**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Silagem de colostro: caracterização do perfil de fermentação
anaeróbia e desempenho de bezerros leiteiros**

Lucas Silveira Ferreira

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e
Pastagens

**Piracicaba
2011**

Lucas Silveira Ferreira
Engenheiro Agrônomo

**Silagem de colostro: caracterização do perfil de fermentação anaeróbia e
avaliação do desempenho de bezerros leiteiros**

Orientadora:
Prof^a Dra **CARLA MARIS MACHADO BITTAR**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e
Pastagens

**Piracicaba
2011**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Ferreira, Lucas Silveira

Silagem de colostro: caracterização do perfil de fermentação anaeróbia e desempenho de bezerros leiteiros / Lucas Silveira Ferreira. - - Piracicaba, 2011.
161 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Aleitamento animal 2. Bezerros - Desempenho 3. Bovinos leiteiros 4. Colostro
5. Dieta animal 6. Fermentação anaeróbica 7. Silagem 8. Sucedâneo do leite para
animais 9. Valor nutritivo I. Título

CDD 636.214
F383s

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

À memória do meu avô Marcionilio Parronchi Ferreira

À minha família, em especial à minha mãe Heloisa

Ao Leandro Godoy, por tudo

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Departamento de Zootecnia, professores e funcionários, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos e financiamento do projeto.

À Professora Dra. Carla Maris Machado Bittar pela orientação, paciência, oportunidades de aprendizagem e, principalmente, pela convivência diária sempre agradável.

À colaboração da Fazenda Colorado (Araras – SP), da Empresa Agrícola Pastoril Fazenda Santa Rita (Fazenda Agrindus – Descalvado – SP) e do Instituto de Zootecnia (IZ Nova Odessa - SP) pelo apoio na colheita e doação do colostro.

À colaboração da Fazenda Campestre e à Fazenda Tainá, de São Pedro/SP, pela doação de parte dos bezerros.

Ao Professor Dr. José Eurico Possebon Cyrino por disponibilizar espaço físico do Laboratório de Piscicultura para a realização de grande parte das análises laboratoriais.

Aos amigos de curso de Pós-Graduação Jackeline Thaís da Silva e Marcelo Cezar Soares pela amizade, convivência e apoio no experimento de campo e nas análises laboratoriais.

Aos colegas do Grupo de Estudos em Metabolismo Animal pelo apoio na condução do experimento de campo.

Aos funcionários do Laboratório de Bromatologia do Departamento de Zootecnia da ESALQ, Carlos César Alves e Tânia Aparecida Ferri.

OBRIGADO!

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	19
1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Exigências nutricionais de bezerros em aleitamento.....	23
2.2 Dieta líquida para animais em aleitamento.....	28
2.2.1 Sucedâneos lácteos	29
2.2.2 Colostro excedente e leite de transição.....	31
2.2.2.1 Armazenamento do colostro excedente	33
Referências.....	42
 3 CARACTERIZAÇÃO DA DINÂMICA FERMENTATIVA, MICROBIOLÓGICA E NUTRICIONAL DE COLOSTRO BOVINO FERMENTADO SOB CONDIÇÕES ANAERÓBIAS	 47
Resumo	47
Abstract	48
3.1 Introdução	49
3.2 Material e métodos.....	51
3.2.2 Determinação do pH, acidez titulável e temperatura.....	51
3.2.3 Determinação da concentração de ácido láctico.....	52
3.2.4 Avaliações microbiológicas	53
3.2.5 Análises químico-bromatológicas.....	54
3.2.5.1 Lactose.....	54
3.2.5.2 Gordura bruta	55
3.2.5.3 Frações nitrogenadas.....	55
3.2.5.4 Glicose	57
3.2.6 Análises estatísticas.....	57

3.3 Resultados e discussão	58
3.3.1 Dinâmica fermentativa	58
3.3.2 Caracterização microbiológica	63
3.3.3 Composição nutricional	68
3.4 Conclusões	75
Referências	76

4 DINÂMICA FERMENTATIVA, MICROBIOLÓGICA E NUTRICIONAL DE COLOSTRO BOVINO FERMENTADO SOB CONDIÇÕES ANAERÓBIAS E ARMAZENADOS EM DIFERENTES TEMPERATURAS AMBIENTAIS

Resumo	81
Abstract	82
4.1 Introdução	83
4.2 Material e métodos	85
4.2.1 Silagem de colostro	85
4.2.2 Determinação do pH, acidez titulável e temperatura	85
4.2.3 Determinação da concentração de ácido láctico	86
4.2.4 Avaliações microbiológicas	87
4.2.5 Análises químico-bromatológicas	88
4.2.5.1 Lactose	88
4.2.5.2 Gordura bruta	89
4.2.5.3 Frações nitrogenadas	89
4.2.5.4 Glicose	91
4.2.6 Análise estatística	91
4.3 Resultados e discussão	92
4.3.1 Dinâmica fermentativa	92
4.3.2 Dinâmica microbiológica	99
4.3.3 Composição nutricional	105
4.4 Conclusões	113
Referências	114

5 DESEMPENHO E PARÂMETROS SANGUÍNEOS DE BEZERROS LEITEIROS RECEBENDO SUCEDÂNEO LÁCTEO OU SILAGEM DE COLOSTRO	119
Resumo	119
Abstract	120
5.1 Introdução	121
5.2 Material e métodos	123
5.2.1 Animais, instalações e manejo alimentar	123
5.2.2 Análises químico-bromatológicas	125
5.2.3 Avaliação do desempenho e desenvolvimento corporal	126
5.2.4 Escore fecal e sanidade	126
5.2.5 Colheita de sangue e metodologia analítica	126
5.2.5.1 Colheita de sangue	126
5.2.5.2 Determinação de glicose plasmática	127
5.2.5.3 Determinação de proteínas totais no plasma	127
5.2.5.4 Determinação de ácidos graxos livres (AGL) no plasma	127
5.2.5.5 Determinação de β -hidroxibutirato (BHBA) no plasma	128
5.2.5.6 Determinação nitrogênio uréico no plasma	129
5.2.6 Análise estatística	129
5.3 Resultados e discussão	130
5.3.1 Composição químico-bromatológica	130
5.3.2 Consumo de concentrado e desempenho	132
5.3.3 Morbidade e mortalidade	141
5.3.4 Parâmetros sanguíneos	144
5.4 Conclusões	153
Referências	154
6 CONSIDERAÇÕES GERAIS	161

RESUMO

Silagem de colostro: caracterização do perfil de fermentação anaeróbia e avaliação do desempenho de bezerros leiteiros

O objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil de fermentação anaeróbia de colostro e determinar seu valor nutritivo, assim como avaliar o desempenho de bezerros leiteiros alimentados com silagem de colostro como dieta líquida. No primeiro experimento, colostro bovino de segunda e terceira ordenhas foi fermentado em garrafas plásticas tipo PET que foram cheias e ligeiramente pressionadas antes do seu fechamento, criando assim uma condição anaeróbia. As garrafas foram armazenadas em sala escura à temperatura ambiente e cinco garrafas foram abertas 0,1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28 e 56 dias após, para determinação de pH, acidez titulável, temperatura, ácido láctico, nitrogênio total, nitrogênio não-protéico (NNP), caseína, lactose, glicose, gordura e contagem de microorganismos. Os valores de pH, acidez titulável e concentração de ácido láctico apresentaram variação durante o armazenamento ($P<0,0001$). A fração NNP apresentou aumento ($P<0,0001$), enquanto que os valores de caseína e lactose diminuíram ($P<0,0001$) e apresentaram baixos valores após 56 dias. O desenvolvimento de bactérias ácido-láticas (BAL) foi intenso durante o processo fermentativo, enquanto que enterobactérias e leveduras apresentaram declínio. No segundo experimento, colostro bovino de segunda e terceira ordenhas foi fermentado da mesma forma que no primeiro experimento, mas em diferentes condições de temperaturas ambientais. As garrafas foram armazenadas em incubadora BOD com temperatura controlada ($32,5\pm1^{\circ}\text{C}$ ou $22,5\pm1^{\circ}\text{C}$) ou em sala escura à temperatura ambiente, sendo abertas três garrafas após 0, 1, 7, 14, 21, 28 e 35 dias para avaliação dos mesmos parâmetros avaliados no primeiro estudo. A maioria dos parâmetros apresentou comportamento semelhante ao observado no primeiro experimento. O desenvolvimento de BAL foi intenso, principalmente quando o colostro foi armazenado em temperatura mais elevada. A temperatura também afetou os parâmetros nutricionais ($P<0,0001$) com acréscimos nos valores de NNP e redução da concentração de caseína e lactose. No terceiro experimento, dezoito bezerros Holandês foram alocados em abrigos individuais até a oitava semana de vida, com livre acesso à água e concentrado inicial, e passaram a receber 4L da dieta líquida, sucedâneo lácteo ou colostro fermentado sob condições anaeróbicas (silagem de colostro), diluído na razão de 1:1. Os animais alimentados com silagem de colostro apresentaram menor consumo de concentrado, ganho de peso diário e peso vivo ($P<0,07$) durante o período experimental, em comparação aos animais consumindo sucedâneo lácteo. As avaliações quanto à altura na cernelha, perímetro torácico e largura da garupa não apresentaram diferenças ($P>0,07$). Todos os parâmetros sanguíneos avaliados (glicose, N-uréico, ácidos graxos livres e β -hidroxibutirato) foram afetados pelos tratamentos ($P<0,07$), exceto a concentração plasmática de proteínas totais ($P>0,07$). O escore fecal foi afetado pelos tratamentos durante a segunda semana de vida ($P<0,07$), com animais alimentados com silagem de colostro apresentando fezes anormais e muito secas. A dinâmica fermentativa observada mostra que o colostro pode ser conservado através de fermentação anaeróbia de forma eficiente. Entretanto, o fornecimento de silagem de

colostro como dieta líquida exclusiva durante o período de aleitamento não resulta em desempenho animal adequado, não sendo uma boa alternativa de substituto de leite.

Palavras-chave: Bezerros em aleitamento; Colostro fermentado; Dieta líquida; Fermentação anaeróbica; Substituto de leite

ABSTRACT

Colostrum silage: dynamics of anaerobic fermentation and dairy calves performance evaluation

The objective of this study was to characterize the fermentative dynamic of bovine colostrum, under anaerobic condition, and determine the nutritional value, as well as evaluate dairy calves' performance receiving colostrum silage as liquid diet. In the first experiment, bovine colostrum from second and third milking was fermented at room temperature in PET plastic bottles that were filled and lightly pressed before its closure, thereby creating an anaerobic condition. The bottles were stored in the dark at room temperature and five bottles were opened on days 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28 and 56 after for determination of pH, titratable acidity, temperature, lactic acid, total nitrogen, non-protein nitrogen (NPN), casein, lactose, glucose, fat and counts of microorganisms. The pH, titratable acidity and concentration of lactic acid showed large variation during storage ($P < 0.0001$). The NPN fraction increased ($P < 0.0001$), whereas the values of casein and lactose decreased ($P < 0.0001$) and showed very low values after 56d. The development of lactic-acid bacteria (LAB) was intense during the fermentation process, while enterobacteria and yeasts declined. In the second experiment, bovine colostrum from second and third milking was collected, mixed and stored in PET plastic bottles, in the same manner as it was for the first study. However, the bottles were stored in a dark room with temperature controlled by a BOD incubator ($32.5 \pm 1^\circ\text{C}$ or $22.5 \pm 1^\circ\text{C}$) or at room temperature. Three bottles were opened after 0, 1, 7, 14, 21, 28 and 35 days for evaluation of the same parameters done during the first study. Most parameters presented similar patterns as observed in the first trial. The development of LAB was intense, especially when colostrum was stored at higher temperature. Temperature also influenced the results of nutritional parameters ($P < 0.0001$) with increases in NPN values and reduction of casein and lactose concentration. In the third experiment, eighteen Holstein calves were allocated to individual hutches until the eighth week of life, with free access to water and starter feed, and fed 4 liters of liquid diet: milk replacer or colostrum fermented under anaerobic condition (colostrum silage), diluted at a 1:1 ratio. Animals fed colostrum silage had lower intake of starter, average daily gain and body weight ($P < 0.07$) during the experimental period, compared to animals consuming milk replacer. The values of withers height, heart girth and hip width showed no differences ($P > 0.07$). All blood parameters measured (glucose, urea-N, free fatty acids and β -hydroxybutyric acid) were affected by treatments ($P < 0.07$), except the total protein plasma concentration ($P > 0.07$). The fecal score was affected by treatments during the second week of life ($P < 0.07$), with animals fed colostrum silage presenting abnormal and very dry feces. The dynamics of fermentation show that colostrum can be efficiently stored under anaerobic conditions. However, feeding colostrum silage as an exclusive liquid diet, during the whole milk-feeding period, results in poor animal performance, being considered as an inadequate alternative as milk replacer.

Keywords: Anaerobic fermentation; Colostrum storage; Fermented colostrum; Liquid diet

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	- Possíveis rotas metabólicas para fermentação de lactose e galactose por bactérias lácticas.....	35
Figura 3.1	- Efeito do tempo de armazenamento no pH e na acidez titulável (°Dornic) de colostro fermentado sob condições anaeróbicas.....	60
Figura 3.2	- Efeito do tempo de armazenamento nas concentrações de ácido láctico de colostro fermentado sob condições anaeróbicas.....	61
Figura 3.3	- Efeito do tempo de armazenamento na temperatura (°C) de colostro fermentado sob condições anaeróbicas.....	62
Figura 3.4	- Efeito do tempo de armazenamento nas contagens de bactérias ácido-láticas ($\log_{10}$ UFC/mL) em colostro fermentado sob condições anaeróbicas.....	64
Figura 3.5	- Efeito do tempo de armazenamento nas contagens de enterobactérias ($\log_{10}$ UFC/mL) em colostro fermentado sob condições anaeróbicas.....	66
Figura 3.6	- Efeito do tempo de armazenamento nas contagens de leveduras ($\log_{10}$ UFC/mL) em colostro fermentado sob condições anaeróbicas.....	67
Figura 3.7	- Efeito do tempo de armazenamento nas concentrações de lactose (%) de colostro fermentado sob condições anaeróbicas.....	69
Figura 3.8	- Efeito do tempo de armazenamento nas concentrações de glicose (%) de colostro fermentado sob condições anaeróbicas.....	70
Figura 3.9	- Efeito do tempo de armazenamento nas concentrações de proteína bruta (%) de colostro fermentado sob condições anaeróbicas.....	71
Figura 3.10	- Efeito do tempo de armazenamento na concentração de caseína (%) de colostro fermentado sob condições anaeróbicas.....	72
Figura 3.11	- Efeito do tempo de armazenamento nas concentrações de nitrogênio não-protéico (% NT) de colostro fermentado sob condições anaeróbicas.....	73
Figura 3.12	- Efeito do tempo de armazenamento nas concentrações de gordura (%) de colostro fermentado sob condições anaeróbicas.....	75

Figura 4.1	- Efeito do tempo de armazenamento no pH de colostro fermentado sob condições anaeróbicas e armazenado em diferentes temperaturas ambientais.....	93
Figura 4.2	- Efeito do tempo de armazenamento na acidez titulável (°Dornic) de colostro fermentado sob condições anaeróbicas e armazenado em diferentes temperaturas ambientais.....	96
Figura 4.3	- Efeito do tempo de armazenamento nas concentrações de ácido láctico (mg/mL) de colostro fermentado sob condições anaeróbicas e armazenado em diferentes temperaturas ambientais.....	97
Figura 4.4	- Efeito do tempo de armazenamento na temperatura (°C) de colostro fermentado sob condições anaeróbicas e armazenado em diferentes temperaturas ambientais.....	98
Figura 4.5	- Efeito do tempo de armazenamento nas contagens de bactérias ácido- lácticas ($\log_{10}$ UFC/mL) em colostro fermentado sob condições anaeróbicas e armazenado em diferentes temperaturas ambientais.....	100
Figura 4.6	- Efeito do tempo de armazenamento nas contagens de enterobactérias ($\log_{10}$ UFC/mL) em colostro fermentado sob condições anaeróbicas e armazenado em diferentes temperaturas ambientais.....	102
Figura 4.7	- Efeito do tempo de armazenamento nas contagens de leveduras ($\log_{10}$ UFC/mL) em colostro fermentado sob condições anaeróbicas e armazenado em diferentes temperaturas ambientais.....	104
Figura 4.8	- Efeito do tempo de armazenamento nas concentrações de lactose (%) em colostro fermentado sob condições anaeróbicas e armazenado em diferentes temperaturas ambientais.....	106
Figura 4.9	- Efeito do tempo de armazenamento nas concentrações de proteína bruta (%) em colostro fermentado sob condições anaeróbicas e armazenado em diferentes temperaturas ambientais.....	108
Figura 4.10	- Efeito do tempo de armazenamento nas concentrações de caseína (%) em colostro fermentado sob condições anaeróbicas e armazenado em diferentes temperaturas ambientais.....	109

Figura 4.11	- Efeito do tempo de armazenamento nas concentrações de NNP (%NT) em colostro fermentado sob condições anaeróbicas e armazenado em diferentes temperaturas ambientais.....	111
Figura 4.12	- Efeito do tempo de armazenamento nas concentrações de gordura (%) em colostro fermentado sob condições anaeróbicas e armazenado em diferentes temperaturas ambientais.....	112
Figura 5.1	- Consumo de concentrado (kg/dia), de acordo com a idade, por bezerros recebendo sucedâneo lácteo ou silagem de colostro.....	134
Figura 5.2	- Ganho de peso diário (kg/dia), de acordo com a idade, de bezerros recebendo sucedâneo lácteo ou silagem de colostro.....	136
Figura 5.3	- Peso vivo (kg), de acordo com a idade, de bezerros recebendo sucedâneo lácteo ou silagem de colostro.....	138
Figura 5.4	- Medidas de perímetro torácico (1), altura na cernelha (2) e largura da garupa (3), de acordo com a idade, de bezerros recebendo sucedâneo lácteo ou silagem de colostro.....	140
Figura 5.5	- Escore fecal (sendo 1 = fezes normais e 5 = diarreia severa) em bezerros recebendo de bezerros recebendo sucedâneo lácteo ou silagem de colostro.....	142
Figura 5.6	- Concentrações plasmáticas de β -hidroxibutirato (mmol/L), de acordo com a idade, de bezerros recebendo sucedâneo lácteo ou silagem de colostro.....	146
Figura 5.7	- Concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres (mmol/L), de acordo com a idade, de bezerros recebendo sucedâneo lácteo ou silagem de colostro.....	148
Figura 5.8	- Concentrações plasmáticas de nitrogênio uréico (mmol/L), de acordo com a idade, de bezerros recebendo sucedâneo lácteo ou silagem de colostro.....	149
Figura 5.9	- Concentrações plasmáticas de glicose (mmol/L), de acordo com a idade, de bezerros recebendo sucedâneo lácteo ou silagem de colostro.....	151
Figura 5.10	- Concentrações plasmáticas de proteínas totais (g/dL), de acordo com a idade, de bezerros recebendo sucedâneo lácteo ou silagem de colostro.....	153

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	- Exigência energética diária de bezerros alimentados apenas com leite ou substituto de leite.....	26
Tabela 2.2	- Efeito das taxas de ganho de peso nas exigências em proteína de bezerros em aleitamento.....	28
Tabela 2.3	- Composição nutricional e gravidade específica do colostro conforme ordenha pós-parto.....	32
Tabela 2.4	- Valores médios, mínimos e máximos observados para pH, acidez titulável e composição nutricional de colostro fermentado à temperatura ambiente e sob condições aeróbicas.....	38
Tabela 3.1	- Valores médios, mínimos e máximos de pH, acidez titulável, concentração de ácido láctico e temperatura observados em colostro fermentado sob condições anaeróbicas.....	58
Tabela 3.2	- Valores médios, mínimos e máximos observados de contagens totais de microrganismos em colostro fermentado sob condições anaeróbicas.....	63
Tabela 3.3	- Composição nutricional de colostro fermentado sob condições anaeróbicas.....	68
Tabela 4.1	- Valores médios, mínimos e máximos de pH, acidez titulável, concentração de ácido láctico e temperatura observados em colostro fermentado sob condições anaeróbicas e armazenado em diferentes temperaturas ambientais.....	92
Tabela 4.2	- Valores médios, mínimos e máximos observados de contagens totais de microrganismos em colostro fermentado sob condições anaeróbicas e armazenado em diferentes temperaturas ambientais.....	99
Tabela 4.3	- Composição nutricional de colostro fermentado sob condições anaeróbicas e armazenado em diferentes temperaturas ambientais.....	105

Tabela 5.1	- Composição químico-bromatológica da silagem de colostro, sucedâneo lácteo e concentrado inicial.....	131
Tabela 5.2	- Consumo de concentrado (kg/dia), peso vivo (kg) e ganho de peso diário (kg/dia) de bezerros recebendo sucedâneo lácteo ou silagem de colostro.....	133
Tabela 5.3	- Perímetro torácico, altura na cernelha e largura da garupa de bezerros recebendo sucedâneo lácteo ou silagem de colostro.....	139
Tabela 5.4	- Mortalidade, rejeição de dieta líquida e incidência de doenças em bezerros recebendo sucedâneo lácteo ou silagem de colostro.....	143
Tabela 5.5	- Concentrações plasmáticas de β -hidroxibutirato (β HBA), ácidos graxos livres (AGL), nitrogênio uréico (NUP), glicose e proteínas totais de bezerros recebendo sucedâneo lácteo ou silagem de colostro.....	145

1 INTRODUÇÃO

O leite é um dos componentes que mais onera o custo de criação de bezerras leiteiras. Dessa forma, o desaleitamento precoce ou a adoção de dieta líquida de baixo custo, como é o caso dos alimentos substitutos de leite, podem reduzir o custo final da bezerra desaleitada.

