

Evaluación del Punto de Descenso Crioscópico en leche de vaca en sistemas pastoriles.

(Primer año)

Cartaya Andrea¹, Hirigoyen Darío^{1,2}, García Pablo³, Hillmann Sebastián³, Cabrera Juan¹; Mendoza Alejandro¹; Fariña Santiago¹.

¹ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Laboratorio de Calidad de Leche, La Estanzuela. Ruta 50 km 11, Colonia, Uruguay. +5984574800, acartaya@inia.org.uy; jcabrera@inia.org.uy; amendoza@inia.org.uy; sfarina@inia.org.uy.

² Dpto. de Ciencia y Tecnología de la Leche. Fac. de Veterinaria, UdelaR. Las Placas 1550, Mdeo. Uruguay. +59826222411. dariohirigoyen@gmail.com

³ Universidad del Trabajo del Uruguay, Escuela Agraria Superior "La Carolina". Puntas del Sauce, Flores, Uruguay. pgpabgarcia15@gmail.com; sebahillmann2997@gmail.com

Eje Temático: Producción Primaria

Resumen: El punto de descenso crioscópico (PDC) de la leche es una característica muy usada para establecer el agregado de agua a la leche. La Ley de calidad de leche de Uruguay (Decreto N°359/013) y el Reglamento Técnico MERCOSUR de identidad y calidad de leche fluida a granel de uso industrial, establecen como límite máximo para la aceptación de leche a granel por la industria - 0.512°C. Los valores de PDC son característicos para cada región, si bien hay muchos relevamientos en el mundo, en Uruguay no contamos con una caracterización que permita conocer cuál es el valor de PDC de base teniendo en cuenta los sistemas de alimentación y las épocas del año. De acuerdo con investigaciones de varios autores la adición de agua de forma voluntaria o no, no es la única causa de la ocurrencia de cambios en el PDC. Algunos de los factores que pueden influir son la cantidad de partos, los días en lactancia (DIM), la alimentación, los litros de producción diaria, la cantidad de ciertos componentes como la proteína, lactosa, sólidos totales (ST) y el recuento de células somáticas (RCS). En este trabajo se presenta la evaluación del PDC de leche de vaca individual de un ensayo establecido en el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, en la estación experimental de La Estanzuela. Consta de cuatro tratamientos, con dos estrategias de alimentación basadas en alta cosecha de forrajes y dos genotipos de vacas Holando que difieren en tamaño. La determinación del PDC en muestras de vaca individual en estas condiciones permite poder detectar las variables con mayor influencia en este indicador de calidad de leche. Durante un año se obtuvieron muestras de leche individual quincenalmente. El análisis de PDC se realizó por tecnología infrarroja transformada de Fourier (FTIR por su sigla en inglés) siguiendo lo establecido en el Bulletin FIL 383/2003, validado con el método de referencia termistor (ISO 5764:2009). El resto de los componentes composicionales también fueron analizados por FTIR y el RCS por citometría de flujo.

Palabras claves: punto descenso crioscópico, leche vaca individual, sistemas pastoriles

Metodología: Las muestras usadas para este estudio fueron obtenidas en el "Proyecto 10MIL", un experimento realizado por el programa nacional de lechería de INIA, que evalúa a escala de sistema completo durante tres años, módulos comparativos diseñados para lograr alta producción por hectárea (1000kg sólidos / ha VM) a través de una alta cosecha de forraje propio (10 toneladas MS / ha VM), con estrategias de alimentación y genotipos contrastantes. Los sistemas cuentan con un seguimiento pormenorizado de las variables físicas y biológicas que permite evaluar los efectos de cada sistema en los animales, pasturas, leche, desempeño productivo del sistema global y el resultado económico. Se definieron cuatro tratamientos con un diseño factorial de 2x2. Los dos niveles de estrategia de alimentación son "conduce dieta" (asignación de cantidad de pastura por pastoreo directo fija, aproximadamente 30% de la dieta promedio anual) y "conduce pasto" (asignación de cantidad de pastura por pastoreo directo en función del crecimiento de la plataforma de pastoreo del sistema, aproximadamente 60% de la dieta promedio anual). Los dos niveles de genotipo animal son "Holando grande" (genotipo representativo del rodeo nacional con alta proporción de genética de origen de Estados Unidos y Canadá) y "Holando chico" (genotipo presente en el rodeo nacional, con un tamaño adulto menor -100 kg aproximadamente- y mayor nivel de sólidos por litro). Se ajustó la carga animal de forma tal que la carga comparativa (kg peso vivo / ha

