PRÉ- EXPERIMENTO - PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE KJELDAHL

Foi realizado um estudo em triplicata para padronização da quantidade de leite a serem utilizadas no experimento. Para tal foram utilizados leite comercial de diversos fabricantes caracterizados como A1 e A2. Assim o objetivo foi determinar qual a variação na massa (mg) de leite, que seria a melhor para a determinação da porcentagem de proteínas no leite, submetidas a análise de proteína total pelo método de Kjeldahl.

Para a análise, foram utilizadas amostras de leite tipo A1 e A2, ambas adquiridas comercialmente no varejo. O método de Kjeldahl, foi realizado conforme

as diretrizes descritas da AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Foram testadas duas faixas de massa de amostra: aproximadamente 100 mg e 300 mg, pesadas com precisão analítica e submetidas ao método de Kjeldahl em triplicata.

A escolha desses valores teve como objetivo padronizar o teste para aplicação no experimento principal, desta forma foi possível estimar a porcentagem de proteínas comparando com os valores dispostos nos rótulos dos produtos comerciais, contribuindo para a padronização analítica nas etapas subsequentes.

Os resultados apontaram que, para o leite A1 e A2, não ocorreram variações entre a proteína e as massas analisadas. A média dos valores obtidos para 100 mg foi equivalente à observada para 300 mg. Dessa forma, concluiu-se que a diferença de massa da amostra entre 100 mg e 300 mg não obtiveram interferência nos resultados da determinação de proteína, tabela 6.

Tabela 6- Média dos Resultados da Padronização do Experimento com Amostras de 100 mg e 300 mg de Leite A1A1 e A2A2: Precisão Analítica e Porcentagem de Nitrogênio e Proteínas.

Tipo de Leite	A1A1	A2A2	A1A1	A2A2
	100mg		300mg	
Peso amostra (mg)	117,0 ± 20,7	111,2 ± 9,4	340,7 ± 58,5	343,5 ± 25,5
Titulação (HCL/mL)	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,1	1,4 ± 0,4	1,5 ± 0,4
Normalidade do HCL	0,1	0,1	0,1	0,1
*FC – HCL	1,0351	1,0351	1,0351	1,0351
% de nitrogênio	0,7 ± 0,0	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1
% de proteína	4,2 ± 0,1	4,1 ± 0,8	4,0 ± 0,6	3,9 ± 0,7

*FC – Fator de Correção do HCl (1,0351), utilizado para ajustar a concentração real do titulante. - Os resultados não apresentaram diferenças significativas.

Foram preparadas alíquotas com massa alvo de 100 mg e 300 mg, cujos valores reais variaram conforme apresentado.

Observa-se que, os resultados obtidos entre os grupos, em relação ao número de proteínas identificadas manteve-se constante ou com variação mínima entre as duas quantidades testadas. Além disso, os valores obtidos com 100 mg de amostra mostraram-se compatíveis com os de 300 mg, indicando estabilidade nos resultados independentemente da quantidade utilizada.

Para esta fase do estudo, optou-se por a utilização de 100mg de amostra, pois ela proporcionou resultados consistentes quanto à identificação de proteínas e à precisão analítica, demonstrando reprodutibilidade adequada e compatível com os objetivos do estudo. A escolha desse volume foi baseada na eficiência analítica observada, além de favorecer uma maior praticidade experimental, economia de insumos e melhor aproveitamento das amostras disponíveis.

Dessa forma, a massa de 100 mg foi adotada como padrão para as análises do experimento, assegurando a confiabilidade dos dados obtidos.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Uberaba, processo nº 003/2025.

A etapa do pré-experimental consistiu na seleção e preparação dos animais que forneceriam o material para análise e padronização das etapas de coleta. Foram selecionadas 18 vacas da raça Holandesa, divididas em grupos conforme genótipo da β -caseína (A1A1 ou A2A2). O número de animais foi definido considerando a viabilidade estatística para comparação entre grupos em estudos prévios que empregaram delineamentos semelhantes (Zhang *et al.*, 2020; Soyert *et al.*, 2019). Os animais receberam manejo e alimentação padronizados (Conforme protocolo da empresa Agronelli) e o experimento foi realizado no período chuvoso.

Sendo divididos em dois grupos experimentais, considerando o genótipo do leite (A1A1 ou A2A2), tabela 7.

Tabela 7- Distribuição dos animais nos grupos experimentais

Grupo	Genótipo	Nº de vacas
1	A1A1	9
2	A2A2	9

Fonte: Autores, (2025).

As 18 vacas foram alocadas em dois grupos principais conforme o genótipo (A1A1 ou A2A2). Posteriormente, para análise estatística, os dados foram estratificados por ordem de paridade, permitindo avaliar possíveis interações entre genótipo e estágio reprodutivo.

Essa organização permitiu a realização de comparações tanto entre os genótipos quanto entre as diferentes ordens de paridade, proporcionando uma análise mais precisa dos possíveis efeitos dessas variáveis sobre os resultados.

Foram adotados critérios previamente estabelecidos para a seleção dos animais, incluindo o estágio de lactação, condições de saúde do úbere e resultado do teste da caneca de fundo preto, realizado antes da coleta. O teste consistiu na ordenha dos primeiros jatos de leite em recipiente de fundo escuro, com avaliação visual da presença de grumos, coágulos ou alterações de coloração, indicativos de mastite clínica. Animais que apresentaram alterações visíveis no leite foram excluídos do experimento. Os animais que atenderam a esses critérios foram demarcados com fita nas patas posteriores, e no rabo, em data anterior ao dia da coleta, a fim de facilitar sua identificação no momento do manejo.

Para garantir homogeneidade e confiabilidade dos resultados, foram excluídas da seleção: Vacas em fase de colostro; Vacas com quadro clínico de mastite; Vacas com problemas de casco; Vacas com hiperqueratose em grau elevado; Vacas apresentando qualquer condição clínica que poderia interferir na produção ou composição do leite. Para a realização dos testes previstos nesta dissertação, foi elaborado um cronograma experimental contemplando três coletas de amostras de leite.

Na terceira coleta, foram obtidas três subamostras individuais de cada animal: a primeira (50 mL), coletada nos primeiros 30 segundos da ordenha; a segunda (50 mL), no ponto médio; e a terceira (50 mL), nos últimos 30 segundos. Essas subamostras foram analisadas separadamente para avaliar a heterogeneidade intra-ordenha. As coletas foram realizadas durante a ordenha mecânica de rotina, considerando diferentes grupos genéticos animais A1A1 e A2A2.

As coletas foram realizadas em três etapas, com um intervalo de 35 dias entre a primeira e a segunda, e de 63 dias entre a segunda e a terceira amostragem. Esse intervalo foi estabelecido com base em critérios técnicos e fisiológicos, visando contemplar a variabilidade natural do período de lactação, ao mesmo tempo em que se minimiza a influência de fatores transitórios, como alterações na dieta, manejo e condição sanitária.

Assegurando-se maior reprodutibilidade dos dados e consistência estatística dos resultados obtidos. É válido acrescentar que durante o experimento, algumas coletas de leite não foram realizadas devido a situações pontuais de manejo e saúde.

4.2.1 EXPERIMENTO

A coleta de amostras de leite foi realizada na fazenda localizada na cidade de Uberaba-MG, na BR-050, nos meses de dezembro de 2024, janeiro e fevereiro de 2025.

As amostras foram coletadas na 1^o ordenha do dia, os animais foram submetidos ao teste da caneca de fundo preto desprezando os 3 primeiros jatos para identificar possíveis alterações do leite que possam prejudicar os testes que o leite será submetido. Realizado o *pré-dipping* e secagem dos tetos, para a desinfecção das pontas dos tetos com algodão embebido em álcool 70%. Foram coletadas amostras compostas a partir de todos os tetos das vacas selecionadas.

Os animais foram manejados de forma a minimizar estresse durante o experimento, permanecendo em contenção leve e temporária durante a ordenha.

O leite foi coletado em frascos estéreis, retirando-se jatos de leite de todos os tetos, foram coletados proximadamente 100 mL, 5 mL foram acondicionados para análise pelo método Kjeldahl no IFTM, e 45 mL encaminhados à Clínica do Leite Ltda. Também foram coletadas amostras compostas, formadas pela mistura do leite proveniente de todos os tetos de cada vaca. Ao término da coleta, os animais foram conduzidos calmamente aos respectivos alojamentos para repouso, mantendo-se suas rotinas habituais de manejo.

4.2.1.1 MÉTODOS DE KJELDAHL

Uma segunda alíquota de 5 mL foi levada ao Instituto Federal do Triângulo Mineiro, onde foi realizada a análise pelo método de Kjeldahl.

As análises foram realizadas em amostras de leite provenientes de animais com aptidão leiteira, previamente genotipados como A2A2 pela empresa parceira Agronelli, que tem por prática em seu manejo caracterização genética do rebanho. Dessa forma, permitindo correlacionar os resultados analíticos com o perfil genotípico

dos animais, oferecendo uma base científica para compreender como a variante genética A2A2 influencia a composição proteica do leite.