Durante as primeiras semanas de vida, o fornecimento de dieta líquida de qualidade é essencial para garantir desempenho satisfatório dos animais. Entretanto, são variadas as opções de alimentos disponíveis para o aleitamento, destacando-se o leite integral, o leite não comercializável (que inclui colostro, leite de transição e leite mamítico ou com resíduo de antibióticos), os sucedâneos ou substitutos do leite, ou ainda uma mistura de todos esses. No Brasil, embora não exista um levantamento oficial publicado, sabe-se que a maioria das fazendas utiliza o leite não comercializável, muitas vezes referido como leite descarte, para a alimentação das bezerras, além do colostro ou leite de transição diluído em água, quando disponível.

Ao longo dos últimos anos pesquisadores tem buscado avaliar sistemas e práticas de manejo de animais em aleitamento com o objetivo de reduzir o custo com a criação dos mesmos. Entretanto, a grande variedade de alimentos líquidos disponíveis resulta em variação nos resultados observados, principalmente em relação à sanidade, ao desempenho e à nutrição.

Entre as vantagens para a utilização de alimentos substitutos do leite, como colostro excedente, leite de transição ou sucedâneo comercial, destacam-se: a economia, devido ao menor preço quando comparado com o leite integral; a possibilidade de aumento na quantidade de leite a ser comercializada pelo produtor; a constância da composição nutricional da dieta líquida; e a independência do aleitamento com relação aos horários de ordenha.

Contudo, devido à limitada capacidade de digestão de fontes de nutrientes de origem vegetal pelos animais ruminantes durante as primeiras semanas de vida, a composição dessa dieta líquida merece especial importância. Os substitutos devem

resultar em adequada digestão e aproveitamento de nutrientes, e assim promover satisfatório crescimento e ganho de peso.

No caso do colostro ou do leite de transição excedentes, em algumas situações, a quantidade produzida pelas vacas recém paridas é superior ao total utilizado para o aleitamento diário dos bezerros havendo necessidade de armazenamento, o que pode se tornar um problema ao produtor. Além disso, produtores que avaliam a qualidade do colostro para armazenamento em banco de colostro podem obter grandes quantidades de colostro excedente com baixa concentração de imunoglobulinas. Uma vez que este colostro não é adequado para o fornecimento nas duas primeiras alimentações, passa a fazer parte do *pool* de colostro excedente, aumentando também a quantidade de alimento disponível.

O melhor método de conservação do volume de dieta líquida excedente é sem dúvida o congelamento ou até mesmo a refrigeração. No entanto, nem sempre existe freezer ou espaço disponível no freezer utilizado para o banco de colostro para o congelamento de grandes volumes de colostro ou leite de transição. Assim, a fermentação de colostro se torna um método eficiente para seu armazenamento à temperatura ambiente e fornecimento futuro.

Nos últimos anos vem aumentando o interesse em armazenar colostro excedente através da fermentação anaeróbia, principalmente por produtores da região Sul do Brasil. Devido ao tipo de fermentação ao qual o colostro é submetido, este produto passou a ser chamado de silagem de colostro, porém, ainda não existem dados publicados no que diz respeito à qualidade nutricional sobre seu fornecimento para animais durante a fase de aleitamento e efeitos no desempenho e alterações de parâmetros metabólicos.

O objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil de fermentação de colostro bovino, realizada em ambiente anaeróbio e determinar seu valor nutritivo, assim como avaliar o desempenho de bezerros leiteiros recebendo silagem de colostro como dieta líquida exclusiva.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Exigências nutricionais de bezerros em aleitamento

A compreensão das exigências nutricionais de bezerros em fase de aleitamento somente é possível com o conhecimento da anatomia e, principalmente, da fisiologia desses animais durante esse período.

Durante as primeiras semanas de vida, a fisiologia digestiva básica de bezerros é semelhante à observada em animais monogástricos. Nessa fase, quando o animal é denominado pré-ruminante, a digestão e o metabolismo são semelhantes aos de animais não-ruminantes em muitos aspectos, sendo as necessidades dietéticas melhor satisfeitas com dietas líquidas de alta qualidade. O período mais crítico são as primeiras 2-3 semanas de vida, período no qual o sistema digestivo do bezerro é imaturo, porém em rápido desenvolvimento (BEHARKA et al., 1998). O abomaso é o compartimento predominante, correspondendo a mais de 50% do trato digestório superior dos animais (CHURCH, 1983), mas com o consumo de dieta sólida o rúmen passa a ser o órgão importante nos processos de utilização dos alimentos. Assim, as bezerras devem ser encorajadas a consumir alimentos secos desde a idade mais precoce para estimular o crescimento de papilas, a vascularização, o desenvolvimento funcional do rúmen, assim como sua habilidade em absorver e metabolizar os ácidos graxos de cadeia curta produzidos durante a fermentação ruminal (WARNER; FLATT; LOOSLI, 1956; CHURCH, 1988).

De acordo com Toullec e Guilloteau (1989), durante pelos menos as três primeiras semanas de vida, a renina (ou quimosina) e a lactase são as enzimas digestivas que apresentam maior atividade no trato gastrointestinal dos bezerros. A renina é a enzima responsável pela coagulação do leite no abomaso dos animais, o que permite uma maior permanência do coágulo no trato, colaborando para melhor digestão e, conseqüentemente, maior aproveitamento das proteínas lácteas. As proteínas vegetais, por não sofrerem ação dessa enzima, não podem ser aproveitadas pelos animais durante os primeiros dias de vida, corroborando os resultados de baixo

desempenho observados quando substitutos de leite à base de vegetais são fornecidos aos animais.

Além da limitação enzimática em relação a proteases, durante esta fase os animais apresentam baixa atividade das enzimas amilase e maltase, sendo a lactase a principal carboidrase encontrada no sistema digestório. De acordo com Toullec e Guilloteau (1989), em um curto período de tempo, a atividade dessas enzimas triplica, enquanto que a atividade da lactase decresce à metade.

Pesquisas sugerem que uma grande variedade de alimentos líquidos podem ser fornecidos às bezerras em aleitamento em substituição ao leite. Porém, a limitação enzimática observada nos animais até a terceira semana reduz o leque de opções como dieta líquida adequada, fazendo do leite integral o alimento que apresenta melhor digestibilidade e, portanto, maior ganho de peso durante essa fase (NOLLER et al., 1956).

Dessa forma, a última edição do National Research Council para gado leiteiro (NRC, 2001) divide as exigências nutricionais de bezerros em três fases de desenvolvimento relacionadas com a função digestiva: 1) Fase da alimentação líquida: quando toda ou praticamente toda a exigência nutricional é satisfeita pelo leite ou por substitutos de leite; 2) Fase de transição: tanto a dieta líquida quanto o concentrado contribuem para a satisfação das necessidades nutricionais dos bezerros; 3) Fase ruminante: o bezerro obtém seus nutrientes a partir de alimentos sólidos, principalmente através da fermentação microbiana no retículo-rúmen.

Nesse sistema, as exigências para energia e proteína são estabelecidas em função do peso vivo e da taxa de ganho de peso. Assim, as necessidades para manutenção são apresentadas e os nutrientes que excedem essa necessidade básica são considerados disponíveis para o crescimento.

O National Research Council em sua publicação mais recente sobre exigências nutricionais para bovinos leiteiros (NRC, 2001) estabeleceu as exigências energéticas para bezerros jovens em termos de energia metabolizável (EM), que é obtida da subtração das perdas energéticas nas fezes, gases e urina do total de energia consumida. Porém, no caso de bezerros em aleitamento, as perdas por gases são ignoradas e não são adicionadas aos cálculos (DRACKLEY; Van AMBURGH, 2005).

De acordo com o NRC (2001), o valor de EM é fixado em $0,086 \text{ Mcal/kg}^{0.75}$ de peso vivo (PV) por dia e a eficiência de utilização de energia metabolizável (EM) a partir de leite ou substitutos de leite para satisfazer as exigências de manutenção é fixada em 86%. A energia de manutenção é definida como $0,100 \text{ Mcal/kg}^{0.75}$ por dia, assumindo que o bezerro se encontra em condições de termoneutralidade.

Os cálculos das exigências em energia metabolizável para bezerros apresentados pelos NRC (2001) foram obtidos de acordo com a equação (1) derivada de Toullec (1989):

$$(1) \text{ Exigência EM (Mcal/d)} = 0,1 \text{ PV}^{0,75} + (0,84 \text{ PV}^{0,355}) (\text{GPD}^{1,2}),$$

Onde, PV e ganho de peso diário (GPD) são expressos em quilogramas (kg).

A primeira parte da equação define a EM necessária para a manutenção de $100 \text{ kcal/kg}^{0.75}$ por dia. A segunda parcela da equação é utilizada para estimar a EM exigida para o GPD, que é uma função do tamanho corporal (PV) e da taxa de ganho de peso diário (GPD). Esta equação foi derivada com base em eficiência de conversão de EM para EL_G de 69% para bezerros alimentados apenas com leite ou substitutos de leite, o que é consistente com a maioria dos valores publicados.

As exigências em EM indicadas na Tabela 2.1 mostram resultados obtidos a partir da equação de Toullec (1989) para bezerros pesando entre 25-50 kg e com diferentes taxas de ganho. Segundo o NRC (2001), os valores de energia digestível (ED) são calculados a partir da EM, assumindo uma eficiência de 96% para a conversão da ED em EM.

Os resultados apresentados na Tabela 2.1 deixam claro que as quantidades de energia necessárias para a manutenção e ganho de peso dos animais não são fixas e variam de acordo com o peso corporal e o ganho de peso diário pretendido. De acordo com Drackley e Van Amburgh (2005), as equações do NRC (2001) mostram que se o objetivo for o rápido crescimento, maior quantidade de leite ou substituto de leite tem que ser fornecida aos animais.

Tabela 2.1 - Exigência energética diária de bezerros alimentados apenas com leite ou substituto de leite

Peso vivo(kg)	Ganho(kg)	Consumo de MS (kg)	EL_m (Mcal)	EL_g (Mcal)	EM (Mcal)	ED (Mcal)
25	0	0,24	0,96	0	1,12	1,17
	200	0,32	0,96	0,26	1,50	1,56
	400	0,42	0,96	0,60	2,00	2,08
30	0	0,27	1,10	0	1,28	1,34
	200	0,36	1,10	0,28	1,69	1,76
	400	0,47	1,10	0,65	2,22	2,31
40	0	0,34	1,37	0	1,59	1,66
	200	0,43	1,37	0,31	2,04	2,13
	300	0,49	1,37	0,51	2,32	2,42
	400	0,55	1,37	0,72	2,63	2,74
	600	0,69	1,37	1,16	3,28	3,41
45	0	0,37	1,49	0	1,74	1,81
	200	0,46	1,49	0,32	2,21	2,30
	600	0,59	1,49	0,75	2,82	2,94
	400	0,74	1,49	1,21	3,50	3,64
50	0	0,40	1,62	0	1,88	1,96
	200	0,45	1,62	0,34	2,37	2,47
	300	0,56	1,62	0,55	2,67	2,79
	400	0,63	1,62	0,77	3,00	3,13
	600	0,78	1,62	1,26	3,70	3,86
	900	1,02	1,62	2,05	4,85	5,05

(Adaptado do NRC, 2001)

*Consumo de MS necessária para satisfazer exigências em EM para bezerros alimentados com substitutos de leite composto principalmente de proteínas de leite e contendo em 4,75 Mcal EM/ kg de MS.

Também, é importante salientar que a exigência de EM para a manutenção pode ser subestimada para bezerros durante as primeiras semanas de vida devido à elevada taxa metabólica basal e outras variáveis observadas durante este período. Como o

aparelho digestivo é imaturo e tem desenvolvimento rápido, o metabolismo da dieta pode ser menor durante este período, superestimando assim o valor energético da dieta. O saldo líquido resultado destes efeitos é que o GPD dos bezerros durante as primeiras semanas de vida pode ser consideravelmente inferior ao predito e apresentado na Tabela 2.1.

Em um bom sistema de produção leiteira, os bezerros devem ser estimulados a consumir alimentos sólidos desde a segunda semana de vida. Para incentivar o consumo precoce de concentrado inicial, os animais devem ter livre acesso à água e concentrado de alto valor nutritivo altamente palatável desde a primeira semana de vida até o desaleitamento. O consumo de concentrado inicial é fundamental para o desenvolvimento do rúmen.

Portanto, apesar da exigência energética de bezerros alimentados exclusivamente com leite ou substituto de leite ser importante, o conhecimento das necessidades energéticas de animais com uma dieta combinada (dieta líquida + dieta sólida) também é fundamental.

Segundo o NRC (2001), devido à baixa capacidade digestiva dos animais, com o rúmen em desenvolvimento e pouco funcional, a eficiência de utilização de EM para a manutenção e ganho será menor para concentrado inicial do que para a dieta líquida, sendo adotados os valores fixos de 75 e 57% para eficiência de utilização de EM para manutenção e ganho, respectivamente.

Assim, a eficiência de utilização de EM da dieta total é calculada como a média de cada uma das eficiências de utilização da dieta líquida e sólida, ponderada de acordo com a sua contribuição ao total de EM da dieta.

Portanto, nesse caso, assumindo-se que um bezerro com cerca de 2 semanas de idade consome em média uma dieta na qual 60% da MS é derivada da dieta líquida (EM = 4,75 Mcal/kg de MS no caso de sucedâneo lácteo) e 40% de concentrado (EM = 3,28 Mcal/kg de MS), o substituto de leite fornece 68% do total de EM e o concentrado os 32% restantes. Assim, o balanço global das eficiências de utilização de energia metabolizável (EM) na dieta (substituto de leite + concentrado) é de 82,5 e 65,2% para a manutenção e ganho, respectivamente, calculado com base na ponderação média (ponderada pela contribuição ao total de EM da dieta).

A exigência protéica de bezerros está intimamente relacionada com a taxa de crescimento. Isso porque a exigência para manutenção é bastante pequena, apenas 8,3% de proteína bruta (PB), que é suprida completamente pela alimentação líquida, seja leite integral ou substituto de leite de boa formulação (Tabela 2.2).

O National Research Council (NRC, 2001) afirma que são necessários cerca de 18% de PB para prover uma pequena taxa de ganho de aproximadamente 0,2 kg por dia. Conseqüentemente, a quantidade de PB exigida pelo bezerro aumenta à medida que a disponibilidade energética aumenta, assim como as taxas de ganho. Entretanto, segundo Drackley e Van Amburgh (2005), as respostas com aumentos na concentração protéica da dieta líquida parecem atingir um *plateau* por volta de 28% de PB, concentração bastante próxima da proteína do leite, que é de aproximadamente 26% na matéria seca.

Tabela 2.2 – Efeito das taxas de ganho de peso nas exigências em proteína para bezerros em aleitamento

Taxa de ganho, kg/dia	Consumo de MS, % PV	EM, Mcal/d	PB, g/d	PB, % MS da dieta
0	0,38	1,7	28	8,3
0,200	1,05	2,34	94	18,0
0,400	1,30	2,89	150	22,4
0,600	1,57	3,49	207	26,6
0,800	1,84	4,40	253	27,4
1,0	2,30	4,80	318	28,6

Adaptado de Davis e Drackley (1998)

2.2 Dieta líquida para animais em aleitamento

O papel da nutrição e o atendimento às exigências em proteína e energia durante o período de aleitamento são de fundamental importância para garantir a sobrevivência e desempenho adequado dos animais. Isso porque durante as primeiras duas a três semanas de vida o sistema digestivo dos bezerros é imaturo e com

capacidade para digerir somente os nutrientes oriundos do leite materno de maneira eficiente. Assim, é de se esperar que o leite integral seja o alimento líquido que apresenta os melhores resultados de desempenho, suprimindo as exigências energéticas e protéicas dos animais (CHESTER-JONES; HOFFMAN, 2003).

Segundo levantamento publicado por Heinrichs, Wells e Losinger (1995), nas fazendas norte-americanas, cerca de 52% dos produtores fornecem colostro excedente ou leite de transição diluídos em água como fonte de dieta líquida aos animais em aleitamento, seguido do leite integral (32,7%) e do leite descarte (34%), além dos sucedâneos lácteos comerciais (59%). Os autores destacam que o somatório das porcentagens obviamente não totaliza 100%, isso porque durante as entrevistas para o levantamento, quase que a totalidade dos produtores afirmou que utilizam mais que um tipo de dieta líquida, variando de acordo com a disponibilidade no momento do fornecimento.