VM) fuera similar entre tratamientos (30 vacas por grupo). Los tratamientos del ensayo quedaron conformados: GP1: estrategia de alimentación “dieta”, genotipo “chico”; GP2: estrategia de alimentación “dieta”, genotipo “grande”; GP3: estrategia de alimentación “pasto”, genotipo “chico”; GP4: estrategia de alimentación “pasto”, genotipo “grande”. Durante el primer año de evaluación (Junio 2017 – Mayo 2018) el consumo promedio por grupo de concentrado, silo y pasto fue para el GP1: 34%, 32%, 34%; GP2: 37%, 34%, 29%; GP3: 31%, 24%, 45%; GP: 31%, 29%, 41%; respectivamente (Figura 1).

Las muestras de leches se obtuvieron durante el control lechero quincenal. Las muestras fueron individuales y compuestas por los dos ordeños. Se usó bronopol al 0,2 g/mL para conservar las muestras que se analizaron por FTIR, mientras que las analizadas por el crioscopio termistor se conservaron refrigeradas sin conservante. Los análisis de leche se realizaron en el Laboratorio de Calidad de Leche de INIA La Estanzuela. Para la grasa, proteína, lactosa, ST, urea y punto de descenso crioscópico (PDC) se usó un equipo MilkoScan FT+ combinado con Fossomatic FC para el RCS (Foss Electric A/S, Hillerod, Dinamarca). Para el método de referencia termistor se usó un crioscopio ADVANCED modelo 4520 (Advanced Instruments, Massachusetts, USA). Se analizaron un total de 2983 muestras. Para el análisis de los datos no se consideraron las muestras que arrojaron resultados fuera de los rangos de trabajo validados de los equipos del laboratorio (grasa: 3,0 a 6,0 g/mL; proteína: 2,7 a 5,0 g/mL; lactosa: $\geq 4,0$ g/mL; ST: $\leq 14,5$ g/mL; urea: 5 a 40 mg/dL). El análisis de los datos se realizó sobre 2289 muestras.

Los métodos de determinación del PDC se validaron de acuerdo con procedimientos internos del laboratorio basados en: UNIT-ISO/IEC 17025:2005 - Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración; Bulletin FIL 383/2003 – New Applications of Mid-infrared Spectrometry for the Analysis of Milk Products; ISO 5764:2009 – Milk – Determination of freezing point – Thermistor cryoscope method (Reference method). Esta validación asegura que los resultados son confiables, seguros, reproducibles y trazables a estándares internacionales. Los parámetros evaluados para la validación fueron: repetibilidad (r), reproducibilidad (R), exactitud, rango de trabajo, linealidad y análisis de residuos (Tabla 1). La validación del crioscopio termistor se realizó con 94 muestras provenientes de análisis de rutina y de los estándares de referencia (-408; -600 y -512 m°C). La validación del método FTIR se realizó con 85 muestras provenientes de análisis de rutina que fueron analizadas por el crioscopio termistor y agregado del 0.02% de bronopol.

Resultados y discusión: Los valores promedio de PDC determinados por vaca individual fueron para el GP1: -0,5091°C; GP2: -0,5082°C; GP3: -0,5123°C; GP4: -0,5100°C (Figura 2). Estos valores obtenidos son más altos que los reportados por autores europeos para este tipo de muestras (Bowman *et al.*, 2005; Zagorska y Ciprova, 2013; Otwinowska Mindur *et al.*, 2018).

Henno *et al.* (2007) describió que el PDC era menor durante el período en que las vacas estaban en pastoreo que cuando estaban confinadas. En este trabajo las estrategias de alimentación no son tan contrastantes, pero igualmente puede observarse una disminución en el PDC para los animales de los GP3 y GP4 que tiene mayor consumo de pasturas (Tabla 2).