Para a determinação da porcentagem de nitrogênio total e, conseqüentemente, da porcentagem de proteína bruta das amostras, foi utilizado o equipamento destilador de nitrogênio da Tecnal®, modelo TE-0363.

A princípio, as amostras foram separadas em duplicatas e pesadas 100 mg da amostra no tubo de digestão utilizando para a pesagem uma balança analítica, foi adicionado ao tubo de digestão a mistura catalítica, formada por 600mg de sulfato de potássio (K_2SO_4) e 300mg de sulfato de cobre ($CuSO_4$).

O processo de digestão da amostra foi conduzida em bloco térmico com rampa programada: 100°C por 30 min, 200°C por 30 min, 300°C por 30 min e 400°C até completa clarificação (cor verde-azulada), totalizando até 3 horas. (AOAC, 1990; Instituto Adolfo Lutz, 2008).

Na segunda etapa da metodologia fez-se destilação da amostra. O tubo digestor, foi acoplado ao aparelho de destilação de nitrogênio (Kjeldal) e adicionado 10 mL de solução de ácido bórico no Erlenmeyer e ele foi encaixado no local apropriado para o recebimento do destilado. No reservatório destinado a solução de hidróxido de sódio (NaOH - 50%), foi adicionado 25mL da solução de NaOH. Em seguida abriu-se cuidadosamente a torneira do reservatório, lentamente e foi ligada a chave de aquecimento para alcançar a ebulição, que conduz a amônia para o Erlenmeyer contendo ácido bórico. Coletou-se cerca de 100 mL de condensado no Erlenmeyer (AOAC, 1990; Instituto Adolfo Lutz, 2008).

A última etapa, denominada de titulação foi realizada através do coletado, citado acima, com o auxílio de uma bureta contendo solução de HCL (Ácido clorídrico) 0,1 M. Titulou-se com HCL até o ponto de virada de cor, coletado inicialmente verde se torna lilás. Após, foi realizada a anotação do volume gasto na titulação para realizar o cálculo de teor de Nitrogênio total da amostra e o teor de proteína bruta contida na amostra analisada (AOAC, 1990; Instituto Adolfo Lutz, 2008).

De acordo com a metodologia recomendada pela AOAC (1990), o teor de proteína bruta foi obtido pelo método de Kjeldahl, o qual determina o nitrogênio

presente na amostra. O valor de nitrogênio total é convertido em proteína bruta por meio da multiplicação pelo fator 6,38, específico para produtos lácteos. Esse método baseia-se na conversão do nitrogênio em sulfato de amônio durante a digestão ácida, seguida da liberação de nitrogênio amoniacal por destilação em meio alcalino.

O procedimento de Kjeldahl compreende-se em três etapas principais: digestão, neutralização e destilação, seguidas pela titulação (AOAC, 1990; Instituto Adolfo Lutz, 2008).

$$\text{Equação 1- Nitrogênio} = \frac{V_{\text{HCl}} \times N_{\text{HCl}} \times 14 \times F_{\text{HCl}} \times 100}{\text{Quantidade de amostra (mg)}}$$

Em que: NT = teor de nitrogênio total (%); V_{HCl} = volume gasto de HCl (mL); N_{HCl} = normalidade do HCl, 0,1 N; TAS = teor a.s = 14; F_{HCl} = fator de correção do HCl, 1,147 mol L⁻¹; M_a = massa da amostra (mg).

$$\text{Equação 2- Proteína bruta (\%)} = \text{Nitrogênio total (\%)} \times 6,38$$

Em que: PB = teor de proteína bruta, %; NT (%) teor de nitrogênio total, (%); TAS =14 refere-se ao FC= 6,38 (fator de correção para produtos lácteos), de acordo com a tabela 5.

4.2.1.2 QUALIDADE DA COMPOSIÇÃO DO LEITE

O leite coletado foi dividido em duas alíquotas: 45 (mL) das amostras foi encaminhado ao Laboratório Clínica do Leite Ltda., responsável pelas análises físico-químicas e de composição do leite conforme os parâmetros estabelecidos pelas Instruções Normativas nº 76 e 77 do MAPA.

As amostras enviadas ao laboratório da Clínica do Leite Ltda foram submetidas as análises descritas abaixo:

Tabela 8- Análises e metodologias utilizadas pelo Laboratório Clínica do Leite Ltda.

Análises Solicitadas	Metodologias Utilizadas
Teor de Gordura Teor de Proteína Teor de Lactose Teor de Sólidos Totais Teor de Extrato Seco Desengordurado Ureia	Infra-vermelho - PO ANA 001 : 06
CCS - Contagem de células somáticas	Citometria de Fluxo - PO ANA 001 : 06

Fonte: Autores (2025). Todas as análises físico-químicas foram realizadas por espectroscopia de infravermelho médio, conforme o protocolo oficial PO-ANA-001/06 do MAPA.

Embora o protocolo inicial tenha excluído animais com mastite clínica, um caso subclínico (confirmado por CCS > 500.000 células/mL, mas sem sinais visíveis) foi mantido no grupo A2A2 para explorar a interação entre genótipo e resposta inflamatória. A mastite é uma das enfermidades mais frequentes em vacas leiteiras e pode afetar significativamente a composição do leite, tornando relevante a sua representação no experimento. O animal foi monitorado durante todo o período, e os cuidados necessários foram prestados conforme as normas de bem-estar animal, garantindo que a sua participação no estudo ocorresse sem prejuízo ao seu estado de saúde.

4.3 ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados considerando um delineamento inteiramente casualizado, com o genótipo (A1A1 vs A2A2) como fator fixo. As três coletas foram tratadas como medidas repetidas no tempo. A normalidade dos resíduos foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade de variâncias, pelo teste de Levene.

Utilizou-se ANOVA de medidas repetidas para comparar os grupos, seguida pelo teste post hoc de Tukey ($\alpha = 0,05$). Correlações entre variáveis contínuas foram avaliadas pelo coeficiente de Pearson, conforme proposto por Zafalon et al (2005).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises realizadas pela Clínica do Leite possibilitaram caracterizar a composição das amostras quanto aos teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais, extrato seco desengordurado e ureia. Esses fatores refletem tanto o estado nutricional quanto o desempenho produtivo das vacas, além de influenciarem a qualidade tecnológica do leite. De forma geral, os valores observados indicam condições produtivas contínuas do rebanho ao longo do período de coleta.

Após essa caracterização inicial da composição, torna-se importante avaliar também aspectos relacionados à saúde da glândula mamária, uma vez que podem alterar significativamente a qualidade do leite. Nesse sentido, destaca-se a Contagem de Células Somáticas (CCS).

A CCS é um importante indicador da saúde da glândula mamária e da qualidade do leite, sendo utilizada como parâmetro indireto para detecção de processos inflamatórios, como a mastite subclínica ou clínica.

Dentre os animais avaliados, a saúde mamária foi investigada por meio da contagem de células somáticas (CCS) do leite, conforme os parâmetros físico-químicos estabelecidos na Instrução Normativa nº 76. Animais com CCS inferior a 200.000 células/mL foram considerados saudáveis; valores entre 200.000 e 500.000 células/mL indicaram mastite subclínica; e contagens superiores a 500.000 células/mL caracterizaram mastite clínica. Essa abordagem permitiu a classificação precisa do estado sanitário das glândulas mamárias, identificando tanto casos clínicos quanto subclínicos, tabela 9.

Tabela 9– Animais submetidos ao teste de CCS (N=18).

Animal/Genótipo	*CCS (células/mL × 10 ³)	
	1 ^o coleta	2 ^a coleta
1/A1A1	56	67
2/A1A1	10	13
3/A1A1	42	26
4/A1A1	18	
5/A1A1	134	152
6/A1A1	14	18
7/A1A1	166	50
8/A1A1	14	
9/A1A1	96	149
10/ A2A2	134	13
11/A2A2	245	117
12/A2A2	34	36
13/A2A2	158	18
14/A2A2	48	45
15/A2A2	8	
16/A2A2	202	435
17/A2A2	570	48
18/A2A2	23	21

*CCS: Contagem de Células Somáticas. *Os valores correspondem às médias obtidas por animal em cada coleta. Espaços em branco indicam animais ausentes no dia da segunda coleta.

A tabela 9 apresenta os valores individuais da contagem de células somáticas (CCS) obtidos nas duas coletas realizadas durante o experimento. Em geral, a maioria dos animais apresentou valores de CCS dentro dos limites considerados fisiológicos para vacas sadias (<200 × 10³ células/mL), tanto na primeira quanto na segunda coleta.