2.2.1 Sucedâneos lácteos

De acordo com revisão apresentada por Otterby e Linn (1981), os primeiros produtos chamados de substitutos de leite foram desenvolvidos na década de 50. Esses produtos eram basicamente subprodutos da indústria leiteira adicionados de farelos de trigo, aveia e óleos vegetais. Entretanto, os produtos desenvolvidos nesta época, apesar de representarem economia na criação dos animais, não resultavam em boas taxas de ganho de peso. O baixo desempenho era explicado, principalmente, devido à falta de tecnologia para incorporação da gordura, que resultava em diarreia nos animais, bem como na utilização de fontes vegetais (NOLLER et al., 1956). Tendo em vista os resultados insatisfatórios com a utilização de sucedâneos na alimentação dos bezerros, nas décadas de 60 e 70 um grande número de trabalhos científicos foi desenvolvido, com o objetivo de se encontrar a fonte dos problemas digestivos observados e substitutos a ingredientes tradicionais, como o leite desnatado.

De maneira geral, trabalhos comparando o fornecimento de sucedâneo com leite integral para bezerros em aleitamento apresentam variação entre os resultados, dependente, principalmente da qualidade do produto utilizado. Lynch, Pike e Bond

(1978) não observaram diferenças no desempenho de bezerros consumindo leite integral ou sucedâneo. Neste trabalho, foi observada diferença somente no valor nutricional da proteína utilizada na fabricação do sucedâneo, apresentando deficiência em alguns aminoácidos essenciais. Da mesma forma, outros trabalhos como Silva et al. (2004) também não observaram diferenças no ganho de peso diário e no peso vivo de bezerros consumindo diferentes sucedâneos comerciais e leite integral, assim como Jenny, Van Dijk e Grimes (1982).

Por outro lado, Medina et al. (2002) observaram menor desempenho de animais desaleitados aos 49 dias de idade consumindo substituto de leite quando comparados com animais consumindo leite integral. Dados semelhantes foram obtidos por Meyer et al. (2001) que, embora tenham observado maior consumo de concentrado inicial por bezerros aleitados com sucedâneo com ou sem a adição de probiótico, verificaram menor peso vivo destes animais no momento do desaleitamento.

Dessa forma, pode-se observar que o efeito do fornecimento de sucedâneos no desempenho e também no consumo de concentrado pelos animais é variável e dependente de sua qualidade. De acordo com Otterby e Linn (1981), devido à grande variação na composição nutricional destes alimentos, os resultados com o seu uso são inconsistentes, mostrando grande variação entre os trabalhos.

Considerada como a principal responsável na variação nos dados de desempenho, as fontes protéicas utilizadas na fabricação de sucedâneos podem ser classificadas como fontes de origem láctea e de origem não-láctea. Tradicionalmente, os sucedâneos comercializados no mercado apresentam entre 18 e 24% de proteína bruta (PB) na sua composição final, sendo o recomendado pelo NRC (2001) valores próximos a 20-22%.

Entre as fontes de origem láctea, o leite desnatado, o soro de leite e a proteína isolada do soro de leite são os ingredientes mais comuns encontrados na maioria das formulações e são os que apresentam os melhores resultados em desempenho (MORRIL et al., 1971; DAVIS; DRACKLEY, 1998).

Segundo Davis e Drackley (1998), apesar de apresentarem menor custo quando comparados aos produtos de origem láctea, algumas proteínas vegetais como a proteína de soja podem apresentar alguns fatores anti-nutricionais. Inibidores de

proteases, presença de carboidratos indigestíveis, taninos e compostos fenólicos são alguns destes fatores anti-nutricionais que podem causar decréscimo na digestão de proteínas, inibição da secreção de enzimas, além de diarreias.

A lactose é o principal carboidrato encontrado em sucedâneos comerciais. Embora represente custo mais elevado em relação a outras fontes como o amido, o fator principal que justifica sua utilização está relacionada à limitação enzimática dos animais durante as três primeiras semanas de vida (OTTERBY; LINN, 1981). Dessa forma, a adição de fontes vegetais como substitutos da lactose é restrita, e pesquisas relacionadas com o tema geralmente são mais escassas quando comparadas com pesquisas em relação a utilização de fontes protéicas.

A porcentagem e composição de gordura encontrada nos produtos comerciais é bastante variável, se encontrando entre 16 a 22% em produtos de melhor qualidade. Resultados com diferentes teores de gordura apresentam grande variação, sendo dependentes da fonte lipídica utilizada. Sem dúvida, a melhor fonte lipídica para incorporação aos sucedâneos seria a gordura do leite, entretanto, devido a seu alto valor comercial, esta é totalmente substituída nos produtos comerciais.

2.2.2 Colostro excedente e leite de transição

O colostro é considerado um alimento essencial a recém-nascidos, com características nutricionais importantes para o desenvolvimento nos primeiros dias de vida, além dos efeitos esperados quanto à transferência de imunidade passiva.

Embora seja uma prática comum atualmente, os primeiros trabalhos de pesquisa avaliando os efeitos do fornecimento de colostro como dieta líquida no crescimento de bezerros em aleitamento foram desenvolvidos no início da década de 70 (SWANNACK, 1971). Estes trabalhos iniciais trataram de temas relacionados à quantidade para fornecimento, diluição e, principalmente, formas armazenamento de grandes volumes dessa dieta líquida.

Basicamente, a adoção do colostro ou do leite de transição como dieta líquida segue recomendações sobre a necessidade de diluição em água devido à maior

concentração de gordura e outros sólidos observados e que podem comprometer o desenvolvimento dos animais (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 - Composição nutricional e gravidade específica do colostro e do leite de transição conforme ordenhas pós-parto

Item	Ordenha pós-parto						Leite
	1	2	3	4	5	6	
Gravidade específica	1,056	1,040	1,035	1,033	1,033	...	1,032
pH	6,32	6,32	6,33	6,34	6,33	...	6,50
Sólidos totais (%)	23,9	17,9	14,1	13,9	13,6	...	12,9
Gordura (%)	6,7	5,4	3,9	4,4	4,3	...	4,0
Proteínas totais (%)	14,0	8,4	5,1	4,2	4,1	...	3,1
Caseína (%)	4,8	4,3	3,8	3,2	2,9	2,9	2,5
Albumina (%)	0,9	1,1	0,9	0,7	0,4	0,4	0,5
Imunoglobulinas (%)	6,0	4,2	2,4	...	...	...	0,09
IgG (g/100mL)	3,2	2,5	1,5	...	...	...	0,06
NNP (% N total)	8,0	7,0	8,3	4,1	3,9	4,0	4,9
Lactose (%)	2,7	3,9	4,4	4,6	4,7	...	5,0
Cinzas (%)	1,11	0,95	0,87	0,82	0,81	...	0,74

(Adaptado de Foley e Otterby, 1978)

O estudo clássico desenvolvido por Jenny, Mills e O'Dell (1976) comparou o desempenho de bezerros alimentados com colostro ou leite de transição excedentes diluídos em diferentes proporções em água morna. Os resultados apontaram que, quando o colostro foi fornecido sem diluição, o desempenho dos animais foi comprometido, com aumento de incidência de diarreia, provavelmente pelo maior teor de gordura da dieta líquida. Contudo, a diluição do colostro em água na proporção 2:1 (colostro:água), apresentou os melhores resultados, com taxas de ganho de peso semelhantes aos animais alimentados com leite integral. Em estudo semelhante, Rindsig (1976) também observou que a diluição do colostro em água na proporção 2:1 apresentou os melhores resultados.

A composição nutricional do colostro (considerando também, quando se utiliza o termo “colostro”, a secreção láctea colhida de vacas até três dias pós-parto, ou seja, o “leite de transição”) apresentada na Tabela 2.3 mostra a grande variação de acordo com o tempo (poucos dias ou horas). Estas alterações são mais intensas no que se refere à fração protéica, representada principalmente pelas imunoglobulinas, que decrescem ao longo do tempo. Da mesma forma, gorduras, sólidos totais, lactose e cinzas variam de acordo com o tempo pós-parto.

A produção média de colostro ou leite de transição de uma vaca leiteira de alta produção geralmente excede o total utilizado para a alimentação do bezerro recém-nascido. Com médias de produção variando entre 24-32,7 kg para primíparas e entre 39-52 kg para múltíparas (YU; STONE; WILSON, 1976), estudos sobre métodos de conservação foram desenvolvidos para o armazenamento dessa dieta líquida da maneira mais econômica, sem comprometimento da qualidade nutricional. Dentre os métodos possíveis para conservação do colostro, destacam-se o resfriamento ou o congelamento, além da fermentação aeróbica ou anaeróbica, com conservação à temperatura ambiente.

2.2.2.1 Armazenamento do colostro excedente

Durante muitos anos, pesquisadores estudaram maneiras de armazenamento do colostro excedente sem que alterações na sua composição nutricional ou sua aceitabilidade e aproveitamento pelos animais fossem comprometidos.

Neste aspecto, métodos de conservação a frio como o congelamento ou até mesmo a refrigeração mostraram-se sempre eficientes.

De acordo com Foley e Otterby (1979), o congelamento do colostro não altera a sua composição nutricional e permite o armazenamento por tempo indeterminado. Além disso, Carlson e Muller (1977) reportam que quando congelado, o colostro não apresenta variações no pH, na acidez ou nos principais sólidos totais, como a lactose, a caseína e gordura. No entanto, existem recomendações técnicas de se armazenar

colostro congelado por no máximo um ano para que sua função como veículo de imunoglobulinas seja mantida.

Por outro lado, embora estudos com o congelamento do colostro ou do leite de transição tenham apresentado bons resultados, métodos de conservação de colostro excedente à temperatura ambiente foram extensivamente estudados durante as décadas de 70 e 80, com pesquisas sobre os processos fermentativos, dinâmica nutricional e desempenho de animais (OTTERBY; JOHNSON; POLZIN, 1976; POLZIN; OTTERBY; JOHNSON, 1977; CARLSON; MULLER, 1977; DANIELS et al., 1977; FOLEY; OTTERBY, 1979).

Esses pesquisadores estudaram o fornecimento de colostro fermentado em baldes ou contêineres revestidos de sacos plásticos, os quais eram vedados para que a fermentação fosse possível. Em todos os casos, o colostro era fermentado e armazenado por até quatro semanas e então fornecido para bezerros em várias refeições.

A fermentação natural do colostro, embora seja um método eficaz de armazenamento, sem necessidade de investimentos em equipamentos como refrigeradores e freezers, pode resultar em um produto final com composição bastante variável, principalmente quando realizada em locais ou épocas do ano de clima quente. Nesse caso, apesar do processo fermentativo ocorrer adequadamente, com declínio do pH e aumento da concentração de ácido láctico, fundamentais para conservação à temperatura ambiente, a elevada acidez, por exemplo, pode resultar em recusa de consumo pelos animais (MULLER; LUDENS; ROOK, 1976; RINDSIG, 1976). Também, alterações nas características físicas e, principalmente, nos constituintes do colostro, são observadas com grande intensidade (FOLEY; OTTERBY, 1978).

O processo de fermentação depende basicamente de bactérias lácticas, naturalmente presentes no leite como contaminantes, que crescem e produzem ácido láctico necessário para a conservação (WOUNTERS et al., 2002). Em várias situações as bactérias lácticas estão acompanhadas de outros microrganismos, como as enterobactérias, leveduras e mofos, que podem alterar de forma negativa o processo e principalmente o tempo de armazenamento.

Durante a fermentação, a lactose é quebrada em galactose e glicose por uma β -glucosidase. A glicose é fermentada a ácido láctico assim como a galactose, a qual é convertida à UDP-glicose e depois à glicose-6P, que então é fermentada até ácido láctico (Figura 2.1; ZOURARI; ACCOLAS; DESMAZEAUD, 1992). Alguns alcoóis, principalmente etanol também podem ser produzidos durante o processo de fermentação de leite pela ação de leveduras como *Saccharomyces* e *Cândida* (GÜZEL-SEYDIM et al., 2000), o que reduz o valor nutritivo do colostro fermentado.

Figura 2.1 - Possíveis rotas metabólicas para fermentação de lactose e galactose por bactérias lácticas (Adaptado de Zourari, Accolas e Desmazeaud, 1992)

A população microbiana presente no colostro e em outros produtos lácteos é variável e dependente dos cuidados pré ou no período após a ordenha, muitas vezes é realizada em recipientes sujos e contaminados. De maneira geral, embora o colostro apresente bactérias, leveduras e mofos naturalmente, os cuidados com a higiene são essenciais para evitar problemas durante a fermentação. Além disso, como cada microrganismo tem um ambiente e temperatura favorável ao seu crescimento, o local onde o colostro será armazenado para fermentação deve ser fresco e ventilado, com temperatura inferior a 25°C, já que a maioria desses microrganismos indesejáveis tem seu crescimento acelerado em ambiente com temperaturas acima dos 30°C (FOLEY; OTTERBY, 1978).

Rindsig, Janecke e Bodoh (1977) avaliaram o desenvolvimento microbiológico em colostro fermentado em condições de clima quente (37°C) e ameno (21°C) e observaram maiores contagens totais de bactérias quando o colostro foi armazenado sob maior temperatura. Nesse trabalho, embora leveduras e fungos tenham apresentado crescimento discreto durante os primeiros dias de fermentação, após 21 dias o crescimento desses microrganismos foi mais acelerado.

Muller e Syhre (1975) observaram maior degradação de proteína durante a fermentação realizada durante o verão, o que reduziu o valor nutritivo do alimento. Resultados semelhantes foram obtidos por Jenny, O'Dell e Johnson (1977) e Palm e Mudd (1972) em experimentos semelhantes e corroboram as recomendações de Foley e Otterby (1978), o que mostra que em grande parte do Brasil seria necessário o uso de um refrigerador.

O grupo de microrganismos que apresenta maior desenvolvimento logo nos primeiros dias de fermentação é o das bactérias ácido-láticas que são divididas em dois grupos, de acordo com seu crescimento ótimo.

As bactérias mesofílicas apresentam crescimento ótimo entre 20-30°C enquanto as termofílicas entre 30-45 °C (WOUNTERS et al., 2002), sendo as últimas as prováveis bactérias responsáveis pela fermentação de colostro nas condições brasileiras.

De acordo com a revisão de Wounters et al. (2002), as duas bactérias termofílicas mais freqüentes na fermentação de leite cru são as *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e a *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*,

normalmente chamadas de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*, respectivamente. As bactérias *L. bulgaricus* são exclusivamente isoladas de ambientes de produção de leite e fermentam somente alguns carboidratos como lactose, sucrose, glicose e algumas vezes galactose, sendo caracterizada por sua alta temperatura de crescimento que pode chegar a 50-52 °C. As bactérias *S. thermophilus* também fermentam poucos carboidratos (glicose, lactose, frutose, e algumas vezes galactose ou manose), e possuem alta temperatura de crescimento (48 a 50 °C).

Estudo com o isolamento de microrganismos apresentado por Jenny, O'Dell e Johnson (1977) mostrou que, quando o colostro é fermentado em temperaturas mais elevadas (20-27°C), cerca de 30% do total de bactérias ácido-láticas encontradas foram do gênero *Lactobacillus*. Por outro lado, quando a temperatura do local de armazenamento do colostro foi menor, somente 7% do total de bactérias ácido-láticas encontradas eram desse gênero.

Além do grupo de bactérias ácido-láticas, consideradas benéficas para conservação do colostro, outros microrganismos potencialmente patogênicos podem ser encontrados na maioria das amostras.

Stewart et al. (2005) reportam que bactérias patogênicas como a *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e a *Escherichia coli* são transmitidas para o colostro ou o leite pelo contato direto com o úbere contaminado e são responsáveis pela maioria dos casos de septicemia ou diarreia observados em bezerros nas primeiras semanas de vida.

Segundo Christen et al. (1992), esse grupo de microrganismos tem desenvolvimento rápido e são preferencialmente fermentadoras de lactose, com grande produção de ácidos e gases, principalmente em condições de temperatura entre 32° a 35°C. Portanto, como a quantidade de substrato disponível (lactose) no colostro é abundante, principalmente nos primeiros dias de armazenamento, o desenvolvimento acelerado dessas enterobactérias e coliformes é observado na maioria dos trabalhos de pesquisa (RINDSIG; JANECKE; BODOH, 1977; MULLER; SMALLCOMB, 1977; JENNY; O'DELL; JOHNSON, 1977).

Por outro lado, apesar do rápido aumento nas contagens totais desses microrganismos nas primeiras semanas de fermentação, sua população é reduzida em

consequência do declínio do pH a valores abaixo de 4,0. Isso ocorre porque a maioria das enterobactérias não tolera ambientes muito ácidos (CHRISTEN et al., 1992).

O intenso desenvolvimento microbiano observado leva a modificações importantes nos componentes nutricionais durante o processo fermentativo. Alterações no pH, acidez e redução nas concentrações de lactose e caseína são observadas e reportadas por diversos autores (Tabela 2.4; MULLER; SYHRE, 1975; OTTERBY, JOHNSON; POLZIN, 1976; CARLSON; MULLER, 1977; DANIELS et al., 1977).

Tabela 2.4 – Valores médios, mínimos e máximos observados para o pH, acidez titulável e composição nutricional de colostro fermentado à temperatura ambiente e sob condições aeróbicas

Item, %	Média	Intervalo
		(Mínimo – Máximo)
pH	4,5	4,1 – 4,8
Acidez titulável	1,4	0,9 – 3,1
Sólidos totais	14,9	13,1 – 17,2
Proteína bruta	5,6	4,5 – 6,8
Nitrogênio não-protéico, % do NT	---	9 – 23
Gordura	4,8	3,8 – 7,2

(Adaptado de Foley e Otterby, 1978)

O colostro fermentado naturalmente apresenta declínio do pH de valores iniciais entre 5,8 a 6,8 para valores próximos de 4,5 em poucos dias de fermentação, chegando a valores abaixo de 4,0 quando armazenado por períodos prolongados.

Muller e Syhre (1975) e Rindsig, Janecke e Bodoh (1977) observaram rápida redução do pH quando colostro foi fermentado sob temperaturas acima de 25°C. Segundo os autores, o rápido desenvolvimento de bactérias ácido-láticas foi o principal responsável por esses valores.

Bush, McQueen e Nicholson (1981) estudaram as alterações químicas no colostro bovino fermentado, após inoculação com cultura iniciadora para produção de iogurte ou com *Streptococcus lactis*, e demonstraram rápido decréscimo no pH nos

primeiros 8 dias de avaliação seguido de pequeno acréscimo a partir do 12º dia. No entanto, para colostro inoculado com *S. lactis*, o pH apresentou nova queda após o 16º dia de fermentação. A queda no pH acompanhou a redução na concentração de lactose e aumentos na concentração de ácido láctico e acidez titulável. Houve produção de ácidos graxos de cadeia curta, sendo o ácido butírico o de maior concentração. A produção de ácidos é resultado do metabolismo de lactose, a qual teve no 24º dia de fermentação, apenas 20% da concentração inicial.

Outros autores também reportam redução significativa das concentrações de lactose em consequência do crescimento microbiano durante a fermentação (YU; STONE; WILSON, 1976; FOLEY; OTTERBY, 1978). Entretanto, embora a lactose seja a única fonte de carboidrato presente no colostro e, portanto, essencial para suprir as exigências energéticas dos animais, poucos trabalhos com colostro fermentado encontrados na literatura apresentam os resultados dessa fração.