Varios trabajos se refieren a la influencia de la raza de los animales en el PDC (Otwinowska Mindur *et al.*, 2018; Henno *et al.*, 2007; Kędzierska-Matysek *et al.*, 2011). En este trabajo los GP1 y GP3, integrados por los genotipos de vaca chica, tienen valores menores de PDC que las de genotipo grande bajo la misma estrategia de alimentación (Figura 2).

La relación del PDC con la época del año es otro de los factores evaluados, en verano y otoño se observaron los valores más bajos (Tabla3), comportamiento que se repitió en todos los GP. Otwinowska-Mindur *et al.* (2018) reportaron efecto significativo de la estación del año, pero no hay consenso sobre cuál es la que presenta los valores menores o mayores. Seguramente el efecto de la época sobre el PDC también sea influenciado por las condiciones climáticas, la disponibilidad de agua y el tipo de alimento.

Henno *et al.* (2007) encontró un efecto de los DIM en el PDC, este se incrementó desde el primero hasta el tercer mes de lactancia, luego descendió a medida que los DIM avanzaban. En el período evaluado de este ensayo solo se encontró diferencia significativa, con valores de PDC más bajos, cuando los animales superaron los 300 DIM.

Contrario a lo reportado por otros autores los valores más bajos de PDC fueron encontrados en las vacas de primer parto (-0,5121°C), no siendo el resto significativamente diferentes. Otwinowska-

Mindur *et al.* (2018) observaron que el PDC se incrementó a medida que aumentaba el número de lactancias, siendo este efecto altamente significativo.

Observando las relaciones establecidas entre el PDC y los componentes de la leche, la relación más importante se da con la lactosa, de tipo negativa (-0,54), explicado por la participación de este componente en la regulación de la presión osmótica. Del mismo sentido pero más débil son las relaciones con la proteína (-0,20) y los ST (-0,26) (Tabla 4). Brouwer (1981) menciona que la lactosa es responsable en más del 50% de la variación en PDC, y similares resultados describen Otwinowska-Mindur *et al.* (2018). La producción diaria de leche puede relacionarse en este punto también, ya que los animales con producción diaria mayor a 26L presentaron un PDC mayor (-0,5091°C) (Otwinowska-Mindur *et al.*, 2018). Cuando el RCS es mayor a 200 mil células/mL el PDC es más alto (Tabla 5), como lo han informado Henno *et al.* (2007).

Conclusiones: Los valores de PDC promedio de vaca individual por grupo, para el primer año de ensayo fueron: para el GP1: -0,5091°C; GP2: -0,5082°C; GP3: -0,5123°C; GP4: -0,5100°C. Se pudieron comprobar distintos efectos que influyen el PDC, como la época del año, los días en lactancia, la cantidad de partos, la producción diaria de leche y de componentes como la lactosa, proteína, ST y RCS. Se vieron tendencias que necesitan ser reafirmadas con más datos de investigación, acerca de las estrategias de alimentación y los genotipos animales. Con los resultados que se recolectarán en los próximos dos años de ensayo, será posible reafirmar los resultados obtenidos y tener información local acerca del comportamiento de cada variable a lo largo de los años.

Referencias bibliográficas

Bowman, M., Gill, R., & Reynolds, C. (2005). Significance of nutritional effects on the freezing point of milk, (5), 8–10. *Ontario Agri-Business Association Nutrition Committee*. Recuperado de <https://www.milk.org/corporate/pdf/Farmers-FreezingPoint.pdf>

Brouwer, T. (1981) Calculations concerning the determination of the freezing point depression of milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 35 (2), 159–175.

Henno, M., Ots, M., Jõudu, I., Kaart, T., & Kärt, O. (2007). Factors affecting the freezing point stability of milk from individual cows. *International Dairy Journal*, 18(2), 210-215.

IDF (2003). Bulletin of the IDF No. 383/2003 - New Applications of Mid-infrared Spectrometry for the Analysis of Milk Products, 16-22.