Os valores de CCS quando comparados aos genótipos não indicaram um padrão. Observou-se que tanto vacas A1A1 quanto A2A2 apresentaram resultados dentro da faixa considerada normal (<200 × 10³ cél./mL), assim como alguns indivíduos de ambos os genótipos apresentaram valores acima de 200 × 10³ cél./mL, sugerindo quadro de inflamação mamária subclínica. Dessa forma, neste estudo os resultados indicam que a variação da CCS está mais relacionada às características individuais dos animais e a fatores de manejo e condição da glândula mamária, do que ao genótipo da β-caseína propriamente dito.

Contudo, os animais identificados como número 11, 16 e 17, apresentaram elevações expressivas na CCS, indicando possível resposta inflamatória da glândula mamária.

Entre as duas coletas, nota-se variação individual na CCS, sem uma tendência consistente de aumento ou redução, o que sugere estabilidade geral da saúde mamária do rebanho durante o período experimental. Essas variações podem ser atribuídas a fatores fisiológicos normais, como estágio de lactação, momento da ordenha, ou mesmo resposta imune transitória.

Os valores predominantemente baixos de CCS reforça que os resultados obtidos nas análises físico-químicas e proteicas do leite não foram influenciados de forma significativa por infecções intramamárias, garantindo a confiabilidade dos dados utilizados para comparação entre os genótipos e ordens de lactação.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Os resultados apresentados na tabela 10 referem-se às análises físico-químicas realizadas nas amostras de leite coletadas durante o experimento efetuadas pelo Laboratório da Clínica do Leite Ltda. A tabela apresenta as médias e desvios-padrão obtidos a partir dos laudos laboratoriais, referentes às duas coletas experimentais, com destaque para os parâmetros de teor de gordura, proteína, lactose, sólidos totais, extrato seco desengordurado, nitrogênio ureico do leite (NU) e ácidos graxos sintetizados na glândula mamária e pré-formado.

Tabela 10- Parâmetros físico-químicos médios do leite bovino em duas coletas experimentais.

Variável	Unidade	Coleta 1 (Média ± DP)		Coleta 2 (Média ± DP)	
		A1A1	A2A2	A1A1	A2A2
Gordura (GOR)	g/100g	1,65 ± 0,69	1,79 ± 1,08	1,60 ± 0,69	2,02 ± 0,58
Proteína (PROT)	g/100g	3,42 ± 0,37	3,07 ± 0,27	3,13 ± 0,47	2,85 ± 0,23
Lactose (LACT)	g/100g	4,75 ± 0,40	4,82 ± 0,22	4,73 ± 0,32	4,82 ± 0,17
Sólidos Totais (ST)	g/100g	10,83 ± 0,69	10,68 ± 1,27	10,37 ± 0,90	10,55 ± 0,70
Extrato Seco Desengordurado (ESD)	g/100g	9,19 ± 0,48	8,89 ± 0,33	8,78 ± 0,60	8,53 ± 0,34
Nitrogênio Ureico (NU)	mg/dL	6,15 ± 2,58	6,92 ± 2,46	6,90 ± 1,55	9,19 ± 0,71
Ácidos graxos sintetizados na glândula mamária	g/100g	0,28 ± 0,14	0,31 ± 0,22	0,26 ± 0,13	0,36 ± 0,12
Ácidos Graxos Pré-formados (PREF)	g/100g	0,53 ± 0,28	0,62 ± 0,47	0,60 ± 0,36	0,76 ± 0,31
Beta-hidroxiubutirato (BHB)	mmol/L	0,10 ± 0,03	0,12 ± 0,03	0,60 ± 0,36	0,11 ± 0,01

Fonte: Autores, (2025).

Ao comparar os dados da tabela 10, quanto aos genótipos, não foram observadas diferenças estatísticas na maioria dos parâmetros físico-químicos avaliados, incluindo proteína total, lactose, sólidos totais e extrato seco desengordurado, em ambas as coletas experimentais, o que indica que o genótipo da β -caseína, por si só, não influenciou a composição total do leite no presente estudo.

Esses achados contrastam parcialmente com os resultados de Wang et al. (2020), que, ao analisarem a caracterização proteômica do leite segundo os genótipos da β -caseína, observaram que vacas A2A2 apresentaram maior produção de leite (kg/dia), maior teor de gordura e maior CCS, enquanto o genótipo A1A1 apresentou maior teor de proteína.

No entanto, no nosso experimento, as diferenças entre os genótipos foram sutis e não significativas, sugerindo que, sob as condições de manejo, alimentação e fase de lactação avaliadas, a composição do leite mostrou-se mais influenciada por fatores individuais e ambientais do que pelo genótipo da β -caseína.

A tabela 11 apresenta os resultados obtidos na análise de proteína bruta (%) das amostras de leite bovino, realizadas conforme a metodologia recomendada pela AOAC (1990), utilizando o método de Kjeldahl. As amostras foram separadas em duplicata e identificadas por “/1” e “/2” após o número de identificação do animal, durante o experimento, para assegurar a reprodutibilidade dos resultados e reduzir a variabilidade analítica.

Tabela 11- Pesagem para determinação de porcentagem de Proteína Bruta.

Grupo experimental	Genótipo	Faixa de volume gasto de HCl (mL)	Faixa de massa da amostra (mg)
Grupo 1	A1A1	0,40 – 0,70	102,2 – 134,2
Grupo 2	A2A2	0,40 – 0,45	103,1 – 124,7

Fonte: Autores, (2025).

O peso médio das amostras analisadas, no laboratório do IFTM, apresentou variação entre aproximadamente 102,2 e 134,2 mg para o grupo A1A1 e entre 103,1 e 124,7 mg para o grupo A2A2. Da mesma forma, o volume de ácido clorídrico (HCl 0,02 N) empregado na titulação situou-se entre 0,40 e 0,70 mL para as amostras A1A1 e entre 0,40 e 0,45 mL para o grupo A2A2. Essas variações são consideradas compatíveis com a natureza biológica do leite e refletem condições adequadas de pesagem e padronização analítica, indicando que a condução das etapas de preparo e titulação ocorreu de maneira controlada e reprodutível para ambos os genótipos.

Observa-se que as amostras pertencentes ao genótipo A2A2 apresentaram volumes de titulação ligeiramente menores em comparação ao grupo A1A1. Como o volume de titulante utilizado na metodologia de Kjeldahl é proporcional à quantidade de nitrogênio presente na amostra, tal resultado sugere menor teor de nitrogênio total no leite A2A2, o que pode estar relacionado a diferenças nas frações proteicas influenciadas pelo genótipo da β -caseína (Hueso et al., 2022; Ivanković et al., 2020).

Esse comportamento está de acordo com observações de Imafidon et al. (1997) descreve variações sutis na composição nitrogenada do leite entre diferentes

genótipos, atribuídas à conformação estrutural das cadeias β -caseínicas, mas sem impacto expressivo na fração total de proteína.

Deve-se considerar também que parte do nitrogênio presente no leite não corresponde a proteína verdadeira, podendo variar entre grupos genéticos (Ruska & Jonkus, 2014).

5.3 % DE NITROGÊNIO E PROTEÍNA BRUTA

Os resultados representados na tabela 12, representam a etapa inicial da quantificação do teor de proteína bruta, uma vez que o método de Kjeldahl baseia-se na determinação do nitrogênio total presente na amostra, posteriormente convertido em porcentagem de proteína por meio de um fator de multiplicação. Assim, as informações apresentadas nesta tabela constituem a base para as análises comparativas entre os grupos experimentais, permitindo avaliar o efeito do genótipo da β -caseína sobre o teor proteico do leite.

Tabela 12- Quantificação da média do Teor de Nitrogênio Total e Proteínas Bruta nas Amostras de leite A1 e A2 por meio do método de Kjeldahl, durante a 1° e 2° coleta.

Genótipo	Momento de coleta	Nº	% Nitrogênio (média \pm DP)	% Proteína Bruta (média \pm DP)
A1A1	1º	9	0,63 \pm 0,10	3,94 \pm 0,63
A2A2	1º	9	0,56 \pm 0,22	3,69 \pm 1,05
A1A1	2º	7	0,52 \pm 0,11	3,33 \pm 0,73
A2A2	2º	8	0,53 \pm 0,10	3,35 \pm 0,74

Fonte: Autores, (2025).

Em ambas as coletas é possível visualizar, os valores médios com variações discretas entre os genótipos, sem diferenças expressivas.

De modo geral, o leite A1A1 apresentou médias ligeiramente superiores na primeira coleta (0,63 \pm 0,10 % de nitrogênio e 3,94 \pm 0,63 % de proteína), enquanto na segunda coleta os valores tenderam à redução, comportamento semelhante ao observado no grupo A2A2.

Os resultados encontrados demonstram que as médias de nitrogênio total e proteína bruta permaneceram semelhantes entre os genótipos A1A1 e A2A2 nas duas coletas, sugerindo que o polimorfismo da β -caseína não influenciou significativamente o teor proteico global do leite. As variações tênues visualizadas podem ser atribuídas a fatores fisiológicos, nutricionais e produtivos, como estágio de lactação e metabolismo do nitrogênio, que influenciam diretamente a composição do leite.