A fração protéica também sofre grandes alterações ao longo da fermentação do colostro. Com poucos dias de armazenamento à temperatura ambiente acima de 30°C, a concentração de nitrogênio não-protéico aumenta a valores próximos de 35% do nitrogênio total (MULLER; SMALLCOMB, 1977; OTTERBY; DUTTON; FOLEY, 1977). Incrementos nas concentrações de nitrogênio não-protéico são reportados em todos os trabalhos com colostro fermentado e sugerem intensa proteólise durante a fermentação (MULLER; LUDENS; ROOK, 1976; OTTERBY; JOHNSON; POLZIN, 1976; RINDSIG; BODOH, 1977; RINDSIG; JANECKE; BODOH, 1977).

Os aumentos observados nas concentrações de nitrogênio não-protéico são consequência direta do metabolismo da caseína presente no colostro pelos microrganismos. Foley, Hunter e Otterby (1978) reportam redução significativa da caseína durante o processo fermentativo, assim como Polzin, Otterby e Johnson (1976).

Alterações na fração protéica de colostro fermentado indicam que o seu fornecimento como dieta líquida exclusiva pode não atender as exigências em proteína dos animais durante a fase de aleitamento e possivelmente comprometer o desempenho dos animais.

Embora existam muitos dados de literatura relativos à composição da gordura do leite (JENSEN, 2002), a composição em ácidos graxos totais no colostro é escassa. No

entanto, no caso de processos de fermentação, a composição da gordura do leite é de grande importância já que esta fração representa grande participação nos sólidos totais e possivelmente no atendimento às exigências energéticas dos animais alimentados com essa dieta líquida.

De acordo com Foley e Otterby (1978), a porcentagem de gordura varia entre 3,8 e 7,2% no colostro, com reduções na sua concentração ao longo das ordenhas pós-parto (Tabela 2.4). Apesar da intensa metabolização das outras frações presentes nos sólidos totais do colostro, como a lactose e a caseína, a maioria dos trabalhos de pesquisa indica estabilidade da gordura (YU; STONE; WILSON, 1976; RINDSIG; JANECKE; BODOH, 1977; MULLER; SMALLCOMB, 1977).

A utilização de colostro ou leite de transição fermentado resulta em grande variação diária na composição da dieta líquida, podendo resultar em variação nas taxas de ganho de peso e maior frequência de diarreia alimentar. No entanto, os produtores que fornecem esta dieta líquida não reportam aumento de casos de diarreia em seus bezerreiros. Ao contrário, reduções na frequência de diarreia são reportadas na literatura quando colostro fermentado é fornecido a bezerros em aleitamento (YU; STONE; WILSON, 1976; JENNY; MILLS; O'DELL; RINDSIG; JANECKE; BODOH, 1977)

O levantamento realizado pelo Sistema de Monitoramento Nacional de Saúde Animal dos Estados Unidos (NAHMS, 2003) mostra que embora esta prática fosse bastante popular nas décadas de 70 e 80, caiu em desuso devido ao aumento no trabalho relacionado com o armazenamento do material e necessidade de espaço físico para o mesmo. Assim, a maior parte dos produtores se utiliza tanto do colostro excedente quanto do leite de transição em combinação com leite descarte para o aleitamento de bezerros diariamente.

No entanto, o recente trabalho de Saalfeld (2008) mostra que soluções simples para alguns problemas, como o emprego de garrafas PET para o armazenamento de colostro, garantindo ausência completa de oxigênio, podem revalidar técnicas que permitem redução no custo de produção. Embora o estudo de Saalfeld (2008) não apresente dados sobre a dinâmica fermentativa, microbiológica e nutricional, a pesquisadora sugere através de observações visuais e suposições que o método

permite adequado padrão de fermentação, sem ocorrência de mofo ou fermentação putrefativa. Também, somente com dados de acompanhamento de fazendas que utilizam a técnica, desempenhos bastante satisfatórios foram reportados, permitindo assim a redução no custo com alimentação dos bezerros em aleitamento.

No entanto, não existem dados na literatura a respeito do perfil de fermentação deste material, assim como dados relativos a tempo de armazenamento, composição nutricional e desempenho de animais recebendo o colostro fermentado sob condições anaeróbicas como dieta líquida exclusiva.

Referências

BEHARKA, A.A.; NAGARAJA, T.G.; MORRILL, J.L.; KENNEDY, G.A.; KLEMM R.D. Effects of form of the diet on anatomical, microbial, and fermentative development of the rumen of neonatal calves. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 81, p. 1946-1955, 1998.

BUSH, R.S.; MCQUEEN, R.E.; NICHOLSON, J.W.G. Effect of fermentation and formalin preservation on the protein component of bovine colostrum. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.64, p.1695-1699, 1981.

CARLSON, S.M.A.; MULLER, L.D. Compositional and metabolic evaluation of colostrum preserved by four methods during warm ambient temperatures. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.60, p.566, 1977.

CHESTER-JONES, H.; HOFFMAN, P.C. Calf nutrition In: HOFFMAN, P.C.; PLOURD, R. **Raising dairy replacements**. Ames: Midwest Plan Service, 2003. 106p.

CHRISTEN, G.L.; DAVIDSON, P.M.; McALLISTER, J.S.; ROTH, L.A. Coliform and other indicator bacteria. In: MARSHALL, R.T. **Standard methods for the examination of dairy products**. Washington: American Public Health Association, 1992. p.247-269.

CHURCH, D.C. **Digestive physiology and nutrition of ruminants**. Corvallis: Prentice-Hall, 1983. v.1 316 p.

_____. **The ruminant animal: digestive physiology and nutrition**. New Jersey: Prentice-Hall, 1988. 564 p.

DRACKLEY, J.K.; Van AMBURGH, M.E. Nutrients requirements of the calf: Birth to weaning. In: DAIRY CALVES AND HEIFERS: INTEGRATING BIOLOGY AND MANAGEMENT, 2005, Harrisburg. **Proceedings...**, Syracuse: NRAES, 2005. p.86-95.

DANIELS, L.B.; HALL, J.R.; HORNSBY, Q.R.; COLLINS, J.A. Feeding naturally fermented, cultured, and direct acidified colostrum to dairy calves. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.60, p.992, 1977.

DAVIS, C.L.; DRACKLEY, J. K. **The development, nutrition, and management of the young calf**. Ames: Iowa State University Press, 1998. 339 p.

FOLEY, J.A.; OTTERBY, D.E. Performance of calves fed colostrum stored by freezing, fermentation, or treatment with lactic or adipic acid. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.62, p.459-467, 1979.

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

GÜZEL-SEYDIM, Z.B.; SEYDIM, A.C.; GREENE, A.K.; BODINE, A.B. Determination of organic acids and volatile flavor substances in kefir during fermentation. **Journal of Food Composition and Analysis**, Amsterdam, v.13, p.35-43, 2000.

HEINRICHS, A.J.; WELLS, S.J.; LOSINGER, W.C. A study of the use of milk replacers for dairy calves in the United States. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.78, p.2831– 2837, 1995.

JENNY, B.F.; O'DELL, G.D.; JOHNSON, M.G. Microbial and acidity changes in colostrum fermented by natural flora at low and high ambient temperatures. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.60, p.453, 1976.

JENNY, B.F.; MILLS, S.E.; O'DELL, G.D. Dilution rates of sour colostrum for dairy calves. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.60, p.942, 1976.

JENNY, B.F.; VAN DIJK, H.J.; GRIMES, L.W.J. Performance of calves fed milk replacer once daily at various fluid intakes and dry matter concentrations. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.65, p.2345-2350, 1982.

JENSEN, R.G. The Composition of Bovine Milk Lipids: January 1995 to December 2000. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.85, p.295-350, 2002.

LYNCH, G.P.; PIKE, T.L.; BOND, J. Nutritional responses of calves fed milk or a milk replacer. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.61, p.212– 220, 1978.

MEDINA, R.B.; LUDER, W.E.; FISCHER, V.; DA SILVA, C.A.S.; DA COSTA, C.O.; MORENO, C.B. Desaleitamento precoce de terneiros da raça holandês preto e branco utilizando sucedâneo do leite ou leite e concentrado farelado ou peletizado. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.8, p.61-65, 2002.

MEYER, P.M.; PIRES, A.V.; BAGALDO, A.R.; SIMAS, J.M.C. SUSIN, I. Adição de probiótico ao leite integral ou sucedâneo e desempenho de bezerros da raça holandesa. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.58, p.215-221, 2001.

MORRILL, J.L.; MELTON, S.L.; DAYTON, A.D.; GUY, E.J.; PALLANSCH, M.J. Evaluation of milk replacers containing a soy protein concentrate and high whey. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.54, p. 1060-1063, 1971.

MULLER, L.D.; SMALLCOMB, J. Laboratory evaluation of several chemicals for preservation of excess colostrum. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.60, p.627, 1977.

MULLER, L.D.; LUDENS, F.C.; ROOK, J.A. Performance of calves fed fermented colostrum or colostrum with additives during warm ambient temperatures **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.59, p.930-935, 1976.

MULLER, L.D.; SYHRE, D.R. Influence of chemicals and bacterial cultures on preservation of colostrum. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.58, p.957, 1974.

NATIONAL ANIMAL HEALTH MONITORING SYSTEM. **Changes in the United States dairy industry, 1991–2002**. Fort Collins: USDA, 2003. 56p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirement in dairy cattle**. 7th ed. Washington : National Academy of Science, 2001. 381p.

NOLLER, C.H.; WARD, G.M.; MCGILLIARD A.D.; HUFFMAN, C.F.; DUNCAN, C.W. The effect of age of the calf on the availability of nutrients in vegetable milk-replacer rations. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.39, p.1288-1291, 1956.

OTTERBY, D.E.; LINN, J.G. Advances in nutrition and management of calves and heifers. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.64, p. 1365-1377, 1981.

OTTERBY, D.E.; DUTTON, R.E.; FOLEY, J.A. Comparative fermentations of bovine colostrum milk. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.60, p.73, 1976.

OTTERBY, D.E.; JOHNSON, D.G.; POLZIN, H.W. Fermented colostrum or milk replacer for growing calves. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.59, p.2001, 1976.

PALMER, G.H.; MUDD, A.J. A note on the growth of some micro-organisms in stored bovine colostrum. **Journal of Dairy Research**, Amsterdam, v.39, p.227, 1972.

POLZIN, H.W.; OTTERBY, D.E. ; JOHNSON, D G. Responses of calves fed fermented or acidified colostrum. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.60, p.224, 1977.

RINDSIG, R.B.; JANECKE, J.G.; BODOH, G.W. Influence of formaldehyde and propionic acid on composition and microflora of colostrum. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.60, p.63, 1977.

RINDSIG, R.B.; BODOH, G.W. Performance of calves fed colostrum naturally fermented, or preserved with propionic acid or formaldehyde. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 60, p.79, 1977.

RINDSIG, R.B. Sour colostrum dilutions compared to whole milk for calves. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.59, p.1293, 1977.

SAALFELD, M.H. Uso da Silagem de colostro como substituto do leite na alimentação de terneiras leiteiras. **A Hora Veterinária**, São Paulo, v.27, p.162, 2008.

SILVA, T.M.; OLIVEIRA, M.D.S.; ARTONI, S.B.A.; CRUZ, C. Desenvolvimento alométrico do trato gastrointestinal de bezerros da raça holandesa alimentados com diferentes dietas líquidas durante o aleitamento. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 26, n.4, p. 493-499, 2004.

STEWART, S.; GODDEN, S.; BEY, R.; RAPNICKI, P.; FETROW, J.; FARNSWORTH, R. SCANLON, M.; ARNOLD, Y.; CLOW, L.; MUELLER, K.; FERROUILLET, C. Preventing bacterial contamination and proliferation during the harvest, storage, and feeding of fresh bovine colostrum. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.88, p.2571–2578, 2005.

TOULLEC, R. Veal calves. In: JARRIGE, R. **Ruminant nutrition - Recommended allowances and feed tables**. London: INRA, 1989. 389p.

TOULLEC, R.; GUILLOTEAU, P. Research into the digestive physiology of the milk-fed calf. In: Van WEERDON, E.J.; HUISMAN, J. **Nutrition and digestive physiology in monogastric farm animals**. Wageningen: PUDOC, 1989. p.37-55.

WARNER, R.G.; FLATT, W.P.; LOOSLI, J.K. Dietary factors influencing the development of the ruminant stomach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 4, p. 788-792, 1956.

WOUTERS, J.T.M.; AYAD, E.H.E.; HUGENHOLTZ, J.; SMIT, G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 12, p. 91–109, 2002.

YU, Y.; STONE, J.B.; WILSON, M.R. Fermented colostrum for Holstein replacement calf rearing. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.59, p.936, 1976.

ZOURARI, A.; ACCOLAS, J.P.; DESMAZEAUD, M.J. Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria: A review. **Laiterie**, Paris, v. 72, p.1-34, 1992.

3 CARACTERIZAÇÃO DA DINÂMICA FERMENTATIVA, MICROBIOLÓGICA E NUTRICIONAL DE COLOSTRO BOVINO FERMENTADO SOB CONDIÇÕES ANAERÓBIAS

Resumo

O objetivo deste estudo foi caracterizar a dinâmica fermentativa, microbiológica e nutricional de colostro bovino fermentado em condições anaeróbicas por 56 dias durante o armazenamento à temperatura ambiente. Colostro de segunda e terceira ordenhas foram colhidos, misturados e armazenados em garrafas plásticas tipo PET, que foram cheias e ligeiramente pressionadas antes do seu fechamento a fim de remover todo o espaço com o oxigênio, criando assim uma condição anaeróbica. As garrafas foram armazenadas em sala escura à temperatura ambiente, sendo cinco garrafas abertas nos dias 0,1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28 e 56 após o armazenamento, para determinação de pH, acidez titulável, concentração de ácido láctico e temperatura. Em seguida, as amostras foram destinadas à determinação da contagem de bactérias ácido-láticas, enterobactérias, leveduras e bolores. Também, a cada tempo de abertura, foram colhidas amostras para determinação de nitrogênio total, nitrogênio não-protéico, caseína, lactose, glicose, e gordura. Os valores de pH, acidez titulável e a concentração de ácido láctico mostraram uma grande variação durante o período de armazenamento ($P < 0,0001$), sendo essas alterações essenciais para a conservação do colostro. O desenvolvimento de bactérias ácido-láticas foi intenso durante o processo fermentativo, enquanto que enterobactérias e leveduras apresentaram declínio no seu desenvolvimento após 21 e 28 dias de armazenamento, respectivamente. A fração nitrogênio não proteico apresentou grande aumento ($P < 0,0001$), enquanto que os valores de caseína diminuíram ($P < 0,0001$) e apresentaram valores muito baixos após 56 dias de armazenamento. Os teores de lactose apresentaram redução significativa ($P < 0,0001$), assim como os valores de gordura ($P < 0,05$). A dinâmica fermentativa observada sugere que o colostro tem potencial para ser conservado sob condições anaeróbicas. Entretanto, sua utilização como um substituto do leite pode não ser adequada, principalmente devido à qualidade nutricional do produto resultante.

Palavras-chave: Aleitamento; Bezerros; Dieta líquida; Silagem de colostro; Substituto de leite

Abstract

The objective of this study was to characterize the fermentation dynamics, microbiological and nutritional changes of colostrum fermented under anaerobic conditions for 56 days during storage at ambient temperature. Colostrum from second and third milking were collected, mixed and stored in PET plastic bottles, which were filled and lightly pressed before its closure in order to remove all the space with oxygen, thereby creating an anaerobic condition. The bottles were stored in the dark at room temperature and five bottles were opened on days 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28 and 56 after storage for determination of pH, titratable acidity and temperature. Then, the samples were collected to determine the count of lactic acid bacteria, enterobacteria, yeasts and molds. Also, for every opening time, samples were collected for determination of total nitrogen, non-protein nitrogen, casein, lactose, glucose, lactic acid and fat. The pH and titratable acidity showed a large variation during the storage period ($P < 0.0001$), being these variations essential for the preservation of colostrum. The development of lactic acid bacteria was intense during the fermentation process, while counts of enterobacteria and yeasts declined after 21 and 28 days of storage, respectively. The non-protein nitrogen fraction showed a significant increase ($P < 0.0001$), whereas the values of true protein decreased ($P < 0.0001$) and showed very low values after 56 days of storage. Lactose content showed great reduction ($P < 0.0001$), as well as the fat content ($P < 0.05$). The fermentation dynamics observed suggest that colostrum can be efficiently stored under anaerobic conditions. However, its use as a milk replacer may not be adequate, mainly due to the nutritional quality of the resulting product.

Keywords: Colostrum silage; Dairy calves; Liquid diet; Milk replacer

3.1 Introdução

O fornecimento de colostro às bezerras durante os primeiros três dias de vida após o nascimento é uma prática comum e essencial para garantir a sobrevivência e a transferência de imunidade passiva aos animais. Além disso, o colostro é considerado um alimento rico em nutrientes importantes, com concentrações de proteína e gordura maiores que as encontradas no leite integral, embora apresente menor teor de lactose (DAVIS; DRACKLEY, 1998).

Foley e Otterby (1978) destacam que, em média, vacas comumente produzem cerca de 40 kg de colostro durante os primeiros dias pós-parto. Outros autores também reportam sobre produção significativa de colostro, com médias entre 24-32,7 kg para primíparas e entre 39-52 kg para múltíparas (YU; STONE; WILSON, 1976).

Embora a quantidade ofertada aos animais varie de acordo com o sistema adotado na fazenda, de maneira geral, o colostro é fornecido em quantidades equivalentes a cerca de 10% do peso ao nascer ou em quantidades fixas, geralmente quatro litros por dia, em duas refeições. Ao considerarmos todo o período de colostragem, no final de três dias, os animais terão consumido aproximadamente 12 kg de colostro contra uma produção de no mínimo 24 kg em animais de primeira parição.

Além disso, devido a sua composição, principalmente os teores de gordura, o colostro pode ser fornecido diluído em água morna aos animais, se tornando uma opção de dieta líquida disponível para fornecimento. De acordo com Muller, Beardsley e Ludens (1974), devido aos maiores teores de gordura e proteína encontrados no colostro, quando fornecido sem diluição, distúrbios digestivos são observados nos animais, principalmente diarreia alimentar, comprometendo o desempenho durante as primeiras semanas de vida.

A partir dessas observações, dois clássicos trabalhos encontrados na literatura abordando este tema (RINDSIG, 1976 e JENNY; MILLS; O'DELL, 1976) avaliaram o fornecimento de colostro excedente *in natura* diluído em três proporções distintas a bezerros em aleitamento e observaram que quando fornecido diluído na razão 2:1 (colostro:água), ocorre maior aceitação pelos animais, sem que haja diferenças no

desempenho ou na incidência de diarreia quando comparado a animais consumindo leite integral.

Todavia, o armazenamento desta dieta líquida torna-se um desafio na maior parte das fazendas. Foley e Otterby (1979) destacam que, embora a refrigeração ou o congelamento do colostro seja a forma mais adequada para seu armazenamento, a viabilidade econômica destes métodos, com investimentos em equipamentos, resulta em desinteresse da maioria dos produtores na utilização de colostro excedente para alimentação dos animais em aleitamento.