ISO, B. (2005, May). IEC 17025: 2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. In *ICS* (Vol. 3, p. 20).

ISO 5764:2009 - Milk -- Determination of freezing point -- Thermistor cryoscope method (Reference method).

Kędzierska-Matysek, M., Litwińczuk, Z., Florek, M., & Barłowska, J. (2011). The effects of breed and other factors on the composition and freezing point of cow's milk in Poland. *International Journal of Dairy Technology*, 64(3), 336-342.

Otwinowska-Mindur, A. (2018). Effects of lactation number, milk yield and milk composition on freezing point of milk of Polish Holstein-Friesian cows. *Journal of Central European Agriculture*, 19(1), 83-94.

Zagorska, J., & Ciprova, I. (2013). Evaluation of factors affecting freezing point of milk. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 7(2), 106-111.

Anexos

Tabla 1. Validación de los métodos de determinación del PDC de acuerdo a ISO 5764:2009 – Milk – Determination of freezing point – Thermistor cryoscope method (Reference method y Bulletin FIL 383/2003 – New Applications of Mid-infrared Spectrometry for the Analysis of Milk Products.

	Parámetros verificados	Indicador	Criterio de aceptación	Resultados	Resultado
TERMISTOR	Repetibilidad	Diferencia absoluta	Máximo aceptado en no más del 5% de las muestras: Leche vaca: 4m°C - Leche cabra: 4m°C - Leche oveja: 6m°C	0.001 °C	cumple
	Exactitud	Diferencia absoluta	Desviación de los valores de referencia. Máx: 0.002 °C	-0.001 °C	cumple

	Rango de Trabajo	Linealidad	Rango entre el menor y el mayor valor de los Estándares de Calibración	-408 m°C a -600 m°C	cumple
	Linealidad	Coefficiente de Regresión	R ² > 0.95	0.9995	cumple
FTIR	Repetibilidad	Diferencia absoluta	≤ 0.0014 °C	0.0004	cumple
	Exactitud	Diferencia absoluta	≤ 0.004 °C	0.0036	cumple
	Rango de Trabajo	Linealidad	Rango entre el menor y el mayor valor de los Estándares de Calibración del crioscopio termistor	-408 m°C a -600 m°C	cumple
	Linealidad	Coefficiente Regresión	R ² > 0.80	R ² = 0,8062	cumple

Tabla 2. Valores del punto de descenso crioscópico por grupo entre Junio 2017 – Mayo 2018.

GP	Media (°C)	n	E.E.	
3	-0,5123	582	0,0004	A
4	-0,5100	630	0,0004	B
1	-0,5091	486	0,0004	B C
2	-0,5082	591	0,0004	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

Tabla 3. Valores del punto de descenso crioscópico por estación entre Junio 2017 – Mayo 2018.

Estación	Media (°C)	n	E.E.	
otoño	-0,5130	428	0,0004	A
verano	-0,5121	475	0,0004	A
invierno	-0,5085	565	0,0004	B C
primavera	-0,5080	821	0,0003	B C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

Tabla 4. Coeficientes de correlación entre punto de descenso crioscópico y otros componentes

Variable	n	Coef. Corr.	p-valor
grasa	2289	-0,05	0,021
proteína	2289	-0,20	0,000
lactosa	2289	-0,54	0,000
ST	2289	-0,26	0,000
urea	2289	0,04	0,052

Relación significativa p-valor <0.05

Tabla 5. Valores del punto de descenso crioscópico según RCS entre Junio 2017 – Mayo 2018.

RCS (mil cél/mL)	Media (°C)	n	E.E.	
51-200	-0,5101	725	0,00034	A
≤ 50	-0,5101	1019	0,00029	A
201-400	-0,5097	315	0,00052	A B
> 400	-0,5086	230	0,00061	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05)

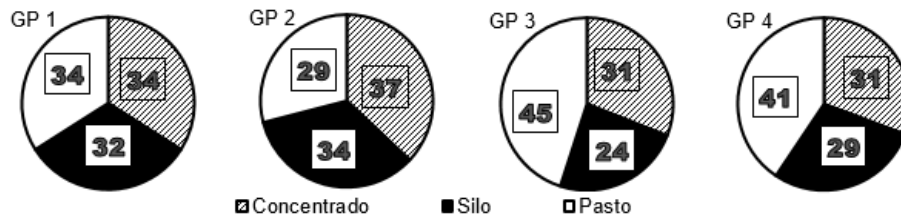


Figura 1. Consumo por grupo en el período Junio 2017 – Mayo 2018.