É válido ressaltar que a metodologia de Kjeldahl, utilizada neste estudo, quantifica o nitrogênio total presente no leite, abrangendo tanto a fração proteica como caseínas e proteínas do soro, quanto o nitrogênio não-proteico (ureia, aminoácidos livres e pequenas cadeias peptídicas).

De acordo com Ruska e Jonkus (2014), o nitrogênio total do leite é composto tanto pela fração proteica verdadeira (caseínas e proteínas do soro) quanto pelo nitrogênio não proteico (NNP), formado por ureia, aminoácidos livres e peptídeos de baixo peso molecular. Assim, variações no conteúdo de nitrogênio podem refletir ajustes metabólicos entre essas frações, e não necessariamente aumento de proteína funcional. Considerando essa perspectiva proteômica, os valores observados neste estudo (0,52 %–0,63 % de N e 3,33 %–3,94 % de proteína bruta) indicam equilíbrio entre as frações nitrogenadas, coerente com o padrão descrito na literatura para leite bovino sob condições fisiológicas normais. Elucidado também por Imafidon (1992), a interpretação dos resultados de nitrogênio total requer cautela, visto que o valor final inclui compostos nitrogenados não-proteicos que não correspondem à proteína verdadeira.

Resultados semelhantes foram relatados por Di Marzo *et al.* (2021), ao comparar o teor de nitrogênio total em amostras de leite com diferentes genótipos, não encontrando diferenças significativas entre grupos. Esses autores reforçam que a variação no nitrogênio total é mais influenciada por aspectos metabólicos e alimentares do que por características genéticas isoladas.

Dessa forma, os resultados obtidos neste estudo indicam que o efeito genético entre os genótipos A1A1 e A2A2 sobre o teor de nitrogênio total é mínimo, e que o comportamento observado reflete principalmente as condições fisiológicas e de manejo durante o período experimental.

Conforme descrito na tabela 13 a terceira coleta, foi realizada as amostras de leite foram obtidas em três diferentes momentos da ordenha (início, meio final), com o objetivo de verificar possíveis variações na composição, especialmente nos teores de nitrogênio total e proteína bruta.

Tabela 13- *Quantificação da média do Teor de Nitrogênio Total e Proteínas Bruta nas Amostras de leite A1 e A2 por meio do método de Kjeldahl, durante a 3ª coleta, realizada em momentos distintos de uma mesma ordenha.*

Variável	Média	Desvio-padrão
Peso da amostra (mg)	118,93	13,96
Volume gasto de HCl (mL)	0,475	0,057
% de Nitrogênio	0,580	0,048
% de Proteína	3,697	0,322

Fonte: Autores, (2025).

Essa estratégia decorreu da condução do estudo em rebanho comercial, no qual a disponibilidade de animais poderia variar ao longo do tempo. A opção por concentrar as coletas em três períodos visou assegurar a padronização dos grupos experimentais conforme genótipo e ordem de lactação, garantindo a comparabilidade entre os dados. Embora o número reduzido de coletas tenha constituído uma limitação, os resultados obtidos permitiram análises consistentes e contribuíram para a compreensão da relação entre o teor de nitrogênio total e os parâmetros de qualidade do leite.

Os resultados expõem que o teor de nitrogênio total e de proteína bruta permaneceu estável, mesmo com a amostragem em diferentes momentos da ordenha. Essa constância sugere uma homogeneidade da secreção láctea ao longo da ordenha, o que reforça o equilíbrio fisiológico das vacas durante o período experimental.

Segundo Ruska e Jonkus (2014), a proporção entre proteínas verdadeiras e nitrogênio não proteico (NPN) pode variar conforme o metabolismo e o manejo nutricional, refletindo o uso eficiente do nitrogênio ingerido. Assim, a ausência de flutuações expressivas entre os momentos de coleta demonstra estabilidade metabólica e adequada regulação das vias de síntese proteica, sem indicativos de acúmulo de NNP ou de alterações relacionadas à dinâmica da β -caseína. Em conjunto, esses resultados reforçam que a composição nitrogenada do leite permaneceu consistente, refletindo tanto boas condições de manejo quanto uma produção equilibrada do ponto de vista fisiológico.

5.4 ANÁLISE DE VARIÁVEIS

A partir do teste anova, verificou-se que não houve diferença significativa para a maioria das variáveis analisadas entre os genótipos, tabela 14, indicando desempenho semelhante para gorduras, proteína total, lactose e sólidos totais.

Apesar da ausência de diferenças significativas na composição centesimal do leite (proteína, gordura, lactose e sólidos totais), o genótipo A2A2 destacou-se por apresentar maiores concentrações de nitrogênio ureico (NU) e ácidos graxos de novo (AGdn). Essas diferenças sugerem possíveis particularidades metabólicas entre os genótipos, especialmente relacionadas ao metabolismo de nitrogênio e à síntese lipídica na glândula mamária, que podem ser influenciadas por fatores genéticos e fisiológicos.

Tabela 14- Médias, erro padrão e significância da ANOVA para variáveis do leite segundo os grupos genéticos A1A1 e A2A2.

Variável	A1A1 Média ± EP	A2A2 Média ± EP	p-valor
Peso amostra	112,3 ± 3,20	117,3 ± 2,56	0,2341
% de nitrogênio	0,58 ± 0,04	0,56 ± 0,03	0,6200
% de proteína	3,71 ± 0,23	3,57 ± 0,18	0,6200
Teor de Gordura (g/100g)	1,84 ± 0,43	2,84 ± 0,34	0,0763
Teor de Proteína (g/100g)	3,16 ± 0,09	3,05 ± 0,07	0,3498
Teor de Lactose (g/100g)	4,68 ± 0,07	4,71 ± 0,05	0,6769
Teor de Sólidos Totais (g/100g)	10,63 ± 0,44	11,53 ± 0,34	0,1149
Teor de Extrato Seco Desengordurado (g/100g)	8,79 ± 0,13	8,69 ± 0,10	0,5482
Nitrogênio ureico do leite (mg/dL)	7,79 ± 1,51	12,76 ± 1,18	0,0128
Ácidos graxos sintetizados na glândula mamária (g/100g de leite)	0,29 ± 0,11	0,58 ± 0,08	0,0345
Ácidos graxos pré formados (g/100g de leite)	0,69 ± 0,15	0,94 ± 0,11	0,1890
Beta-hidroxibutirato (mmol/L)	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,3502

Fonte: Autores, (2025).

Em relação ao Nitrogênio Total, observou-se diferença entre os genótipos: o grupo A2A2 apresentou valores ligeiramente mais elevados em comparação ao A1A1, o que reforça a contribuição desse genótipo para um perfil proteico potencialmente mais favorável.

Estudos como o de Hristov *et al.*, 2019 demonstram que o teor de nitrogênio total no leite bovino tende a apresentar baixa variabilidade individual quando os animais estão sob condições controladas de alimentação e manejo, sendo mais sensível a fatores ambientais e nutricionais do que a variações genéticas. Além disso,

o método de Kjeldahl quantifica o nitrogênio total presente nas proteínas e compostos nitrogenados não proteicos, o que reforça a consistência dos resultados obtidos (Imafidon *et al.*, 1997).

Dessa forma o teor de nitrogênio total no leite, determinado pelo método de Kjeldahl, representa a soma do nitrogênio proteico (NP) e do nitrogênio não proteico (NNP), permitindo uma avaliação abrangente de todos os compostos nitrogenados presentes no leite. O teor de nitrogênio total reflete não apenas a fração proteica verdadeira, mas também compostos nitrogenados não proteicos, que influenciam a qualidade nutricional e tecnológica do leite.

No contexto do estudo de genótipos, as diferenças entre vacas A1A1 e A2A2 refletiram principalmente variações na fração de β -caseína, mas o nitrogênio total do leite foi determinado pela soma de todas as frações nitrogenadas. Assim, quaisquer alterações observadas no teor de nitrogênio total puderam resultar não apenas de mudanças na caseína β , mas também de variações nas demais frações proteicas e nos compostos nitrogenados não proteicos.

Dessa maneira, ainda que o foco esteja na diferença estrutural entre as variantes de β -caseína, a avaliação prática da composição do leite deve considerar o comportamento da proteína total, observando como esses perfis se manifestam em condições reais de produção.

Ivankovic *et al.* (2020), observaram valores médios de proteína de 3,37% e de gordura de 4,12% em vacas portadoras do mesmo genótipo. Embora nossos dados individuais tenham mostrado certa variação, a média dos valores de proteína se mantém dentro da faixa descrita por Ivankovic *et al.*, indicando consistência nos efeitos do polimorfismo A1/A2 sobre a composição do leite em diferentes populações de vacas.