Por outro lado, com a necessidade de pouco ou nenhum investimento financeiro, a conservação do colostro excedente por meio da fermentação pode ser um método vantajoso. Pesquisas sobre os processos fermentativos, dinâmica nutricional e desempenho de animais consumindo colostro fermentado foram extensivamente realizadas no final da década de 70 (MULLER, 1976; OTTERBY; JOHNSON; POLZIN, 1976; POLZIN; OTTERBY; JOHNSON, 1977; CARLSON; MULLER, 1977; DANIELS et al., 1977; FOLEY; OTTERBY, 1979). Porém, embora bastante estudada, a fermentação de colostro em todos estes trabalhos de pesquisa era realizada de forma aeróbica, ou seja, na presença de oxigênio. Nestas condições, o colostro podia ser conservado somente por poucos dias, já que, após cerca de quatro semanas, o material apresentava alterações significativas nas suas características, com desenvolvimento de microrganismos indesejáveis como leveduras e bolores, resultando em rejeição de consumo pelos animais. Além disso, essas alterações ocorriam mais rapidamente com o aumento da temperatura ambiente, de forma que esta tecnologia não pôde ser adotada no Brasil (Vidal Pedroso de Faria, comunicação pessoal). Assim, a conservação de colostro através da fermentação aeróbia acabou entrando em desuso, com poucos estudos recentes sobre o tema.

Uma alternativa para aumentar o tempo de conservação seria a fermentação em condições anaeróbicas, em recipientes fechados, por um processo bastante semelhante à ensilagem de outros alimentos, o que possivelmente evitaria o início do desenvolvimento de microrganismos e conservaria o produto por período prolongado. Essa técnica de conservação vem sendo utilizada há alguns anos por produtores da

região Sul do Brasil, entretanto, ainda não existem dados publicados sobre a avaliação da composição nutricional do colostro conservado nessas condições.

O objetivo deste estudo foi caracterizar a dinâmica fermentativa, microbiológica e nutricional de colostro bovino fermentado sob condições anaeróbias por 56 dias durante armazenamento à temperatura ambiente.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Colostro fermentado

Colostro proveniente de segunda e terceira ordenhas de vacas de diversas propriedades particulares da região foi colhido e composto para formação de um *pool*.

Em seguida, este *pool* foi subdividido em 60 garrafas plásticas tipo PET com capacidade de 500 mL, as quais foram preenchidas e levemente pressionadas antes de seu fechamento de forma a retirar todo o espaço com oxigênio disponível, criando assim uma condição anaeróbia. Durante todo o processo de envase do colostro, o *pool* foi agitado para manter o material homogêneo. Após o envase, todas as garrafas foram mantidas em sala escura e à temperatura ambiente para aberturas nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21, 28 e 56 dias após a ensilagem, sendo utilizadas cinco repetições por tempo de abertura.

3.2.2 Determinação do pH, acidez titulável e temperatura

Na data de cada abertura, sub-amostras de cada garrafa foram retiradas para determinação dos parâmetros que caracterizam o perfil de fermentação. As aferições do pH foram realizadas por leitura direta em medidor de pH digital (Digimed TE-902, DIGIMED Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e as de temperatura por leitura direta com o auxílio de um termômetro digital.

As determinações de acidez titulável foram realizadas conforme descrito pela Federation Internationale de Laiterie (1991). Resumidamente, em um béquer de 50 mL, aproximadamente 10 g de colostro fermentado foram pesados e diluídos em 10 mL de água destilada. Após completa homogeneização, a amostra diluída foi titulada com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N até o ponto final (pH 8,3). Os cálculos dos valores de acidez titulável, expressos em graus Dornic ($^{\circ}$ Dornic), foram obtidos pela equação (1):

$$(1) \text{ Acidez titulável } (^{\circ}\text{Dornic}) = [(V \times f \times 0,9) / m] \times 100$$

Onde,

V = volume da solução de NaOH 0,1 N gasto na titulação, em mL;

f = fator de correção da solução de NaOH 0,1 N, igual a 1;

0,9 = fator de conversão para ácido láctico;

m = peso da amostra, em gramas.

3.2.3 Determinação da concentração de ácido láctico

As determinações das concentrações de ácido láctico foram realizadas a partir da metodologia proposta por Pryce (1969). Em tubos de plástico para centrífuga, 3,95 mL de reagente precipitante (Em um balão de 1L: 10 g de tungstato de sódio ($\text{Na}_2\text{O}_4\text{W}$) + 22 ml de ácido ortofosfórico 90% (H_3PO_4) + 5 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) + água destilada) foram adicionados a 50 μL do sobrenadante da amostra de colostro previamente centrifugada a 12.000 x g por 60 min. Imediatamente após a adição dos reagentes, os tubos foram agitados por aproximadamente 5 segundos e centrifugados por 5 minutos a 2.000 x g. Em seguida, 1,0 mL do sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio e, de forma rápida, 6,0 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) foram adicionados em cada tubo, sendo novamente agitados por 10 segundos. Após agitação, os tubos foram resfriados em água corrente e adicionados de 100 μL de reagente de coloração (1,5 g de p-hidroxibifenil em 100 ml de dimetilformamida, em balão de 100

mL), agitados e deixados em repouso por 10 minutos. Na etapa seguinte, os tubos foram transferidos para banho-maria com água fervente por aproximadamente 90 segundos, resfriados em água corrente e levados ao espectrofotômetro para leitura da absorbância utilizando-se filtro de comprimento de onda de 565 nm. As soluções padrão foram obtidas através de diluição seriada da solução inicial de 4,0 mg/mL (2,13 g de lactato de lítio + 5 mL de H_2SO_4 + água destilada em balão volumétrico de 500 mL) e utilizadas na construção da curva padrão com as concentrações de 0; 0,25; 0,50; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/mL.

3.2.4 Avaliações microbiológicas

Sub-amostras também foram utilizadas para a análise microbiológica, que foi realizada seguindo os procedimentos gerais (diluições, plaqueamento e contagem) descritos no "Standard Methods for the Examination of Dairy Products" (APHA, 1992). Para realizar as diluições decimais, 1,0 mL da sub-amostra foi adicionado a 9,0 mL de água estéril peptonada salina contida em tubos de ensaio, obtendo-se a diluição 10^{-1} . Em seguida, 1 mL da solução diluída a 10^{-1} foi adicionado a 9,0 mL de água estéril peptonada salina, obtendo-se a diluição 10^{-2} e sucessivamente até diluição necessária para inoculação e contagem.

Para a contagem de enterobactérias, placas do tipo Petrifilm® *enterobacteriaceae* (3M do Brasil®, Sumaré, SP, Brasil) foram inoculadas com 1,0 mL das diluições preparadas e, em seguida incubadas a $32,5 \pm 1^\circ C$ em incubadora BOD Modelo TE-402 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) por 24 ± 2 horas. Após o período de incubação, a contagem prosseguiu, considerando as colônias vermelhas com zonas amarelas e / ou colônias vermelhas com bolhas de gás, com ou sem bordas amarelas como positivas para enterobactérias.

A contagem de bactérias ácido-láticas também foi realizada com auxílio de placas do tipo Petrifilm® AC (3M do Brasil®, Sumaré, SP, Brasil) que foram incubadas em jarras de anaerobiose com gerador de atmosfera de anaerobiose (ANAEROBAC, Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil) em estufa BOD

Modelo TE-402 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) a $32,5\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 ± 3 horas. Foram consideradas positivas para bactérias ácido-láticas as colônias vermelhas, independentemente do tamanho ou profundidade de cor.

As contagens de bolores e leveduras foram realizadas com o auxílio de placas tipo Petrifilm® YM (3M do Brasil®, Sumaré, SP, Brasil) que foram incubadas a $22,5\pm 1^{\circ}\text{C}$ em incubadora BOD Modelo TE-402 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil). Para leitura do desenvolvimento das leveduras, após 3 dias de incubação, as colônias pequenas com bordas definidas e azul-esverdeadas foram contadas. Colônias grandes, escuras e com bordas difusas contadas após 5 dias de incubação, foram consideradas como sendo colônias de fungos.

3.2.5 Análises químico-bromatológicas

3.2.5.1 Lactose

As determinações da concentração de lactose foram realizadas de acordo com método proposto por Feitosa–Teles, Young e Stull (1978). Em um balão volumétrico de 100 mL, 2,0 mL de colostro fermentado foram diluídos em água destilada e agitados em seguida. Uma alíquota de 2,5 mL da amostra diluída foi transferida para um tubo plástico para centrifuga e acrescido de 0,2 mL de solução de sulfato de zinco 5% ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e 0,2 mL de hidróxido de bário 4,5% ($\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) e levado à centrifugação a $1.000 \times g$ por 1 minuto. Após centrifugação, 1,0 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo de vidro, adicionado de 2,5 mL de reagente Teles [uma parte de solução de fenol 1% ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$); duas partes de solução de hidróxido de sódio 5% (NaOH) ; duas partes de solução de ácido pícrico 1% ($\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$)]; uma parte de solução de bissulfito de sódio 1% (NaHSO_3)). Em seguida, os tubos foram imersos em água fervente, de forma que o fundo do tubo ficasse submerso por aproximadamente 6 minutos. Na etapa seguinte, os tubos foram rapidamente resfriados e em seguida completados até 12,5 ou 25 mL, dependendo do teor esperado de lactose da amostra. Após inverter os tubos de forma a homogeneizar as soluções, foi realizada leitura da absorbância em Sistema Automático para Bioquímica – Modelo SBA-200 (CELM,

Barueri, SP, Brasil) utilizando-se filtro de 520 nm de comprimento de onda para todas as amostras e soluções padrão. As soluções padrão foram obtidas através de diluição seriada da solução inicial de 1 mg/mL (1,052 g de lactose em 1000 mL de água destilada) e utilizadas na construção da curva padrão com as concentrações de 0; 0,125; 0,25; 0,50 e 1,0 mg/mL.

3.2.5.2 Gordura bruta

As extrações foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por Bligh e Dyer (1959) e adaptada por Manirakiza, Covaci e Schepens (2001). Aproximadamente 2,5 g de amostra foram pesados em tubos plásticos para centrífuga em balança analítica e adicionadas a 10 mL de metanol (MeOH) e 5 mL de clorofórmio (CHCl_3). Após agitação por 2 minutos, uma segunda porção de clorofórmio (CHCl_3) (5 mL) foi adicionada seguida de agitação por mais 2 minutos. Na etapa final, 4 mL de água destilada foram adicionados e os tubos foram levados a centrifugação a 4.000 rpm por 10 min. Após a centrifugação, a fase composta do clorofórmio (CHCl_3) + gordura foi isolada com auxílio de uma pipeta *Pasteur* em balão previamente tarado. Uma segunda extração foi realizada adicionando-se 10 mL de uma solução 10% (v/v) de metanol (MeOH) em clorofórmio (CHCl_3), seguido de agitação por 2 minutos. Após nova centrifugação, a fase clorofórmio (CHCl_3) + gordura foi adicionada ao conteúdo da primeira extração. O resíduo restante após evaporação dos solventes orgânicos foi pesado para obtenção da porcentagem de gordura da amostra.

3.2.5.3 Frações nitrogenadas

Amostras de colostro de cada tempo de abertura foram separadas e analisadas para nitrogênio total pelo método de micro-Kjeldahl, de acordo com metodologia proposta por Shahani e Sommer (1951). Em um tubo de vidro refratário, 5 mL de amostra foram diluídos em 95 mL de água destilada e adicionados a 3 mL de ácido sulfúrico acrescido de mistura catalítica [1 parte de sulfato de cobre (CuSO_4) + 10

partes de sulfato de potássio (K_2SO_4)]. Em seguida, os tubos foram colocados em bloco digestor até completa oxidação da matéria orgânica. Na etapa seguinte, 10 mL de água foram adicionados a cada frasco que foi destilado em destilador de nitrogênio com adição de 10 mL de solução 50% de hidróxido de sódio (NaOH), sendo o volume destilado recuperado em frasco erlenmeyer contendo 30 mL de solução de ácido bórico. Após dobrar de volume, os frascos foram titulados em solução de ácido clorídrico 0,1 N (HCl), sendo o volume gasto anotado. A porcentagem de nitrogênio total das amostras foi calculada de acordo com a equação (2); os valores de proteína bruta foram estimados multiplicando-se os valores de nitrogênio total por 6,38 (fator de conversão para proteína do leite).

$$(2) \% NT = [(Vol\ HCl \times 0,14) / \text{peso da amostra}] \times 100$$

Onde,

% NT = porcentagem de nitrogênio total da amostra

Vol HCl = volume de ácido clorídrico 0,1 N gasto na titulação, em mL

A fração nitrogênio não-protéico foi determinada conforme Shahani e Sommer (1951) na qual 10 mL de amostra foram diluídas em 40 mL de solução de ácido tricloroacético 15% (TCA) por aproximadamente 15 min. Em seguida, o conteúdo foi filtrado em papel filtro (Whatman nº1), sendo uma alíquota de 10 mL do filtrado analisada conforme método de micro-Kjeldahl descrito anteriormente.

A fração nitrogênio não-caseína também foi obtida conforme Shahani e Sommer (1951). Em um frasco do tipo erlenmeyer, 10 mL de amostra foram diluídos em 90 mL de água destilada e acrescidos de 1,0 mL de solução de ácido acético (CH_3COOH) 10%. Em seguida, os frascos foram colocados em banho-maria a 40°C por aproximadamente 10 min. Após esse período, os frascos foram retirados e 1,0 mL de solução de acetato de sódio 1N foi adicionado. O extrato livre de caseína foi obtido pela filtragem em papel filtro (Whatman nº1) e, em seguida, 10 mL do filtrado foram utilizados para determinação nitrogênio pelo método de micro-Kjeldahl descrito. Dessa

forma, o valor de N-caseína foi obtido através da subtração da fração N não-caseína da fração N total, sendo considerado como caseína o resultado da multiplicação da fração N-caseína por 6,38.

3.2.5.4 Glicose

As concentrações de glicose foram determinadas a partir do kit enzimático GLICOSE HK LIQUIFORM – Ref.: 85 (LABTEST Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil) por espectrofotometria de ponto final, utilizando-se filtro de absorvância de 505 nm de comprimento de onda em Sistema Automático para Bioquímica – Modelo SBA-200 (CELM, Barueri, SP, Brasil). Uma alíquota de 4 μ L da amostra foi pipetada em cubetas de reação, acrescida de 400 μ L de reagente fornecido pelo kit. Após período de incubação de 10 minutos, foi realizada a leitura da absorvância para obtenção dos valores de glicose. Para calibração do equipamento, solução padrão fornecida com o kit enzimático com concentração de 100 mg/dL de glicose foi analisada a cada rodada.

3.2.6 Análises estatísticas

Os dados dos parâmetros de caracterização do perfil de fermentação (pH, acidez titulável, ácido láctico e temperatura), avaliações microbiológicas e nutricional (lactose, gordura bruta, frações nitrogenadas e glicose) foram analisados como delineamento inteiramente casualizado com auxílio do procedimento dos modelos lineares generalizados (GLM) do pacote estatístico SAS (version 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC), conforme modelo (3). Cada garrafa aberta foi considerada como uma unidade experimental, sendo utilizadas cinco repetições por tempo de abertura. Para as análises dos dados de avaliação microbiológica, os dados foram transformados para $\log_{10}$ e posteriormente avaliados. Para efeito de comparação de médias entre os tempos de abertura, foi utilizado o teste de Tukey, com nível de significância de 5%. As equações de regressão dos gráficos foram desenvolvidas pelo procedimento REG e as análises descritivas foram realizadas pelo procedimento UNIVARIATE do pacote estatístico SAS (version 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC) para todos os parâmetros estudados.

$$(3) \ Y_i = \mu + T_i + E_i$$

Onde,

Y_i = variável resposta

μ = média geral

T_i = efeito do tratamento (tempo de abertura)

E_i = efeito devido ao acaso (resíduo)

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Dinâmica fermentativa

Os parâmetros que caracterizam a dinâmica fermentativa do colostro (pH, acidez titulável e concentração de ácido láctico), conforme esperado, apresentaram efeito significativo ($P < 0,0001$) em relação ao tempo de armazenamento (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 - Valores médios, mínimos e máximos de pH, acidez titulável, concentração de ácido láctico e temperatura observados em colostro fermentado sob condições anaeróbicas

Item	Média (DP ⁽¹⁾)	Intervalo	EPM ⁽²⁾	P< ⁽³⁾
		(Mín.-Máx.)		
pH	4,68 (0,51)	3,95 - 6,13	0,07	<0,0001
Acidez titulável, em °Dornic	166,2 (89,5)	35,8 – 356,9	117,5	<0,0001
Ácido láctico, mg/dL	7,1 (3,32)	2,14 – 16,00	0,44	<0,0001
Temperatura, em °C	20,1 (0,79)	18,8 – 21,5	0,11	0,0001

⁽¹⁾ DP = desvio padrão

⁽²⁾ EPM = erro padrão da média

⁽³⁾ P< = Efeito do tempo de armazenamento

De acordo com Foley e Otterby (1978), o armazenamento do colostro à temperatura ambiente resulta em significativas alterações na composição química e nutricional ao longo do processo fermentativo. Segundo os autores, o pH do *colostro in*

natura, que pode variar entre 5,7 e 6,8, valores próximos aos observados neste trabalho, pode chegar a valores abaixo de 4,5 em poucos dias de fermentação. Valores semelhantes também foram observados em diversos trabalhos clássicos de pesquisa, desenvolvidos entre as décadas de 70 e 80 sobre avaliação de colostro armazenado em condições ambientais (CARLSON; MULLER, 1977; DANIELS et al., 1977; MULLER; SMALLCOMB, 1977; OTTERBY et al., 1980), embora em todos os casos o colostro tenha sido fermentado de maneira aeróbia, ou seja, com contato total ou parcial com o ambiente externo.

A Figura 3.1 sugere que as alterações nos valores de pH ocorrem de forma mais intensa nos primeiros dias de armazenamento, quando foi observada redução do valor inicial de 6,13 para valores próximos de 4,5 nos primeiros sete dias. Também é possível observar que, entre 14 e 21 dias de fermentação, o colostro apresenta os menores valores de pH observados (3,95), mantendo-se praticamente constante, com pequeno aumento após 56 dias de armazenamento. Muller e Smallcomb (1977) observaram comportamento semelhante de aumento discreto no pH após 15 dias de armazenamento. Entretanto, segundo os autores, por se tratar de colostro conservado em condições aeróbicas, a manutenção do pH em valores ideais para conservação é comprometida quando o material é armazenado por longos períodos, pois nestas condições as populações de bactérias ácido-láticas diminuem devido ao desenvolvimento de leveduras e bolores, levando a alterações importantes no pH.

A acidez titulável apresentou dinâmica semelhante a observada para o pH, porém, de maneira inversa (Figura 3.1), já que aumentos nos valores de acidez estão correlacionados com aumentos na concentração de ácido lático, principal responsável por reduzir o pH durante o processo fermentativo. De acordo com Muller, Ludens e Rook (1975), a temperatura do ambiente onde o colostro é armazenado tem influência direta nos valores de acidez. Como o ácido lático é produzido principalmente por bactérias ácido-láticas em ambientes com temperatura acima de 30°C, o desenvolvimento desses microrganismos é maior, resultando em um produto final mais ácido.