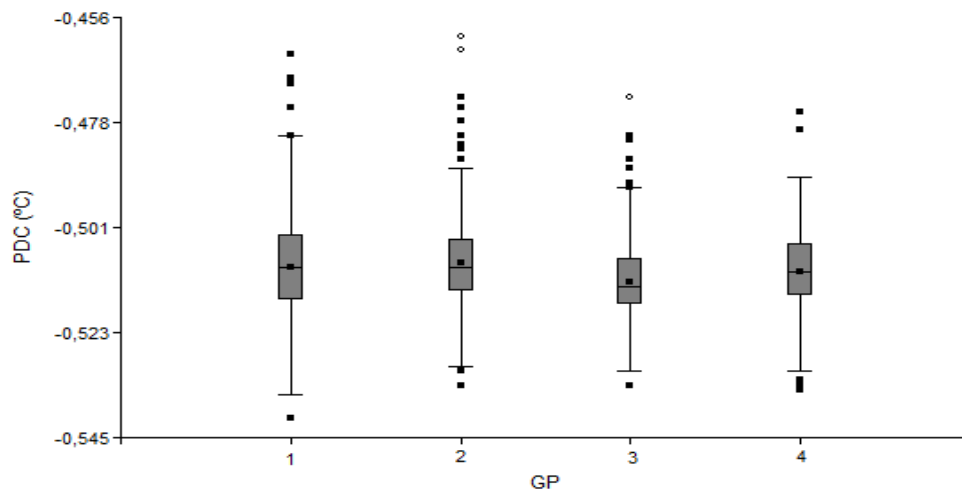


Figura 2. Punto descenso crioscópico por grupo en el período Junio 2017 – Mayo 2018.

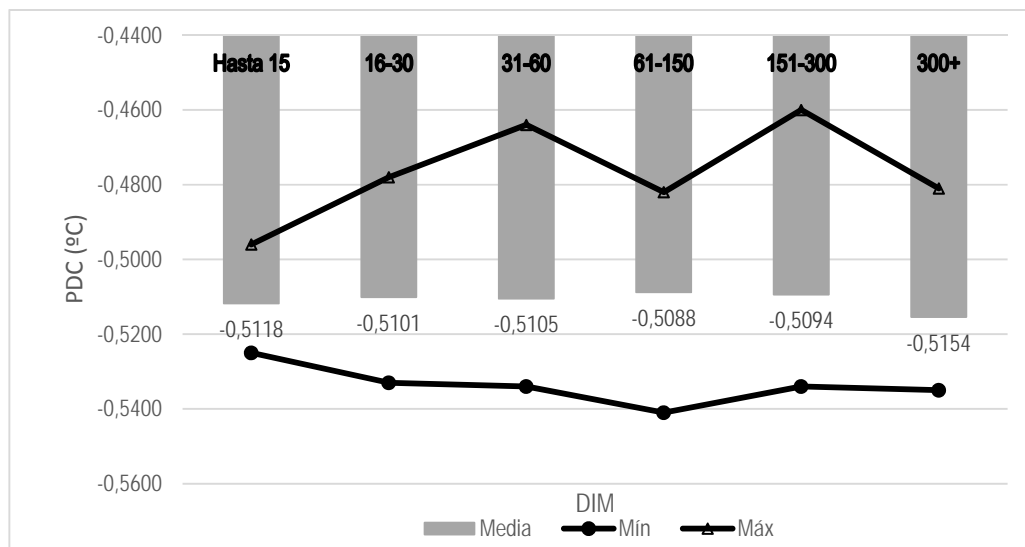


Figura 3. Punto descenso crioscópico por días de lactancia en el período Junio 2017 – Mayo 2018.