Embora os valores médios de proteína tenham permanecido dentro das faixas esperadas e em consonância com estudos prévios, é importante considerar indicadores complementares capazes de refletir o aproveitamento metabólico do nitrogênio no organismo animal. Nesse contexto, destaca-se o nitrogênio ureico (NU), cuja variação está relacionada ao equilíbrio entre proteína dietética e energia disponível para o metabolismo microbiano no rúmen (Jonker *et al.*, 1999).

Os valores elevados podem representar diferenças quanto a eficiência de utilização do nitrogênio ou maior excreção de compostos nitrogenados não aproveitados. Tal resultado evoca que o genótipo A2A2 pode estar associado a um metabolismo do nitrogênio menos eficiente, resultando em maiores concentrações de ureia no leite.

Esse padrão encontra respaldo em trabalhos como o de de Vitte *et al.* (2022), que demonstraram que genótipos diferentes de β -caseína não apenas alteram a composição de aminoácidos, mas também modificam o perfil de ácidos graxos do leite.

De acordo com DePeters & Ferguson (1992), aproximadamente 5 a 6% do nitrogênio total do leite bovino encontra-se na forma de NNP, composto por ureia, aminoácidos livres, peptídeos e outros derivados nitrogenados. Esse percentual, embora pequeno, é altamente variável e reflete o metabolismo ruminal, a dieta e o balanço de nitrogênio e energia ingeridos. Nesse contexto, os níveis mais elevados de NU em vacas A2A2 podem indicar diferenças no aproveitamento do nitrogênio dietético ou maior excreção via ureia, possivelmente relacionadas a um perfil metabólico distinto entre os genótipos.

Os níveis mais elevados de nitrogênio ureico no leite do grupo A2A2 podem refletir uma menor eficiência na utilização do nitrogênio dietético, com consequente maior excreção de ureia. Surpreendentemente, esse padrão correlacionou-se positivamente com a síntese de ácidos graxos de novo, sugerindo que, apesar de uma possível ineficiência nitrogenada, o metabolismo energético esteve ativo e sincronizado com a lipogênese mamária.

Ao comparar nossos resultados com os de Vitte *et al.* (2022), observamos divergências importantes. Enquanto os autores relataram diferenças significativas nos teores de proteína e gordura entre os genótipos β -caseína A1 e A2, especialmente maior teor de ácidos graxos poliinsaturados e menor gordura no leite A2A2.

Em estudo recente, Miluchová *et al.* (2023) relataram que o polimorfismo do gene CSN2 exerce efeito significativo sobre a composição do leite em vacas Holstein, observando maior rendimento proteico associado ao alelo A2 e aumento no percentual de gordura no genótipo A1A1. No entanto, os resultados do presente estudo não confirmaram essas diferenças entre os grupos A1 e A2.

Essa divergência pode estar relacionada ao manejo homogêneo dos animais, mantidos sob as mesmas condições de alimentação e ambiente, bem como à ausência de análises específicas das isoformas da β -caseína, fatores que possivelmente contribuíram para a semelhança entre os parâmetros avaliados.

Quanto a estes parâmetros de produção e composição do leite (teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais) os achados desse estudo, corroboram trabalhos anteriores que também não observaram impacto direto do genótipo β -caseína sobre a composição centesimal do leite (Hueso *et al.*, 2022; Ng-Kwai-Hang *et al.*, 2002).

Este estudo encontrou valores numericamente superiores no teor de gordura no leite A2A2. Embora não significativos, esses resultados podem indicar uma predisposição do leite A2A2 a maior teor lipídico, mas também a maior variabilidade na saúde da glândula mamária.

O que corrobora com os resultados encontrados por Albarella *et al.* (2020), em sua investigação sobre efeito de genótipos compostos de caseína (CSN1S1, CSN2 e CSN3) na qualidade e características de coagulação do leite correspondente, ela constatou que leite de vacas com o genótipo A2A2 apresentou maiores teores de proteína e sólidos totais quando comparados ao A1A1. Estudos complementares, com maior número de animais e maior controle de variáveis ambientais, poderiam confirmar essas tendências.

Os resultados deste estudo sugerem que, embora a composição básica do leite não seja alterada pelo genótipo da β -caseína, o alelo A2 pode estar relacionado a maiores concentrações de ureia e a diferenças no metabolismo lipídico. Essas observações são relevantes, pois ampliam o entendimento não apenas sobre a qualidade nutricional do leite, mas também sobre a fisiologia animal associada aos diferentes genótipos.

As análises reforçam a necessidade de avaliar os efeitos do genótipo A2A2 no metabolismo nitrogenado e lipídico do leite. O grupo A2A2 apresentou maior variabilidade e valores médios aumentados em componentes que influenciam a qualidade e composição do leite.

Os valores de ácidos graxos, de novo, sintetizados, indicam uma maior atividade da síntese lipídica de cadeia curta e média na glândula mamária. Essa característica é pertinente para a qualidade do leite, pois ácidos graxos podem

influenciar sobre a firmeza da gordura láctea e suas propriedades tecnológicas (Bauman & Griinari, 2003).

Os ácidos graxos sintetizados na glândula mamária originam os precursores como acetato e β -hidroxibutirato (BHBA), decorrentes da fermentação ruminal de carboidratos. Esses compostos são absorvidos e utilizado como substrato para a síntese de ácidos graxos de cadeia curta e média (C4 a C16), por meio da ação das enzimas acetil-CoA carboxilase (ACACA) (Chilliard *et al.*, 2000).

Alterações na produção desses precursores ou na atividade das enzimas podem modificar a proporção de AG de novo no leite. Quando há disponibilidade de acetato no rúmen, em grande quantidade tem-se o aumento de lipogênese mamária, aumentando a síntese de gordura do leite. Mas em situações em que o balanço energético está negativo ou tem o aumento do BHBA sanguíneo, comum em vacas no início da lactação, há a probabilidade de alterar a utilização desses substratos, resultando em variações na composição lipídica do leite (ZHANG *et al.*, 2021).

Tais alterações podem estar associadas a variações na produção ruminal de acetato e BHBA, que refletem o equilíbrio energético e a eficiência fermentativa do rúmen. De acordo com Bauman e Griinari (2003), mudanças na fermentação ruminal ou na absorção de ácidos graxos voláteis impactam diretamente a lipogênese mamária e a proporção de AG de novo no leite.

De Vitte *et al.* (2022) demonstrou em seu estudo que o teor de aminoácidos, ácidos graxos e cor, influenciam-se pelos genótipos do gene CSN2 da β -CN, conjecturando que o genótipo A2A2 pode estar ligado ao teor de ácidos graxos nas gorduras do leite, dessa forma o melhoramento seletivo dos genótipos com qualidades preferidas pode melhorar o leite e derivados.

Com o intuito de compreender as relações entre os principais componentes físico-químicos e metabólicos do leite, foi aplicado o teste de correlação de Pearson. Esse método permite avaliar a intensidade e a direção da associação linear entre variáveis contínuas, possibilitando identificar como os diferentes parâmetros interagem no contexto fisiológico e produtivo dos animais.

Tabela 15- Principais correlações entre variáveis metabólicas, lipídicas e proteicas do leite.

Variáveis correlacionadas	Coefficiente de correlação (r)	Significância
GOR x ST	> 0,85	p < 0,001
GOR x PREF	> 0,85	p < 0,001
GOR x DE NOVO	> 0,85	p < 0,001
ST x PREF	> 0,85	p < 0,001
ST x DE NOVO	> 0,85	p < 0,001
PREF x DE NOVO	> 0,85	p < 0,001
NU x GOR	0,72	p < 0,001
NU x DE NOVO	0,73	p < 0,001
LACT x variáveis lipídicas	r < 0	p < 0,05
LACT x variáveis proteicas	r < 0	p < 0,05
BHB* x PROT	r < 0	p < 0,05
BHB* x ESD	r < 0	p < 0,05

Fonte: Autores, (2025).

A análise das correlações lineares é essencial neste estudo, pois permite verificar se determinados indicadores apresentam comportamento integrado, refletindo vias metabólicas comuns ou mecanismos fisiológicos interdependentes.

Nesse contexto, observou-se que são altamente correlacionados. Nesse sentido, as altas correlações observadas entre gordura, sólidos totais, ácidos graxos pré-formados e ácidos graxos sintetizados de novo ($r > 0,85$; $p < 0,001$) evidenciam a formação de um bloco metabólico coeso, no qual essas variáveis variam de forma integrada. LACT correlaciona-se negativamente com várias variáveis lipídicas e proteicas. Esse comportamento indica que a lactose apresenta associação inversa a

esse bloco metabólico lipídico. BHB apresenta correlações negativas significativas com PROT e ESD.

È importante abordar que neste estudo a dieta mantida entre os grupos era igual, o que remove as implicações da alimentação como fator de variação nos resultados, as diferenças observadas refletem ajustes fisiológicos e metabólicos próprios de cada genótipo.