Figura 3.1 - Efeito do tempo de armazenamento no pH e na acidez titulável (° Dornic) de colostro fermentado sob condições anaeróbicas

A elevada acidez do colostro fermentado, embora possa inibir o consumo pelos animais quando utilizado como substituto de leite (MULLER; SYHRE, 1974; JENNY; O'DELL; JOHNSON, 1976), é responsável pela sua conservação, inibindo o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis.

Corroborando os resultados observados para o pH e a acidez titulável, a concentração de ácido láctico apresentou aumentos significativos durante o período de armazenamento ($P < 0,0001$; Figura 3.2).

Figura 3.2 – Efeito do tempo de armazenamento nas concentrações de ácido láctico (mg/mL) de colostro fermentado sob condições anaeróbicas

De acordo com Polzin, Otterby e Johnson (1977), efeitos semelhantes na concentração de ácido láctico e na acidez titulável de colostro fermentado naturalmente ou com a adição de ácido propiônico foram observados. Foley e Otterby (1978) destacam também que, embora o ácido láctico seja um dos principais responsáveis pela

acidez do colostro fermentado, alterações nas concentrações molares dos ácidos acético e butírico também são observadas.

Muller e Syhre (1974) observaram maior acidez titulável quando colostro foi inoculado com culturas de bactérias ácido-láticas, provavelmente pela maior produção de ácido lático pelos microrganismos. Otterby, Dutton e Foley (1976) também observaram altos valores de acidez titulável, relacionado principalmente a temperatura do local de armazenamento que, segundo os autores, frequentemente excedia 30°C, o que pode ter aumentado a população dessas bactérias.

Por outro lado, embora também tenha apresentado efeito significativo ($P=0,0001$) em relação aos tempos de abertura, a temperatura do colostro apresentou pouca variação, com valores entre 18,4 e 21,5°C. Principalmente devido à atividade microbiológica e à intensa metabolização de componentes como a lactose e proteínas, esperava-se que fossem observados picos de aumentos na temperatura do colostro ao longo do armazenamento.

Figura 3.3 - Efeito do tempo de armazenamento na temperatura (°C) de colostro fermentado sob condições anaeróbicas

Entretanto, conforme mostra a Figura 3.3, foram observadas poucas variações durante os primeiros 14 dias de fermentação, com maiores temperaturas observadas após 21 dias. É possível afirmar que as variações nas temperaturas do colostro durante a fermentação estão correlacionadas mais com a temperatura do ambiente onde é armazenado do que com o processo fermentativo.

3.3.2 Caracterização microbiológica

Os resultados mostram que o desenvolvimento de bactérias ácido-láticas, enterobactérias e leveduras é influenciado diretamente pelo tempo de armazenamento ($P < 0,0001$), com impacto direto no processo fermentativo (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 - Valores médios, mínimos e máximos observados de contagens totais de microrganismos em colostro fermentado sob condições anaeróbicas

Contagem total (log ₁₀ UFC/ mL)	Média (DP ⁽¹⁾)	Intervalo (Mín.-Máx.)	EPM ⁽²⁾	P< ⁽³⁾
Bactérias ácido-láticas	8,37 (1,43)	4,78 – 10,0	0,18	<0,0001
Enterobactérias	4,69 (2,99)	0,0 – 7,7	0,39	<0,0001
Leveduras	4,63 (2,79)	0, 0 – 8,0	0,36	<0,0001
Fungos e bolores	0,00 (0,00)	0,0 – 0,0	0,00	---

⁽¹⁾ DP = desvio padrão

⁽²⁾ EPM = erro padrão da média

⁽³⁾ Efeito do tempo de armazenamento

A Figura 3.4 mostra que, no momento da ensilagem, o colostro apresentava população de bactérias ácido-láticas na ordem de 4,78 log₁₀ UFC/ mL e que ao primeiro dia de fermentação é observado aumento significativo na população desses microrganismos, principalmente devido à condição favorável para seu desenvolvimento, com substrato prontamente disponível.

Frank, Christen e Bullerman (1992) destacam que o grupo de bactérias conhecidos como ácido-láticas, presente naturalmente em produtos lácteos, é formado por microrganismos dos gêneros *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc*, além das

várias espécies de *Lactobacillus* homo e heterofermentativas. Segundo os autores, este grupo de bactérias hidrolisa a lactose através da enzima β -galactosidase em glicose e galactose, que posteriormente são utilizadas como fonte de energia, levando a formação de ácido láctico. De acordo com Wounters et al. (2002), este processo é essencial para a conservação dos produtos lácteos fermentados, já que a formação do ácido láctico é responsável pela redução do pH a valores que inibem a formação de microrganismos indesejáveis como enterobactérias, leveduras e mofo.

No presente estudo foi possível observar um rápido desenvolvimento inicial de bactérias ácido-láticas acompanhada do declínio acentuado nos valores de pH e aumentos da acidez titulável (Figura 3.1) e da concentração de ácido láctico (Figura 3.2).

Figura 3.4 - Efeito do tempo de armazenamento nas contagens de bactérias ácido-láticas (log₁₀ UFC/mL) em colostro fermentado sob condições anaeróbicas

A Figura 3.4 apresenta a dinâmica no desenvolvimento de enterobactérias durante o processo fermentativo. De acordo com Stewart et al. (2005), embora o colostro forneça às bezerras recém-nascidas as imunoglobulinas necessárias para a aquisição de imunidade passiva, muitas vezes, por negligência e falta de cuidados dos

tratadores, o colostro pode ser um veículo transmissor de uma grande variedade de microrganismos, principalmente as enterobactérias, como a *Escherichia coli* e a *Salmonella*.

Como a diarreia é a principal doença que acomete bezerros na fase de aleitamento (DAVIS; DRACKLEY, 1998), a preocupação com o desenvolvimento dos seus principais agentes causadores durante a fermentação do colostro é importante. Contudo, através da dinâmica de desenvolvimento das enterobactérias durante o processo fermentativo pode-se observar que apesar do intenso crescimento inicial, após 21 dias de armazenamento, não foi mais observada presença desses microrganismos no colostro. O rápido desenvolvimento de enterobactérias durante os primeiros 3 e 6 dias de fermentação também foram observadas por outros autores em colostro fermentado em condições aeróbias (JENNY; O'DELL; JOHNSON, 1977; RINDSIG; JANECKE; BODOH, 1977).

Segundo Christen et al. (1992), as enterobactérias são um grupo de microrganismos aeróbicos e anaeróbicos facultativos, gram-negativos e geralmente presentes em amostras contaminadas ou em condições sanitárias inadequadas. No caso dos produtos lácteos, como é o caso do colostro, este grupo é bastante eficiente na fermentação da lactose, principalmente nas primeiras 24 horas de fermentação, com alta produção de ácidos e gases. Porém, o rápido declínio do pH por consequência da rápida fermentação da lactose e da alta produção de ácidos, leva à redução das contagem desses microrganismos após alguns dias de fermentação. Muller e Smallcomb (1977) avaliando alterações no colostro fermentado e submetido a tratamentos químicos observaram redução nas contagens de enterobactérias após 14 dias de armazenamento, assim como no presente estudo.

Foley e Otterby (1978) relatam que a maioria das enterobactérias, principalmente a *E. coli*, não sobrevive em ambientes de pH abaixo de 4,0. Neste estudo, aos 21 dias de fermentação o pH do colostro apresentou valores bem próximos a 4,0 (Figura 3.1), corroborando as afirmações de Foley e Otterby (1978), levando as contagens de microrganismos a valores insignificantes (Figura 3.5).

Figura 3.5 - Efeito do tempo de armazenamento nas contagens de enterobactérias ($\log_{10}$ UFC/mL) em colostro fermentado sob condições anaeróbicas

A ocorrência de leveduras e mofos não aumentou com o tempo de conservação, demonstrando um adequado processo de fermentação sob condições anaeróbicas (Figura 3.6). Da mesma forma que as enterobactérias, leveduras e mofos são bastante sensíveis a pH abaixo de 4,0. De acordo com Jenny, O'Dell e Johnson (1976), em temperaturas mais altas, pode ocorrer a formação de bolores e a decomposição de proteínas. Dessa forma, é essencial que bactérias lácticas estejam presentes em quantidade suficiente no início do processo para que o declínio no pH ocorra o mais rápido possível, inibindo o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis, como as leveduras. Por outro lado, se as condições para o desenvolvimento de leveduras e mofos forem adequadas, o colostro fermentado pode apresentar características indesejáveis e principalmente recusa pelos animais no momento do fornecimento.

Como os trabalhos com colostro fermentado encontrados na literatura reportam a dinâmica microbiológica do material sob condições de contato com o ambiente externo,

os resultados com o desenvolvimento de leveduras e bolores apresentam comportamento diferente do observado neste trabalho.

Figura 3.7 - Efeito do tempo de armazenamento nas contagens de leveduras ($\log_{10}$ UFC/mL) em colostro fermentado sob condições anaeróbicas

De maneira geral, quando fermentado sob condições aeróbicas, são observados crescimentos discretos de leveduras e bolores durante os primeiros dias de armazenamento. Porém, com 21 dias de fermentação, em média, o crescimento desses microrganismos torna-se mais acelerado, caracterizado por alterações importantes na composição do colostro, sendo necessário o descarte do produto por não se encontrar apropriado para o fornecimento aos animais. Baseados no princípio do declínio de pH para controle desses microrganismos, diversos trabalhos na literatura reportam efeitos positivos quando ácido benzóico ou propiônico são adicionados ao colostro durante a fermentação (RINDSIG; JANECKE; BODOH, 1977; MULLER; SMALLCOMB (1977)).

Por outro lado, neste estudo, devido à fermentação do colostro estritamente anaeróbica, o pH é reduzido de maneira eficiente pela fermentação de bactérias ácido-láticas e até mesmo pelas enterobactérias presentes nos primeiros dias, o que inibe o

desenvolvimento de leveduras e bolores quando o pH atinge valores menores que 4,0 (Figura 3.1; Figura 3.6). Esses dados mostram que em se tratando de armazenamento por processo fermentativo, a fermentação anaeróbia deve ser adotada.

3.3.3 Composição nutricional

A Tabela 3.3 mostra que o processo fermentativo do colostro modifica de maneira significativa a sua composição nutricional quando comparado com o material *in natura*. Alterações nos principais sólidos totais presentes no colostro são intensas durante a fermentação e são reportadas por diversos autores (CARLSON; MULLER, 1977; OTTERBY; DUTTON; FOLEY, 1977; RINDSIG; JANECKE; BODOH, 1977).

Tabela 3.3 - Composição nutricional de colostro fermentado sob condições anaeróbicas

Variável, %	Média (DP ⁽¹⁾)	Intervalo (Mín.-Máx.)	EPM ⁽²⁾	P < ⁽³⁾
Lactose	2,38 (1,47)	0,24 – 5,54	0,22	<0,0001
Glicose ⁽⁴⁾	1,74 (1,26)	0,34 – 4,41	0,16	<0,0001
Gordura	4,99 (0,32)	4,32 – 5,77	0,04	0,04
Nitrogênio total (NT)	2,51 (0,28)	1,88 – 2,93	0,03	<0,0001
Proteína bruta	15,89 (1,76)	11,99-18,51	0,24	<0,0001
Caseína, % do NT	28,51 (8,61)	11,12–44,39	1,12	<0,0001
Caseína	4,30 (1,40)	1,40 – 5,89	0,19	<0,0001
Nitrogênio não protéico, % NT	4,13 (2,6)	1,93 – 15,21	0,35	<0,0001

⁽¹⁾ DP = desvio padrão

⁽²⁾ EPM = erro padrão da média

⁽³⁾ Efeito do tempo de armazenamento

⁽⁴⁾ % peso/volume

Conforme esperado, a lactose é uma das frações que mais sofre alterações ao longo do período de armazenamento. Como discutido anteriormente, a fermentação do colostro e de outros produtos lácteos ocorre com o rápido desenvolvimento de bactérias ácido-láticas, responsáveis pela redução do pH, porém as custas do consumo dos

carboidratos disponíveis, principalmente da lactose. A Figura 3.7 mostra a dinâmica do teor de lactose do colostro ao longo do processo fermentativo.

Bush, McQueen e Nicholson (1981) reportam em dois experimentos conduzidos, que os teores de lactose apresentaram decréscimo acentuado. Segundo os autores, ao final de 24 dias de fermentação, os teores de lactose apresentavam-se entre 10 e 20% da quantidade inicial quando do início do experimento. Reduções ainda maiores foram observadas no presente estudo, na qual o período de armazenamento mais prolongado mostrou que a lactose é quase totalmente consumida pelos microrganismos, com valores próximos de zero após 56 dias de fermentação (Figura 3.7).

Figura 3.7 – Efeito do tempo de armazenamento nas concentrações de lactose (%) de colostro fermentado sob condições anaeróbicas

Seidel e Shellenberger (1975) também observaram redução da lactose do colostro durante a fermentação. Segundo os autores, as concentrações passaram de 2,7% na primeira semana para 0,2% após sete semanas de armazenamento à temperatura ambiente.

De acordo com Berg, Tymoczko e Stryer (2004), a lactose é constituída por galactose unida à glicose por ligações glicosídicas β -1,4 e é hidrolisada pela enzima lactase presente no organismo de todos os mamíferos. Porém, a lactose também pode ser hidrolisada por microrganismos, principalmente bactérias, que utilizam a enzima β -galactosidase durante a fermentação de produtos lácteos, levando a formação de galactose e glicose livres. Nesse caso, na etapa seguinte, a glicose e galactose livres são utilizadas pelos microrganismos para obtenção de energia, sendo o produto resultante dessa metabolização principalmente o ácido láctico (ZOURARI et al., 1992).

Com base nessas afirmações, a Figura 3.8 permite observar que as maiores concentrações de glicose foram observadas entre 4 e 7 dias de fermentação, período este que coincide com o de maior desenvolvimento microbológico observado, principalmente bactérias ácido-láticas (Figura 3.4) e enterobactérias (Figura 3.5). Portanto, a concentração de glicose observada no colostro fermentado confirma os resultados observados com a intensa redução e metabolização da lactose pelos microrganismos durante os primeiros sete dias de fermentação (Figura 3.7).

Figura 3.8 – Efeito do tempo de armazenamento nas concentrações de glicose (% peso/volume) de colostro fermentado sob condições anaeróbicas

Embora altos valores de proteína bruta sejam observados no colostro *in natura* (18,5%), e mesmo após o armazenamento por 56 dias (11,99%) (Figura 3.9), é importante lembrar que as imunoglobulinas e os microrganismos contribuem consideravelmente nos resultados dessa fração, já que os resultados são obtidos pela multiplicação do valor de nitrogênio total (%NT) por 6,38. Segundo Mbutia et al. (1997), durante o armazenamento, as imunoglobulinas presentes no colostro parecem ser pouco alteradas, embora seu efeito imunológico ou como fonte protéica para nutrição dos bezerros em aleitamento tenham sido pouco estudados.

Figura 3.9 – Efeito do tempo de armazenamento nas concentrações proteína bruta (%) de colostro fermentado sob condições anaeróbicas

Alterações nos teores de nitrogênio total são variáveis nos trabalhos de pesquisa e são geralmente dependentes do tratamento químico adicionado ao colostro nos primeiros dias de fermentação. Reduções no nitrogênio total foram observadas ($P < 0,0001$), assim como em outros estudos (YU; STONE; WILSON, 1976; CARLSON; MULLER, 1977). Entretanto, outros autores não observam redução no nitrogênio total,

embora as frações nitrogenadas como a porcentagem de caseína e nitrogênio não-protéico tenham sido alteradas (OTTERBY; DUTTON; FOLLEY, 1977; FOLEY; HUNTER; OTTERBY, 1978).

Os efeitos da proteólise e alterações das frações nitrogenadas no colostro ficam mais evidentes quando observada a evolução dos valores de caseína ao longo do tempo de armazenamento. Expressiva redução na proporção de caseína no colostro pode ser observada na Tabela 3.3, com valores iniciais de 44,39% sendo reduzidos a 11,12% do nitrogênio total após 56 dias de fermentação.

Ao final de 56 dias de fermentação o colostro apresentou concentração de caseína de 1,4% (Figura 3.10). Como a caseína é a principal fonte protéica via dieta líquida para bezerros em aleitamento, com concentrações no leite integral em torno de 80% da proteína total (DEMOTT; PARK, 1973), o fornecimento de colostro fermentado como substituto de leite pode não suprir as exigências dos animais.

Figura 3.10 – Efeito do tempo de armazenamento na concentração de caseína (%) de colostro fermentado sob condições anaeróbicas

Bush, McQueen e Nicholson (1981) avaliando o efeito da inclusão de formalina com o objetivo de diminuir a proteólise durante a fermentação do colostro, observaram redução de aproximadamente 40% da concentração de caseína quando o aditivo não foi utilizado. Dados da literatura mostram que a caseína apresenta concentrações variáveis no colostro, aumentando sua participação nos valores de proteína total ao longo do período de transição entre a produção de colostro e de leite comercializável. De acordo com Davis e Drackley (2002), as concentrações de caseína na proteína total oscilam entre cerca de 35%, no colostro logo após o parto, para valores ao redor de 70% no leite de transição de terceira ou quarta ordenha.

Alterações significativas nas frações protéicas foram observadas com aumentos na porcentagem de nitrogênio não-protéico (NNP; Figura 3.11). De acordo com Robinson e Tamime (1999), a maioria das bactérias ácido-láticas, especialmente as *Lactobacillus bulgaricus* e a *Streptococcus thermophilus*, degradam intensamente as proteínas lácteas, pela ação de enzimas peptidases produzida pelos próprios microrganismos.

Figura 3.11 – Efeito do tempo de armazenamento nas concentrações de nitrogênio não-protéico (% NT) de colostro fermentado sob condições anaeróbicas

Alterações significativas nas frações protéicas são observadas na maioria dos trabalhos de pesquisa conduzidos com colostro fermentado, com algumas diferenças na porcentagem final de nitrogênio não-protéico, principalmente devido ao tratamento químico utilizado para minimizar a proteólise durante o armazenamento (MULLER; LUDENS; ROOK, 1976; CARLSON; MULLER, 1977; POLZIN; OTTERBY; JOHNSON, 1977; OTTERBY; DUTTON; FOLEY, 1977).

Segundo Carlson e Muller (1977), os valores de NNP (% NT) podem ser utilizados como indicativos de fermentação inadequada. Concentrações de NNP entre 16 e 23% são observadas geralmente quando colostro é fermentado aerobicamente após cerca de 20 dias de armazenamento. Os resultados deste estudo mostram que em condições anaeróbicas, embora a redução do pH e aumento da acidez permita que o colostro possa ser armazenado por longo período de tempo, as alterações nas frações protéicas ainda ocorrem de forma intensa. Alterações significativas são observadas com os valores iniciais de nitrogênio não-protéico de 1,93 % passando a 15,21% após 56 dias de armazenamento.