Mesmo com dieta uniforme, Vanholder *et al.*, (2006) destacam que vacas em lactação podem apresentar respostas metabólicas diferentes, principalmente no início da lactação, período em que há maior demanda de energia e nutrientes para sustentar a produção de leite.

Esse equilíbrio entre oferta e utilização de nutrientes está relacionado ao que Drackley *et al.*, (2001) descrevem como regulação metabólica integrada, um mecanismo que coordena as vias de síntese e secreção do leite por meio da interação entre metabolismo energético, lipídico e proteico. Nesse sentido, as fortes correlações positivas observadas entre GOR, ST, PREF e DE NOVO ($r > 0,85$; $p < 0,001$) evidenciam a sincronia entre a síntese de gordura e o metabolismo energético, enquanto as associações significativas entre NU e variáveis lipídicas ($r = 0,72-0,73$) indicam uma interdependência entre o metabolismo do nitrogênio e a lipogênese mamária.

De acordo com que foi demonstrado nos resultados, o teor de nitrogênio ureico (NU) foi significativamente maior nas vacas A2A2. O teor de nitrogênio ureico (NU) mostrou correlação elevada tanto com o teor de gordura ($r = 0,72$) quanto com a síntese de novo ($r = 0,73$), o que evidencia uma relação estreita entre o metabolismo do nitrogênio e a disponibilidade de precursores para a síntese lipídica na glândula mamária.

Além disso, com o apuramento dos dados foi possível notar que o NU se relaciona fortemente com a gordura e a síntese de ácidos graxos, sugerindo que proteínas e lipídios estão metabolicamente conectados, reforçando-se através de um bloco de correlações fortes e consistentes entre gordura, teor de Sólidos totais, ácidos graxos pré-formados e ácidos graxos de novo, todas positivas e altamente significativas ($r > 0,85$; $p < 0,001$). Esse agrupamento sugere que essas variáveis caminham juntas, reforçando a ideia de que o metabolismo lipídico e proteico do leite está intimamente associado.

Os valores de ácidos graxos, de novo, sintetizados, indicam uma maior atividade da síntese lipídica de cadeia curta e média na glândula mamária. Essa característica é relevante para a qualidade do leite, pois ácidos graxos podem influenciar sobre a firmeza da gordura láctea e suas propriedades tecnológicas (Bauman & Griinari, 2003).

De Vitte *et al.* (2022) demonstrou em seu estudo que o teor de aminoácidos, ácidos graxos e cor, influenciam-se pelos genótipos do gene CSN2 da β -CN, conjecturando que o genótipo A2A2 pode estar ligado ao teor de ácidos graxos nas gorduras do leite, dessa forma o melhoramento seletivo dos genótipos com qualidades preferidas pode melhorar o leite e derivados.

A correlação negativa da lactose com variáveis lipídicas/proteicas é compatível com o balanço composicional do leite, e as associações negativas do BHB com PROT e ESD refletem o papel do BHB como marcador de mobilização energética. Em conjunto, os achados sustentam a visão de que, sob dieta uniforme, as diferenças entre animais/genótipos emergem de ajustes finos na partição e no uso de precursores mais do que de efeitos alimentares (Drackley *et al.*, 2001).

Os testes em que as amostras foram submetidas nesse experimento pode ser sugestivo para a ausência de diferenças significativas entre os o leite A1 e A2, os testes visavam o estudo físico-químico das amostras e não a diferenciação direta nas isoformas da β -caseína presentes nas amostras. Apesar de, os animais terem sido reunidos de acordo com o seu genótipo neste estudo, não foram utilizados métodos detalhados para reconhecer ou quantificar isoformas proteicas do leite como a focalização isoelétrica (IEF) ou a PCR específica para o gene CSN2. Estudos como o de H.K. (Mayer *et al.*, 2021) demonstram a importância dessas metodologias para a caracterização do leite A2 e A1. Deste modo a ausência de investigação quanto as isoformas pode contribuir para os resultados homogêneos observados.

Neste estudo é demonstrado que não há diferenças significativas quando comparados o leite das vacas com aptidão de produção A1 e A2. Em um estudo publicado na Journal of Dairy Science (F-ang, Z.H. *et al.*, 2017), é demonstrado que fatores não genéticos como o exemplo da dieta, ambiente e estágio da lactação intervêm diretamente na composição do leite. Comprovando que, o agrupamento de lotes genéticos A1 e A2 quando em submetidos a conjuntura equivalentes como manejo e nutrição é crível que as variações sobre o genótipo sejam minimizadas o

que corrobora com os resultados encontrados neste trabalho. Os bovinos na fazenda em que foi realizado o experimento foram submetidos a condições de alimentação, ambiente e manejo idênticas, não havendo a separação por genótipo. Apesar de a padronização dos lotes seja eficaz para controle experimental, neste estudo pode ter contribuído para a semelhança nos parâmetros composicionais do leite.

Este estudo reforça que, sob condições de manejo e nutrição homogêneas, o polimorfismo A1/A2 da β -caseína tem impacto limitado na composição centesimal do leite, mas pode modular aspectos do metabolismo nitrogenado e lipídico. Esses achados sugerem que os efeitos do genótipo A2A2 vão além da estrutura proteica, influenciando vias metabólicas integradas uma perspectiva relevante para futuras pesquisas em nutrição funcional e bem-estar animal.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados corrigidos reforçam a diferença entre A1A1 e A2A2 para variáveis como NU e DE NOVO. Enquanto a tendência de diferença em CCS e GOR sugere impacto do genótipo na qualidade do leite. A análise multivariada ACP mostrou que a variabilidade foi explicada principalmente por um único componente, com carga homogênea das variáveis, indicando forte associação entre os fatores analisados.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo atingiu o objetivo proposto de testar a aplicação do método de Kjeldahl para determinação do teor de nitrogênio total em amostras de leite bovino provenientes de vacas genotipadas como A1A1 e A2A2. O método revelou-se eficiente e suscetível para quantificar as frações nitrogenadas, englobando tanto as proteínas verdadeiras quanto os compostos nitrogenados não proteicos, proporcionando um panorama amplo da composição proteica do leite.

Os achados deste trabalho fornecem subsídios relevantes para futuras investigações proteômicas que considerem a caracterização específica das isoformas da β -caseína e sua relação com o metabolismo de compostos nitrogenados, contribuindo para o avanço do conhecimento sobre a qualidade do leite bovino.

8 REFERÊNCIAS

- ALBARELLA, S. et al. Influence of the casein composite genotype on milk quality and coagulation properties in the endangered Agerolese cattle breed. *Animals*, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 892, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani10050892>. Acesso em: 8 fev. 2025.
- ARN, P. H. Phenylketonuria (PKU). In: AMINOFF, M. J.; DAROFF, R. B. (ed.). **Encyclopedia of the neurological sciences**. 2. ed. Oxford: Academic Press, 2014. p. 887-889. Acesso em: 8 fev. 2025.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 14. ed. Washington: AOAC, 1984.
- APN. Conhecer o leite. 2016. Disponível em: https://www.proleite.pt/wp-content/uploads/2017/02/Ebook_Conhecer_o_Leite_Final.pdf. Acesso em: 8 fev. 2025.
- BARBOSA, M. G. et al. Leites A1 e A2: revisão sobre seus potenciais efeitos no trato digestório. *Segurança Alimentar e Nutricional*, Campinas, v. 26, p. e019004, 2019. Disponível em: <https://periodicos.sbu.unicamp.br/ojs/index.php/san/article/view/8652981>. Acesso em: 18 fev. 2025.
- BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annual Review of Nutrition*, [S. l.], v. 23, p. 203-227, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.23.011702.073408>. Acesso em: 20 fev. 2025.
- BENTIVOGLIO, D. et al. Is there a promising market for the A2 milk? Analysis of Italian consumer preferences. *Sustainability*, [S. l.], v. 12, n. 17, p. 8763, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/su12176763>. Acesso em: 20 fev. 2025.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova o regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 dez. 2003. Acesso em: 12 fev. 2025.
- BRASIL. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal (RIISPOA). Diário Oficial da União, Brasília, DF, 29 mar. 2017. Acesso em: 8 fev. 2025.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Aprova o regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite cru refrigerado, leite pasteurizado e leite pasteurizado tipo A. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2018. Acesso em: 8 fev. 2025.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 77, de 26 de novembro de 2018. Estabelece os critérios e procedimentos para produção, acondicionamento, conservação, transporte, seleção e recepção do leite cru em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção oficial. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2018. Acesso em: 2 ago. 2025.

BRITO, MA; BRITO, JR; ACURI, E.; LANGE, C.; SILVA, M.; SOUZA, G. BRITO, M. A.; BRITO, J. R.; ACURI, E.; LANGE, C.; SILVA, M.; SOUZA, G. **Agronegócio do leite: composição**. Juiz de Fora: Embrapa, 2020.

CARVALHO, M. P. Manipulando a composição do leite: gordura. 2002. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/>. Acesso em: 2 ago. 2025.

CHILLIARD, Y. et al. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Annales de Zootechnie*, v. 49, p. 181–205, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1051/animres:2000117>. Acesso em: 8 fev. 2025.

CNA. Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil. Pesquisa trimestral do abate, leite e ovos: resultados do 4º trimestre de 2024. Brasília: CNA, 2025. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/publicacoes/pesquisa-trimestral-do-abate-leite-e-ovos-resultados-do-4o-trimestre-de-2024>. Acesso em: 8 fev. 2025.

COLVILLE, T.; BASSERT, J. M. **Anatomia e fisiologia clínica para medicina veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

CUNHA, R. P. L. et al. Parturition order, milk yield, somatic cell count and physicochemical characteristics of milk. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DE MASTITE, 2., 2002, Ribeirão Preto. Anais [...]. Ribeirão Preto: [s. n.], 2002. Acesso em: 5 ago. 2025.

DEPETERS, E. J.; FERGUSON, J. D. Nonprotein nitrogen and protein distribution in the milk of cows. *Journal of Dairy Science*, v. 75, n. 11, p. 3192-3209, 1992. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)78085-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)78085-0). Acesso em: 2 ago. 2025.

DE VITTE, K. et al. Relationship of β -casein genotypes (A1A1, A1A2 and A2A2) to the physicochemical composition and sensory characteristics of cows' milk. *Journal of Applied Animal Research*, v. 50, n. 1, p. 161-166, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1080/09712119.2022.2046005>. Acesso em: 3 out. 2025.

DI MARZO, L.; PRANATA, J.; BARBANO, D. M. Measurement of casein in milk by Kjeldahl and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Dairy Science*, v. 104, n. 7, p. 7448-7456, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18794>. Acesso em: 3 out. 2025.

DRACKLEY, J. K. et al. Metabolic regulation of milk synthesis and secretion in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 84, supl. E, p. E1–E15, 2001. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70133-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70133-3). Acesso em: 3 out. 2025.

EMBRAPA. Agronegócio do leite: composição. 2017. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/composicao_leite/AG01_128_21720039243.html. Acesso em: 3 out. 2025.

FANG, Z. H. et al. Genetic and nongenetic factors contributing to differences in α -casein phosphorylation isoforms and other major milk proteins. *Journal of Dairy Science*, [S. l.], v. 100, n. 7, p. 5564-5577, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12338>. Acesso em: 3 out. 2025.

FERNÁNDEZ-RICO, S. et al. A2 milk: new perspectives for food technology and human health. *Foods*, [S. l.], v. 11, n. 16, p. 2387, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods11162387>. Acesso em: 5 ago. 2025.

FREEDEN, A. H. **Considerations in the nutritional modifications of milk composition.** *Animal Feed Science and Technology*, [S. l.], v. 59, p. 185-197, 1996.

FOLEY, J. A.; OTTERBY, D. E. Availability, storage, treatment, composition, and feeding value of surplus colostrum: a review. *Journal of Dairy Science*, v. 61, n. 8, p. 1033-1060, 1978. Acesso em: 3 out. 2025.

FONTANELI, R. S. Fatores que afetam a composição e as características físico-químicas do leite. 2001. 25 f. Seminário (Pós-graduação em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001. Acesso em: 3 out. 2025.

FOX, P. F. **Cheese: chemistry, physics and microbiology: major cheese groups.** 3. ed. New York: Academic Press, 2004. v. 2, 456 p. Acesso em: 3 out. 2025.

GODDEN, S. M.; LOMBARD, J. E.; WOOLUMS, A. R. **Colostrum management for dairy calves.** *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, [S. l.], v. 35, n. 3, p. 535-556, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.07.005>. Acesso em: 2 ago. 2025.

GONZÁLES, F. H. D.; CAMPOS, R. Indicadores metabólico-nutricionais do leite. In: SIMPÓSIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA DA REGIÃO SUL DO BRASIL, 1., 2003, Porto Alegre. Anais [...]. Porto Alegre: [s. n.], 2003. p. 31-47. Acesso em: 2 ago. 2025.

HAYES, M. Measuring protein content in food: an overview of methods. *Foods*, [S. l.], v. 9, n. 10, p. 1340, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods9101340>. Acesso em: 21 set. 2025.

HEIN, M. Y. et al. Proteomic analysis of cellular systems. In: WALHOUT, A. J. M. et al. **Handbook of systems biology.** San Diego: Academic Press, 2013. p. 3-25. Acesso em: 3 out. 2025.

H. K.; LENZ, K.; HALBAUER, E. M. "A2 milk" authentication using isoelectric focusing and different PCR techniques. *Food Research International*, [S. l.], v. 147, art. 110523, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110523>. Acesso em: 3 out. 2025.

HOUSSARD, C. et al. Allocation is not enough! A system boundaries expansion approach to account for production and consumption synergies: the environmental footprint of Greek yogurt. *Journal of Cleaner Production*, [S. l.], v. 283, art. 124607, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124607>. Acesso em: 2 fev. 2025.

HRISTOV, A. N.; BANNINK, A.; CROMPTON, L. A. et al. Invited review: nitrogen in ruminant nutrition: a review of measurement techniques. *Journal of Dairy Science*, v. 102, n. 7, p. 5811-5852, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15829>. Acesso em: 3 out. 2025.

HUESO, D.; FONTECHA, J.; GÓMEZ-CORTÉS, P. Comparative study of the most commonly used methods for total protein determination in milk of different species and their ultrafiltration products. *Frontiers in Nutrition*, [S. l.], v. 9, art. 925565, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.925565>. Acesso em: 3 out. 2024.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa trimestral do abate de animais, do leite e dos ovos: resultados do 4º trimestre de 2024. Rio de Janeiro: IBGE, 2025. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/>. Acesso em: 21 dez. 2025.

IMAFIDON, G. I.; FARKYE, N. Y.; SPANIER, A. M. Isolation, purification, and alteration of some functional groups of major milk proteins: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 37, n. 7, p. 663-689, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408399709527794>. Acesso em: 3 out. 2025.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 1871:2020 – Food and feed products – general guidelines for the determination of nitrogen by the Kjeldahl method. Geneva: ISO, 2020. Acesso em: 2 fev. 2025.

JACOBSON, N. L.; MCGILLAND, A. D. The mammary gland and lactation. In: SWENSON, M. J. (ed.). **Dukes' physiology of domestic animals**. 10. ed. Ithaca: Cornell University Press, 1984.

JUNG, M.; KANG, S.; JEON, E. et al. Effects of subclinical mastitis on automatic milking system data, hematological and biochemical parameters, and milk composition in Holstein cows. *Animal Bioscience*, v. 38, n. 1, p. 166-175, 2025. DOI: <https://doi.org/10.5713/ab.24.0460>. Acesso em: 4 fev. 2025.

KLEIN, B. G. **Cunningham: tratado de fisiologia veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 945-960, 2006. Acesso em: 4 fev. 2025.

LIU, B. et al. Bovine milk with variant β -casein types on immunologically mediated intestinal changes and gut health of mice. *Frontiers in Nutrition*, [S. l.], v. 9, art. 970685, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.970685>. Acesso em: 4 fev. 2025.

LOKUGE, G. M. S. et al. Effects of feeding whole-cracked rapeseeds, nitrate, and 3-nitrooxypropanol on protein composition, minerals, and vitamin B in milk from Danish Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, [S. l.], v. 107, p. 5353-5365, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2023-24372>. Acesso em: 2 ago. 2025.

MAYER, H. K.; LENZ, C.; HALBAUER, E.-M. Authentication of “A2 milk” using isoelectric focusing and different PCR techniques. *Food Research International*, v. 147, p. 110523, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996921004221>. Acesso em: 26 jul. 2025.

MILKPOINT. Composição e particularidades dos componentes do leite. 2023. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/colunas/lipaufv/composicao-e-particularidades-dos-componentes-do-leite-225189/>. Acesso em: 21 set. 2025.

MILUCHOVÁ, M.; GÁBOR, M.; CANDRÁK, J. The effect of the genotypes of the CSN2 gene on test-day milk yields in the Slovak Holstein cow. *Agriculture*, Basel, v. 13, n. 1, p. 154, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/agriculture13010154>. Acesso em: 14 nov. 2025.

RENTERO, N. **Anuário leite 2019: novos produtos e novas estratégias da cadeia do leite para ganhar competitividade e conquistar os clientes finais**. 2. ed. São Paulo: Egb, 2019. 104 p. Acesso em: 4 fev. 2025.

NG-KWAI-HANG, K. F.; GROSCLAUDE, F. Genetic polymorphism of milk proteins. In: FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (ed.). **Advanced dairy chemistry: proteins**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002. p. 739-816. Acesso em: 4 fev. 2025.