Ainda que a maioria dos constituintes do colostro tenha apresentado reduções ao longo do processo fermentativo, a gordura parece ser a fração que menos sofre alterações. Enquanto as maiores alterações ocorriam nas concentrações de lactose e caseína durante os primeiros dias de fermentação por consequência da intensa atividade microbiana, poucas alterações foram verificadas nas porcentagens de gordura nesse mesmo período (Figura 3.12). Segundo Robinson e Tamime (1992), a degradação de gorduras presentes no leite e outros produtos lácteos é menos freqüente, devido à baixa concentração de lipases produzidas por microrganismos.

Dados da literatura indicam que a porcentagem de gordura varia entre 3,8 e 7,2% no colostro, com reduções na sua concentração ao longo das ordenhas pós-parto (FOLEY; OTTERBY, 1978). Os dados observados neste trabalho encontram-se dentro desse intervalo, com média de 4,99% de gordura (Tabela 3.3).

Embora o efeito do tempo de armazenamento tenha sido verificado nas concentrações de gordura ($P < 0,05$), a maioria dos trabalhos de pesquisa indica estabilidade dessa fração (YU; STONE; WILSON, 1976; RINDSIG; JANECKE; BODOH, 1977; MULLER; SMALLCOMB, 1977). Porém, quando observadas alterações,

essas são sempre consideradas pequenas, assim como observado neste estudo (CARLSON; MULLER, 1977; FOLEY; OTTERBY, 1979).

Figura 3.12 – Efeito do tempo de armazenamento nas concentrações de gordura (%) de colostro fermentado sob condições anaeróbicas

3.4 Conclusões

As dinâmicas fermentativa e microbiológica observadas sugerem que o colostro tem potencial para ser conservado de forma eficiente à temperatura ambiente e sob condições anaeróbicas. Entretanto, os principais componentes nutricionais são reduzidos, de forma que o colostro fermentado anaerobicamente não apresenta composição em frações nitrogenadas, lactose e gordura adequadas para um substituto do leite para bezerras leiteiras.

Referências

APHA **Standard methods for the examination of water and wastewater.**

Washington: American Public Health Association, 1992. 46p.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. **Bioquímica.** São Paulo: Reverté, 2004. 998p.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification.

Canadian Journal of Biochemistry Physiology, Ottawa, v.37, p.911-917, 1959.

BUSH, R.S.; MCQUEEN, R.E.; NICHOLSON, J.W.G. Effect of fermentation and formalin preservation on the protein component of bovine colostrum. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.64, p.1695-1699, 1981.

CAMPOS, F.P.; NUSSIO, C.M.B.; NUSSIO, L.G. **Métodos de análises de alimentos.**

Piracicaba: FEALQ, 2002. 135p.

CARLSON, S.M.A.; MULLER, L.D. Compositional and metabolic evaluation of colostrum preserved by four methods during warm ambient temperatures. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.60, p.566, 1977.

CHRISTEN, G.L.; DAVIDSON, P.M.; McALLISTER, J.S.; ROTH, L.A. Coliform and other indicator bacteria. In: MARSHALL, R.T. **Standard methods for the examination of dairy products.** Washington: American Public Health Association, 1992. p.247-269.

DANIELS, L.B.; HALL, J.R.; HORNSBY, Q.R.; COLLINS, J.A. Feeding naturally fermented, cultured, and direct acidified colostrum to dairy calves. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.60, p.992, 1977.

DAVIS, C.L.; DRACKLEY, J.K. **The development, nutrition, and management of the young calf.** Ames: Iowa State University Press, 1998. 339p.

DEMOTT, B.J.; PARK, J.R. Effect of processing milk upon association, of added iron with different protein fractions. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.57, p.121-123, 1973.

FEDERATION INTERNATIONALE DE LAITERIE **Yaourt**: determination de l'acidité titratable (methode potentiometrique). Bruxelles: Federation Internationale de Laiterie, 1991. 1p.

FEITOSA-TELES, F.F.; YOUNG, C.K.; STULL, J.W. A method for rapid determination of lactose. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.61, p.506-508, 1978.

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

FOLEY, J.A.; OTTERBY, D.E. Performance of calves fed colostrum stored by freezing, fermentation, or treatment with lactic or adipic acid. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.62, p.459-467, 1979.

FOLEY, J. A. HUNTER, A.G. OTTERBY, D.E. Absorption of colostral proteins by newborn calves fed unfermented, fermented, or buffered colostrum. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.61, p.1450-1456, 1978.

FRANK, J.F.; CHRISTEN, G.L.; BULLERMAN, L.B. Tests for groups of microorganisms. In: MARSHALL, R.T. **Standard methods for the examination of dairy products**. Washington: American Public Health Association, 1992. p.271-286.

JENNY, B.F.; O'DELL, G.D.; JOHNSON, M.G. Microbial and acidity changes in colostrum fermented by natural flora at low and high ambient temperatures. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.60, p.453, 1976.

SHAHANI, K. M.; SOMMER, H. H. The protein and non-protein nitrogen fractions in milk I: Methods of analysis. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.34, p.1003-1009, 1951.

MARINAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Comparative Study on Total Lipid Determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer Extraction Methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, Amsterdam, v.14, p.93-100, 2001.

MULLER, L.D.; SMALLCOMB, J. Laboratory evaluation of several chemicals for preservation of excess colostrum. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.60, p.627, 1977.

MULLER, L.D.; SYHRE, D.R. Influence of chemicals and bacterial cultures on preservation of colostrum. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.58, p.957, 1974.

MULLER, L.D.; BEARDSLEY, G.L.; LUDENS F.C. Amounts of sour colostrum for growth and health of calves. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.58, p.1360, 1975.

MULLER, L.D.; LUDENS, F.C.; ROOK, J.A. Performance of calves fed fermented colostrum or colostrum with additives during warm ambient temperatures **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.59, p.930-935, 1976.

OTTERBY, D.E.; JOHNSON, D.G.; POLZIN, H.W. Fermented colostrum or milk replacer for growing calves. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.59, p.201-204, 1976.

OTTERBY, D.E.; DUTTON, R.E.; FOLEY, J.A. Comparative fermentations of bovine colostrum milk. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.60, p.73, 1976.

OTTERBY, D.E. ; JOHNSON, D.G.; FOLEY, J.A.; TOMSCHE, D.S. ; LUNDQUIST, R. G.; HANSON, P.J. Fermented or chemically-treated colostrum and nonsalable milk in feeding programs for calves. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.63, p.951-958, 1980.

POLZIN, H.W.; OTTERBY, D.E. ; JOHNSON, D.G. Responses of calves fed fermented or acidified colostrum. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.60, p.224, 1977.

PRYCE, J.D. A modification of the Barker-Summeson method for the determination of lactic acid. **Analyst**, London, v.94, p. 1151-1152, 1969.

RINDSIG, R.B.; JANECKE, J.G.; BODOH, G.W. Influence of formaldehyde and propionic acid on composition and microflora of colostrum. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.60, p.63, 1977.

RINDSIG, R.B. Sour colostrum dilutions compared to whole milk for calves. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.59, p.1293, 1977.

ROBINSON, R.K.; TAMIME, A.Y. Microbiology of fermented milks In: ROBINSON, R.K. **Dairy microbiology**. Amsterdam: Elsevier, 1999, p.291-343.

SHAHANI, K.M.; SOMMER, H.H. The protein and non-protein nitrogen fractions in milk. I. Methods of analysis. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.34, p.1003-1009, 1951.

SEIDEL, G.R.; SHELLENBERGER, P.R. Evaluation of composition and preparation of fermented colostrum. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.58, p.743, 1975.

STEWART, S.; GODDEN, S.; BEY, R.; RAPNICKI, P.; FETROW, J.; FARNSWORTH, R. SCANLON, M.; ARNOLD, Y.; CLOW, L.; MUELLER, K.; FERROUILLET, C. Preventing bacterial contamination and proliferation during the harvest, storage, and feeding of fresh bovine colostrum. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.88, p.2571–2578, 2005.

WOUTERS, J.T.M.; AYAD, E.H.E.; HUGENHOLTZ, J.; SMIT, G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 12, p. 91–109, 2002.

YU, Y.; STONE, J.B.; WILSON, M. R. Fermented colostrum for Holstein replacement calf rearing. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.59, p.936, 1976

ZOURARI, A.; ACCOLAS, J.P.; DESMAZEAUD, M.J. Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria: A review. **Laiterie**, Paris, v. 72, p.1-34, 1992.

4 DINÂMICA FERMENTATIVA, MICROBIOLÓGICA E NUTRICIONAL DE COLOSTRO BOVINO FERMENTADO SOB CONDIÇÕES ANAERÓBIAS E ARMAZENADOS EM DIFERENTES TEMPERATURAS AMBIENTAIS

Resumo

O objetivo deste estudo foi caracterizar a dinâmica fermentativa, microbiológica e nutricional de colostro bovino fermentado sob condições anaeróbias e armazenado sob diferentes temperaturas ambientais. Colostro de segunda e terceira ordenhas foram colhidos, misturados e armazenados em garrafas plásticas tipo PET, que foram cheias e ligeiramente pressionadas antes do seu fechamento, a fim de remover todo o espaço com o oxigênio, criando assim uma condição anaeróbica. As garrafas foram armazenadas em incubadora BOD com temperatura controlada (Tratamento 1 = $32,5 \pm 1^\circ\text{C}$, Tratamento 2 = $22,5 \pm 1^\circ\text{C}$) ou em sala escura à temperatura ambiente e abertas após 0, 1, 7, 14, 21, 28 e 35 dias, sendo três repetições por tempo de abertura para determinação de pH, acidez titulável, temperatura e concentrações de ácido láctico, nitrogênio total, nitrogênio não-protéico, caseína, lactose, glicose e gordura. Em seguida, as amostras de cada tratamento foram destinadas para determinação da contagem de bactérias ácido-láticas, enterobactérias, leveduras e bolores. Os valores de pH apresentaram significativa variação durante o período de armazenamento ($P < 0,0001$), com o colostro armazenado sob temperatura de $32,5^\circ\text{C}$ apresentando menores valores e redução acentuada logo nos primeiros dias de fermentação. Da mesma forma, a acidez titulável e a concentração de ácido láctico apresentaram alterações, porém com incrementos nas concentrações ao longo do período de armazenamento. O desenvolvimento de bactérias ácido-láticas foi intenso durante o processo fermentativo, principalmente quando o colostro foi armazenado em temperatura mais elevada. A temperatura ambiental também influenciou os resultados das frações nitrogenadas ($P < 0,0001$), com valores de nitrogênio não-protéico próximos a 50% do nitrogênio total e de caseína de 0,66% aos 35 dias de armazenamento, indicando intensa proteólise quando colostro foi armazenado a temperatura mais alta. Conforme esperado, as concentrações de lactose também foram reduzidas ao longo do processo fermentativo. Por outro lado, embora tenha sido observado efeito do tempo de armazenamento ($P < 0,0001$), as alterações nas concentrações de gordura não foram afetadas pela temperatura do ambiente onde o colostro foi armazenado ($P > 0,05$). Os resultados sugerem que a temperatura do ambiente onde o colostro é armazenado tem influência direta na velocidade e intensidade do desenvolvimento da população microbiana e da degradação dos principais parâmetros nutricionais, como a caseína e a lactose.

Palavras-chave: Aleitamento; Bezerros; Dieta líquida; Silagem de colostro; Substituto de leite

Abstract

The objective of this study was to characterize the fermentation, microbiological and nutritional dynamics of colostrum fermented under anaerobic conditions and stored under different ambient temperature. Colostrum from second and third milking were collected, mixed and stored in PET plastic bottles, which were filled and lightly pressed before its closure in order to remove all the space with oxygen, thereby creating an anaerobic condition. The bottles were stored in BOD incubators with controlled temperature (Treatment 1 = $32.5 \pm 1^\circ\text{C}$, Treatment 2 = $22.5 \pm 1^\circ\text{C}$) or in the dark with room temperature and opened after 0, 1, 7, 14, 21, 28 and 35 days, with three replicates per time for determination of pH, titratable acidity, temperature and concentrations of lactic acid, total nitrogen, non-protein nitrogen, casein, lactose, glucose and fat. Samples from each treatment were collected to determine the count of lactic acid bacteria, enterobacteria, yeasts and molds. The pH values showed significant variation during the storage period ($P < 0.0001$), with colostrum stored at 32.5°C exhibiting lower values and marked reduction in the first days of fermentation. Similarly, the titratable acidity and concentration of lactic acid showed marked changes, with increased values over the period of storage. The development of lactic acid bacteria was intense during the fermentation process, especially when colostrum was stored at the higher temperature. Ambient temperature also influenced the results of nitrogen fractions ($P < 0.0001$), with values of non-protein nitrogen close to 50% of total nitrogen and casein from of 0.66% at 35 days of storage, indicating intense proteolysis when colostrum was stored at higher temperature. As expected, the concentrations of lactose were also reduced during the fermentation process. On the other hand, although there was an effect of storage time ($P < 0.0001$), changes in concentrations of fat were not affected by ambient temperature ($P > 0.05$). The results suggest that the ambient temperature where the colostrum was stored directly influences the speed and intensity of microbial population development and degradation of the main nutritional parameters such as casein and lactose.

Keywords: Colostrum silage; Dairy calves; Liquid diet; Milk replacer

4.1 Introdução

O colostro excedente pode ser uma interessante alternativa de dieta líquida para animais em fase de aleitamento, rico em proteínas e gorduras e produzido em grande quantidade por vacas de alta produção (FOLEY; OTTERBY, 1978; DAVIS; DRACKLEY, 1998).

Entretanto, por não possuir valor de mercado, sua utilização fica restrita geralmente ao dia da colheita, sendo em algumas situações o excesso de produção descartado e não aproveitado. Apesar do conhecimento pela maioria dos produtores sobre o potencial de utilização dessa dieta líquida, a impossibilidade de armazenamento adequado, com necessidade investimentos financeiros na aquisição de freezers ou refrigeradores resulta no desinteresse pela sua utilização em vários sistemas de produção.

No entanto, como alternativa para a conservação e fornecimento futuro aos animais destaca-se a fermentação, onde o desenvolvimento de microrganismos benéficos, como as bactérias ácido-láticas e consequentemente a redução do pH possibilita a conservação do colostro excedente à temperatura ambiente, sem a necessidade de investimentos (POLZIN; OTTERBY; JOHNSON, 1976; FOLEY; OTTERBY, 1979; OTTERBY et al., 1980).

Porém, apesar da conservação do produto, uma grande variação nos resultados é observada quando o processo de fermentação é realizado sob diferentes condições de armazenamento, principalmente em relação à temperatura ambiente (JENNY; O'DELL; JOHNSON, 1976).

Dessa forma, a recomendação geral para o armazenamento do colostro durante a fermentação é que seja realizada em ambiente fresco, com temperatura abaixo de 25°C (FOLEY; OTTERBY, 1978). Trabalhos de pesquisa desenvolvidos na Europa e nos Estados Unidos afirmam que em épocas de clima frio o colostro ou o leite de transição podem ser armazenados sob condições ambientais, sem apresentar grandes alterações nas características físicas ou o surgimento de microrganismos indesejáveis (MULLER; SYHRE, 1974; CARLSON; MULLER, 1977).

Entretanto, essas afirmações podem não ser válidas para épocas do ano com temperatura elevada (acima de 30°C) ou às condições de clima encontradas em países tropicais, como o Brasil, o que mostra que em grande parte do país seria necessário o uso de um refrigerador. Recentemente, produtores da região Sul tiveram êxito na utilização de colostro fermentado anaerobicamente para o aleitamento de bezerras, o que resultou na adoção desta técnica por outros produtores no resto do país. No entanto, os mesmos resultados não têm sido observados por produtores de regiões mais quentes.

De acordo com Muller e Syhre (1974) durante o verão ocorre uma maior degradação de proteína durante a fermentação reduzindo ainda mais o valor nutritivo do alimento. Além disso, quando armazenado sob condições aeróbias e em clima quente, com temperaturas acima de 32°C, o colostro pode não apresentar fermentação adequada, sendo comum o surgimento de odor pútrido, resultando em rejeição pelos animais no momento do fornecimento. Jenny, O'Dell e Johnson (1976) reportam que, sob temperaturas mais altas, o desenvolvimento de microrganismos é otimizado e, dessa forma, a utilização dos principais componentes do colostro é aumentada, com reduções consideráveis nos teores de lactose e proteínas. Contudo, o sabor alterado deste produto pode reduzir o consumo e a aceitação pelos bezerros.

Embora a técnica apresentasse bons resultados quando o processo fermentativo foi realizado em países de clima ameno, em situações de temperaturas acima dos 30°C, bastante comuns na maior parte do Brasil, o processo fermentativo pode ser alterado. Além disso, os trabalhos publicados ao longo dos últimos anos descrevem o processo fermentativo e o fornecimento aos animais de colostro fermentado em contato com o ambiente externo, não sendo encontrados trabalhos que descrevam a utilização da fermentação anaeróbica como forma de conservação desse produto.

O objetivo deste estudo foi caracterizar a dinâmica fermentativa, microbiológica e nutricional de colostro bovino fermentado sob condições anaeróbias e armazenado sob diferentes temperaturas ambientais.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Silagem de colostro

O experimento foi realizado no Departamento de Zootecnia da "Luiz de Queiroz" Escola de Agricultura, da Universidade de São Paulo - USP / ESALQ, Piracicaba, SP, Brasil. Colostro proveniente de segunda e terceira ordenhas de vacas de diversas propriedades particulares da região foi colhido e composto para formação de um *pool*.

Em seguida, este *pool* foi subdividido em 63 garrafas plásticas tipo PET com capacidade de 500 mL, as quais foram preenchidas e levemente pressionadas antes de seu fechamento, de forma a retirar todo o espaço com oxigênio disponível, criando assim uma condição anaeróbia. Durante todo o processo de envase do colostro, o *pool* foi agitado, de forma a manter o material de forma homogênea. Após o envase, todas as garrafas foram armazenadas em incubadora BOD (Modelo TE-402, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) com temperatura controlada (Tratamento 1 = $32,5 \pm 1^\circ\text{C}$, Tratamento 2 = $22,5 \pm 1^\circ\text{C}$) ou em sala escura à temperatura ambiente (Tratamento 3), e abertas aos 0, 1, 7, 14, 21, 28 e 35 dias após a ensilagem, sendo utilizadas três repetições por tempo de abertura

4.2.2 Determinação do pH, acidez titulável e temperatura

Na data de cada abertura, sub-amostras de cada garrafa foram retiradas para determinação dos parâmetros que caracterizam o perfil de fermentação. As aferições do pH foram realizadas por leitura direta em medidor de pH digital (Digimed TE-902, DIGIMED Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e as de temperatura por leitura direta com o auxílio de um termômetro digital.

As determinações de acidez titulável foram realizadas conforme descrito pela Federation Internationale de Laiterie (1991). Resumidamente, em um béquer de 50 mL, aproximadamente 10 g de colostro fermentado foram pesados e diluídos em 10 mL de

água destilada. Após completa homogeneização, a amostra diluída foi titulada com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N até o ponto final (pH 8,3). Os cálculos dos valores de acidez titulável, expressos em graus Dornic ($^{\circ}$ Dornic), foram obtidos pela equação (1):

$$(1) \text{ Acidez titulável } (^{\circ}\text{Dornic}) = [(V \times f \times 0,9) / m] \times 100$$

Onde,

V = volume da solução de NaOH 0,1 N gasto na titulação, em mL;

f = fator de correção da solução de NaOH 0,1 N, igual a 1;

0,9 = fator de conversão para ácido láctico;

m = peso da amostra, em gramas.