NORO, G. Fatores ambientais que afetam a produção e a qualidade do leite em rebanhos ligados a cooperativas gaúchas. 2004. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004. Acesso em: 18 fev. 2025.

NUNES, G. de L. et al. Inovando na análise: um novo olhar para a determinação de proteínas em leite desidratado. *Contribuciones a las Ciencias Sociales*, [S. l.], v. 18, n. 4, p. e16863, 2025. DOI: <https://doi.org/10.55905/revconv.18n.4-093>. Disponível em: <https://ojs.revistacontribuciones.com/ojs/index.php/clcs/article/view/16863>. Acesso em: 29 jul. 2025.

PACCHIAROTTI, V. L.; MENDES, J. P. G.; FERREIRA, L. M. Produção do leite A2 e melhoramento genético do rebanho. *Revista Interdisciplinar de Saúde e Educação*, Ribeirão Preto, v. 1, n. 2, p. 208-226, 2020. DOI: <https://doi.org/10.56344/2675-4827.v1n2a202012>. Acesso em: 3 out. 2025.

PEREIRA, D. B. C. **Técnica em leite e derivados**. Juiz de Fora: Instituto de Laticínios Cândido Tostes, 2008. Material didático. Acesso em: 18 fev. 2025.

PIRACANJUBA. Piracanjuba lança o primeiro leite A2 de caixinha do mercado. 2022. Disponível em: https://www.piracanjuba.com.br/sobre-nos/imprensa/lancamentos/piracanjuba_lanca_o_primeiro_leite_a2_de_caixinha_do_mercado. Acesso em: 3 out. 2025.

RENTERO, N. Origem, pesquisa, produção e consumo de leite A2. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Anuário leite 2023: leite baixo carbono**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2023. p. 1-120. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1154264/anuario-leite-2023-leite-baixo-carbono>. Acesso em: 12 ago. 2023.

ROMAN, J. A.; SGARBIERI, V. C. Obtenção e caracterização química e nutricional de diferentes concentrados de caseína. *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 18, n. 1, p. 75-83, 2005. Acesso em: 18 fev. 2025.

RUSKA, D.; JONKUS, D. Crude protein and non-protein nitrogen content in dairy cow milk. *Proceedings of the Latvia University of Agriculture*, [S. l.], v. 32, p. 36-40, 2014. DOI: <https://doi.org/10.2478/plua-2014-0011>. Acesso em: 3 out. 2025.

RYŠLÁVÁ, H. et al. Effect of posttranslational modifications on enzyme function and assembly. *Journal of Proteomics*, v. 92, p. 80-109, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.03.025>. Acesso em: 18 fev. 2025.

SILVA, J. C. P. M.; VELOSO, C. M. **Manejo para maior qualidade do leite**. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2011. 182 p. Acesso em: 3 out. 2025.

SIMÕES, S. V. D. et al. Imunidade passiva, morbidade neonatal e desempenho de cabritos em diferentes manejos de colostro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 25, n. 4, p. 219-224, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2005000400006>. Acesso em: 3 out. 2025.

SGARBIERI, V. C. Revisão: propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, v. 8, p. 43-56, 2005. Acesso em: 3 out. 2025.

SOUZA, L. B. et al. Composição e características dos componentes do leite. Milkpoint, 27 mar. 2021. Coluna Lipaufv. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/colunas/lipaufv/composicao-e-particularidades-dos-componentes-do-leite-225189/>. Acesso em: 3 out. 2025.

SOUZA, R. C. Sucesso na criação de bezerros: importância do colostro. Betim: PUC Minas, 2005. Artigo técnico. Acesso em: 3 out. 2025.

SOYEURT, H. et al. Genetic variability of casein composition in bovine milk and its impact on technological properties. *Journal of Dairy Science*, [S. l.], v. 102, n. 3, p. 2123-2134, 2019. Acesso em: 3 out. 2025.

STELWAGEN, K. Milk protein. In: ROGINSKI, H.; FUQUAY, J. W.; FOX, P. F. (ed.). **Encyclopedia of dairy sciences**. London: Academic Press, 2003. p. 1835-1842. Acesso em: 3 out. 2025.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL (CNA). Protocolo vacas A2A2. 2019. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/>. Acesso em: 5 out. 2025.

ÜÇTUĞ, G. The environmental life cycle assessment of dairy products. *Food Engineering Reviews*, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 104-121, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12393-019-9187-2>. Acesso em: 3 out. 2024.

VANHOLDER, T.; OPSOMER, G.; DE KRUIF, A. Relationships among energy metabolism, milk yield and milk composition in dairy cows during early lactation. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 41, n. 1, p. 70-75, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00649.x>. Acesso em: 3 out. 2025.

WANG, X. et al. Comparative proteomic characterization of bovine milk containing β -casein variants A1A1 and A2A2, and their heterozygote A1A2. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 101, n. 2, p. 718-725, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.10684>. . Acesso em: 5 ago. 2025.

WATTIAUX, M. A. Composição do leite e seu valor nutricional. In: UNIVERSITY OF WISCONSIN. **Essenciais em gado de leite**. Madison: University of Wisconsin, 2015. cap. 19, p. 73-76. Disponível em: https://kb.wisc.edu/images/group226/52752/19-25/de_19.pt.pdf. Acesso em: 5 ago. 2025.

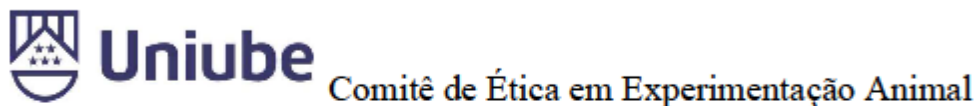
ZAFALON, L. F. et al. Alterações da composição e da produção de leite oriundo de quartos mamários de vacas com e sem mastite subclínica de acordo com o estágio e o número de lactações. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 72, n. 4, p. 419-426, 2005.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 5. ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 2010. Acesso em: 3 out. 2024.

ZHANG, X.; HARTMANN, H. Sample size calculation for animal experiments: statistical background and practical guidelines. *Laboratory Animal Research*, [S. l.], v. 36, n. 1, p. 1-12, 2020. Acesso em: 3 out. 2024.

9 ANEXOS

9.1 COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



Ofício CEEA-003/2025

Uberaba, 24 de outubro de 2025

Ilmo. Prof.

ANDRÉ BELICO DE VASCONCELOS

Assunto: Encaminha processo nº 003/2025, sobre o protocolo de pesquisa **"Proteínas nitrogenadas e compostos não nitrogenados no leite de vacas A1A1 e A2A2: análise por kjeldahl e correlações com qualidade do leite"**,

Prezado (a) Professor(a),

Em resposta a sua solicitação, informo que o protocolo acima referido foi submetido a avaliação do CEEA-UNIUBE no dia 20/10/2025, sendo considerado **aprovado**.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Joely F. Bittar".

Profa. Joely F. Figueiredo Bittar

Coordenadora do CEEA-UNIUBE

9.2 DECLARAÇÃO DE CONCLUSÃO



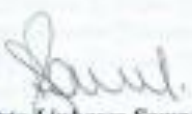
Reconhecida pela Portaria nº 944 - MEC,
de 28/10/1988 - (DOU 26/10/1988 - Seção 1, p. 20.766),
Curso Superior na Modalidade a Distância
Reconhecida pela Portaria nº 047, de 05/04/2010 -
(DOU nº 68, Seção 1, pág. 14, de 10/04/2010);
Modalidade Presencial a Campus Foco de São João del-Rei/MG
Reconhecida pela Portaria nº 957, de 11/11/2020 -
(DOU nº 214, Seção 1, pág. 41, de 12/11/2020).


DECLARAÇÃO DE CONCLUSÃO

Declaramos, para os devidos fins, que ANNA JÚLIA SOUSA MONTEIRO defendeu a dissertação de mestrado intitulada "PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E CONSTITUINTES DO LEITE DE VACAS AIA1 E A2A2 COMO INDICADORES DE QUALIDADE: COMPOSTOS NITROGENADOS, NÃO NITROGENADOS", do Programa de Pós-graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos (PPGSPAT) da Universidade de Uberaba, área de concentração em SANIDADE E PRODUÇÃO ANIMAL NOS TRÓPICOS, no dia 06 de fevereiro de 2026, tendo sido considerado(a) aprovado(a).

Declaramos, ainda, que o(a) aluno(a) deverá entregar, no prazo máximo de 60 (sessenta) dias, a versão definitiva impressa da dissertação, corrigida conforme orientações da banca examinadora, para que se dê o início ao processo de expedição de seu diploma.

Uberaba, MG, 06 de fevereiro de 2026.


Prof. Dr. Renato Lindares Sampaio
Coordenador do PPGSPAT


Prof. Dr. André Luís Teixeira Fernandes
Pró-reitor de Pesquisa, Pós-graduação e Extensão