4.2.3 Determinação da concentração de ácido láctico

As determinações das concentrações de ácido láctico foram realizadas a partir da metodologia proposta por Pryce (1969). Em tubos de plástico para centrífuga, 3,95 mL de reagente precipitante (Em um balão de 1L: 10 g de tungstato de sódio ($\text{Na}_2\text{O}_4\text{W}$) + 22 ml de ácido ortofosfórico 90% (H_3PO_4) + 5 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) + água destilada) foram adicionados a 50 μL do sobrenadante da amostra de colostro previamente centrifugada a 12.000 x g por 60 min. Imediatamente após a adição dos reagentes, os tubos foram agitados por aproximadamente 5 segundos e centrifugados por 5 minutos a 2.000 x g. Em seguida, 1,0 mL do sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio e, de forma rápida, 6,0 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) foram adicionados em cada tubo, sendo novamente agitados por 10 segundos. Após agitação, os tubos foram resfriados em água corrente e adicionados de 100 μL de reagente de coloração (1,5 g de p-hidroxibifenil em 100 ml de dimetilformamida, em balão de 100 mL), agitados e deixados em repouso por 10 minutos. Na etapa seguinte, os tubos foram transferidos para banho-maria com água fervente por aproximadamente 90 segundos, resfriados em água corrente e levados ao espectrofotômetro para leitura da

absorbância utilizando-se filtro de comprimento de onda de 565 nm. As soluções padrão foram obtidas através de diluição seriada da solução inicial de 4,0 mg/mL (2,13 g de lactato de lítio + 5 mL de H₂SO₄ + água destilada em balão volumétrico de 500 mL) e utilizadas na construção da curva padrão com as concentrações de 0; 0,25; 0,50; 1,0; 2,0 e 4,0 mg/mL.

4.2.4 Avaliações microbiológicas

Sub-amostras também foram utilizadas para a análise microbiológica, que foi realizada seguindo os procedimentos gerais (diluições, plaqueamento e contagem) descritos no "Standard Methods for the Examination of Dairy Products" (APHA, 1992). Para realizar as diluições decimais, 1,0 mL da sub-amostra foi adicionado a 9,0 mL de água estéril peptonada salina contida em tubos de ensaio, obtendo-se a diluição 10⁻¹. Em seguida, 1 mL da solução diluída a 10⁻¹ foi adicionado a 9,0 mL de água estéril peptonada salina, obtendo-se a diluição 10⁻² e sucessivamente até diluição necessária para inoculação e contagem.

Para a contagem de enterobactérias, placas do tipo Petrifilm® *enterobacteriaceae* (3M do Brasil®, Sumaré, SP, Brasil) foram inoculadas com 1,0 mL das diluições preparadas e, em seguida incubadas a 32,5±1°C em incubadora BOD Modelo TE-402 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) por 24±2 horas. Após o período de incubação, a contagem prosseguiu, considerando as colônias vermelhas com zonas amarelas e / ou colônias vermelhas com bolhas de gás, com ou sem bordas amarelas como positivas para enterobactérias.

A contagem de bactérias ácido-láticas também foi realizada com auxílio de placas do tipo Petrifilm® AC (3M do Brasil®, Sumaré, SP, Brasil) que foram incubadas em jaras de anaerobiose com gerador de atmosfera de anaerobiose (ANAEROBAC, Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil) em estufa BOD Modelo TE-402 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) a 32,5±1°C por 48±3 horas. Foram consideradas positivas para bactérias ácido-láticas as colônias vermelhas, independentemente do tamanho ou profundidade de cor.

As contagens de bolores e leveduras foram realizadas com o auxílio de placas tipo Petrifilm® YM (3M do Brasil®, Sumaré, SP, Brasil) que foram incubadas a $22,5 \pm 1^\circ\text{C}$ em incubadora BOD Modelo TE-402 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil). Para leitura do desenvolvimento das leveduras, após 3 dias de incubação, as colônias pequenas com bordas definidas e azul-esverdeadas foram contadas. Colônias grandes, escuras e com bordas difusas contadas após 5 dias de incubação, foram consideradas como sendo colônias de fungos.

4.2.5 Análises químico-bromatológicas

4.2.5.1 Lactose

As determinações da concentração de lactose foram realizadas de acordo com método proposto por Feitosa–Teles, Young e Stull (1978). Em um balão volumétrico de 100 mL, 2,0 mL de colostro fermentado foram diluídos em água destilada e agitados em seguida. Uma alíquota de 2,5 mL da amostra diluída foi transferida para um tubo plástico para centrífuga e acrescido de 0,2 mL de solução de sulfato de zinco 5% ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e 0,2 mL de hidróxido de bário 4,5% ($\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) e levado à centrifugação a $1.000 \times g$ por 1 minuto. Após centrifugação, 1,0 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo de vidro, adicionado de 2,5 mL de reagente Teles [uma parte de solução de fenol 1% ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$); duas partes de solução de hidróxido de sódio 5% (NaOH); duas partes de solução de ácido pícrico 1% ($\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$)]; uma parte de solução de bissulfito de sódio 1% (NaHSO_3)). Em seguida, os tubos foram imersos em água fervente, de forma que o fundo do tubo ficasse submerso por aproximadamente 6 minutos. Na etapa seguinte, os tubos foram rapidamente resfriados e em seguida completados até 12,5 ou 25 mL, dependendo do teor esperado de lactose da amostra. Após inverter os tubos de forma a homogeneizar as soluções, foi realizada leitura da absorbância em Sistema Automático para Bioquímica – Modelo SBA-200 (CELM, Barueri, SP, Brasil) utilizando-se filtro de 520 nm de comprimento de onda para todas as amostras e soluções padrão. As soluções padrão foram obtidas através de diluição

seriada da solução inicial de 1 mg/mL (1,052 g de lactose em 1000 mL de água destilada) e utilizadas na construção da curva padrão com as concentrações de 0; 0,125; 0,25; 0,50 e 1,0 mg/mL.

4.2.5.2 Gordura bruta

As extrações foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por Bligh e Dyer (1959) e adaptada por Manirakiza, Covaci e Schepens (2001). Aproximadamente 2,5 g de amostra foram pesados em tubos plásticos para centrífuga em balança analítica e adicionadas a 10 mL de metanol (MeOH) e 5 mL de clorofórmio (CHCl_3). Após agitação por 2 minutos, uma segunda porção de clorofórmio (CHCl_3) (5 mL) foi adicionada seguida de agitação por mais 2 minutos. Na etapa final, 4 mL de água destilada foram adicionados e os tubos foram levados a centrifugação a 4.000 rpm por 10 min. Após a centrifugação, a fase composta do clorofórmio (CHCl_3) + gordura foi isolada com auxílio de uma pipeta *Pasteur* em balão previamente tarado. Uma segunda extração foi realizada adicionando-se 10 mL de uma solução 10% (v/v) de metanol (MeOH) em clorofórmio (CHCl_3), seguido de agitação por 2 minutos. Após nova centrifugação, a fase clorofórmio (CHCl_3) + gordura foi adicionada ao conteúdo da primeira extração. O resíduo restante após evaporação dos solventes orgânicos foi pesado para obtenção da porcentagem de gordura da amostra.

4.2.5.3 Frações nitrogenadas

Amostras de colostro de cada tempo de abertura foram separadas e analisadas para nitrogênio total pelo método de micro-Kjeldahl, de acordo com metodologia proposta por Shahani e Sommer (1951). Em um tubo de vidro refratário, 5 mL de amostra foram diluídos em 95 mL de água destilada e adicionados a 3 mL de ácido sulfúrico acrescido de mistura catalítica [1 parte de sulfato de cobre (CuSO_4) + 10 partes de sulfato de potássio (K_2SO_4)]. Em seguida, os tubos foram colocados em bloco digestor até completa oxidação da matéria orgânica. Na etapa seguinte, 10 mL de água

foram adicionados a cada frasco que foi destilado em destilador de nitrogênio com adição de 10 mL de solução 50% de hidróxido de sódio (NaOH), sendo o volume destilado recuperado em frasco erlenmeyer contendo 30 mL de solução de ácido bórico. Após dobrar de volume, os frascos foram titulados em solução de ácido clorídrico 0,1 N (HCl), sendo o volume gasto anotado. A porcentagem de nitrogênio total das amostras foi calculada de acordo com a equação (2); os valores de proteína bruta foram estimados multiplicando-se os valores de nitrogênio total por 6,38 (fator de conversão para proteína do leite).

$$(2) \% \text{ NT} = [(\text{Vol HCl} \times 0,14) / \text{peso da amostra}] \times 100$$

Onde,

% NT = porcentagem de nitrogênio total da amostra

Vol HCl = volume de ácido clorídrico 0,1 N gasto na titulação, em mL

A fração nitrogênio não-protéico foi determinada conforme Shahani e Sommer (1951) na qual 10 mL de amostra foram diluídas em 40 mL de solução de ácido tricloroacético 15% (TCA) por aproximadamente 15 min. Em seguida, o conteúdo foi filtrado em papel filtro (Whatman nº1), sendo uma alíquota de 10 mL do filtrado analisada conforme método de micro-Kjeldahl descrito anteriormente.

A fração nitrogênio não-caseína também foi obtida conforme Shahani e Sommer (1951). Em um frasco do tipo erlenmeyer, 10 mL de amostra foram diluídos em 90 mL de água destilada e acrescidos de 1,0 mL de solução de ácido acético (CH_3COOH) 10%. Em seguida, os frascos foram colocados em banho-maria a 40°C por aproximadamente 10 min. Após esse período, os frascos foram retirados e 1,0 mL de solução de acetato de sódio 1N foi adicionado. O extrato livre de caseína foi obtido pela filtração em papel filtro (Whatman nº1) e, em seguida, 10 mL do filtrado foram utilizados para determinação de nitrogênio pelo método de micro-Kjeldahl descrito. Dessa forma, o valor de N-caseína foi obtido através da subtração da fração N não-caseína da fração N total, sendo considerado como caseína o resultado da multiplicação da fração N-caseína por 6,38.

4.2.5.4 Glicose

As concentrações de glicose foram determinadas a partir do kit enzimático GLICOSE HK LIQUIFORM – Ref.: 85 (LABTEST Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil) por espectrofotometria de ponto final, utilizando-se filtro de absorvância de 505 nm de comprimento de onda em Sistema Automático para Bioquímica – Modelo SBA-200 (CELM, Barueri, SP, Brasil). Uma alíquota de 4 µL da amostra foi pipetada em cubetas de reação, acrescida de 400 µL de reagente fornecido pelo kit. Após período de incubação de 10 minutos, foi realizada a leitura da absorvância para obtenção dos valores de glicose. Para calibração do equipamento, solução padrão fornecida com o kit enzimático com concentração de 100 mg/dL de glicose foi analisada a cada rodada.

4.2.6 Análise estatística

Os dados dos parâmetros de caracterização do perfil de fermentação (pH, acidez titulável, ácido láctico e temperatura), avaliações microbiológicas e nutricional (lactose, gordura bruta, frações nitrogenadas e glicose) foram analisados como delineamento inteiramente ao acaso com auxílio do procedimento dos modelos lineares generalizados (GLM) do pacote estatístico SAS (version 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC), conforme modelo (3). Cada garrafa aberta foi considerada como uma unidade experimental, sendo utilizadas três repetições por tempo de abertura. Para as análises dos dados de avaliação microbiológica os dados foram ajustados para $\log_{10}$ e posteriormente avaliados. Para efeito de comparação de médias entre os tempos de abertura, foi utilizado o teste de Tukey, com nível de significância de 5%. As equações de regressão dos gráficos foram desenvolvidas procedimento REG e as análises descritivas foram realizadas pelo procedimento UNIVARIATE do pacote estatístico SAS (version 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC) para todos os parâmetros estudados.

$$(3) Y_{ij} = \mu + T p_i + T_j + E_{ij}$$

Onde,

Y_{ij} = variável resposta

μ = média geral

$T p_i$ = efeito do tempo de abertura

T_j = efeito da temperatura ambiental

E_{ij} = efeito devido ao acaso (resíduo)

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Dinâmica fermentativa

Os valores de pH, acidez titulável e concentração de ácido láctico, apresentaram efeito direto da temperatura do ambiente onde o colostro foi armazenado, assim como efeito do tempo de armazenamento (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Valores médios, mínimos e máximos de pH, acidez titulável, concentração de ácido láctico e temperatura observados em colostro fermentado sob condições anaeróbicas e armazenado em diferentes temperaturas ambientais

Item	Temperatura			Intervalo (Mín.-Máx.)	EPM ⁽²⁾	P < ⁽³⁾	
	32,5°C	22,5°C	Ambiente (17,4- 21,5°C)			T(°C)	Tempo
pH	4,28 ^b	4,69 ^a	4,82 ^a	3,47 – 6,27	0,035	<,0001	<,0001
Acidez titulável ⁽¹⁾	290 ^a	189 ^b	171 ^b	32,3 – 486,4	7,5	<,0001	<,0001
Ácido láctico, mg/dL	25,3 ^a	15,6 ^b	14,4 ^b	3,05 – 34,88	0,49	<,0001	<,0001
Temperatura, °C	29,0 ^a	21,3 ^b	19,9 ^b	17,4 - 31,4	0,33	<,0001	<,0001

⁽¹⁾ Valores de acidez titulável expressos em °Dornic

⁽²⁾ EPM = erro padrão da média

⁽³⁾ T(°C) = efeito da temperatura; Tempo = efeito do tempo de armazenamento

^{a,b,c} Letras minúsculas na mesma linha diferem para P<0,05

Os resultados mostram que, embora o pH inicial fosse semelhante para todos os tratamentos, já que se tratava de um único *pool* de colostro, quando armazenado sob condições de temperatura mais elevadas (32,5°C), o pH apresentou rápido declínio (Figura 4.1).

Figura 4.1 – Efeito do tempo de armazenamento no pH de colostro fermentado sob condições anaeróbicas e armazenado em diferentes temperaturas ambientais

Muller e Syhre (1974) observaram comportamento semelhante de queda acentuada do pH quando colostro fermentado sob condições aeróbicas foi armazenado

em ambiente com temperatura de 32°C ou 39°C. Segundo os autores, o pH atingiu valores entre 3,5 e 3,7 em nove dias de fermentação, enquanto que o colostro armazenado sob temperatura mais amena (21°C) apresentou queda menos significativa, chegando ao menor valor de 4,4.

No presente estudo, o pH atingiu valores próximos de 3,5 entre 7 e 14 dias de fermentação quando armazenado em ambiente com 32,5°C (Figura 4.1). A evolução dos valores de pH do colostro fermentado e armazenado em temperatura mais amena (22,5°C) ou a temperatura ambiente (entre 17,4 e 21,5°C) ocorreu de maneira lenta, e mesmo ao final do período avaliado (35 dias) apresentavam valores superiores aos encontrados no colostro armazenado a 32,5°C (Figura 4.1).

Dados sobre o processo fermentativo de colostro armazenado sob condições anaeróbicas e com diferentes condições de temperatura ambiental são escassos. Bush, McQueen e Nicholson (1980) também observaram acentuada queda no pH de colostro conservado sob condições aeróbicas. Segundos os autores, o rápido declínio nos valores de pH está relacionado diretamente com o maior desenvolvimento de bactérias lácticas, e, conseqüentemente, maior produção de ácido láctico.

Muller e Syhre (1974) reportam que, embora o pH apresente declínio mais rápido quando o colostro é fermentado em ambientes com temperatura acima de 32°C, essa queda parece ser pouco estável. Esses autores reportam que aumentos no pH do colostro após 21 dias de armazenamento são comuns e estão relacionados com a concentração de proteína inicial.

O trabalho de Reuter e Smith (1977) verificou que, quanto maior a concentração protéica do colostro, e quanto mais alta a temperatura no local de armazenamento, menor é a estabilidade do pH e da acidez e, conseqüentemente, menor é o tempo possível de conservação. Segundo Rindsig, Janecke e Bodoh (1977), o rápido desenvolvimento de microrganismos proteolíticos em condições de temperatura ambiente acima de 32°C é um dos principais fatores observados como responsáveis por flutuações no pH.

Alterações nas características físicas do colostro puderam ser observadas claramente após poucos dias de fermentação, com diferenças entre os tratamentos. Dentre as mais importantes, foi possível observar que o colostro armazenado sob

temperatura mais alta apresentou separação visual dos sólidos, em camadas bastante distintas, com poucos dias de armazenamento. Logo no primeiro dia, foi possível verificar a precipitação dos sólidos para o fundo da garrafa e a camada de gordura separada na parte superior, acima do soro. Para os outros tratamentos, essa separação foi observada entre 7 e 14 dias de fermentação. Outro ponto bastante importante está relacionado às características organolépticas do colostro armazenado a 32,5°C que, no momento da abertura, sempre apresentava odor pútrido, característico de intensa atividade proteolítica.

Outros autores verificaram alterações semelhantes quando colostro foi fermentado em ambiente com temperaturas mais elevadas. Jenny, O'Dell e Johnson (1976) relatam odor pútrido e mofo quando colostro foi armazenado a mais de 27°C, assim como Rindsig, Janecke e Bodoh (1977) em colostro armazenado em temperaturas entre 32 e 39°C.

Estes resultados levaram vários autores a indicar o descarte do produto nessas condições, já que o consumo pelos animais é baixo, havendo quase que totalidade de rejeição (MULLER; LUDENS; ROOK, 1976).

O declínio no pH acompanhou o aumento na acidez titulável, sendo esta resposta mais acentuada quanto maior a temperatura de armazenamento (Tabela 4.1; Figura 4.2).

Dinâmica semelhante nos dados de acidez titulável foi observada por outros autores em estudos com fermentação de colostro sob condições aeróbicas e armazenado em temperatura entre 27°C e 39°C (OTTERBY; DUTTON; FOLEY, 1977; CARLSON; MULLER, 1977; JENNY; O'DELL; JOHNSON, 1977).

Figura 4.2 – Efeito do tempo de armazenamento na acidez titulável (°Dornic) de colostro fermentado sob condições anaeróbicas e armazenado em diferentes temperaturas ambientais

Conforme esperado, efeito semelhante foi observado para a concentração de ácido láctico, que apresentou maiores valores para colostro armazenado em condições de ambiente mais quente. Por outro lado, quando armazenado à temperatura ambiente ou em condição de temperatura mais amena, apesar do aumento ao longo do tempo de fermentação ($P < 0,0001$), apresentaram valores semelhantes (Tabela 4.1; Figura 4.3).

Figura 4.3 – Efeito do tempo de armazenamento nas concentrações de ácido láctico (mg/mL) de colostro fermentado sob condições anaeróbicas e armazenado em diferentes temperaturas ambientais

Bush, McQueen e Nicholson (1980) e Otterby et al. (1980) também reportam rápido aumento nas concentrações de ácido láctico acompanhando os dados de pH e acidez titulável em colostro fermentado sob condições aeróbicas.

As aferições da temperatura no momento da abertura das garrafas refletiram as diferenças em relação á temperatura ambiente. Apesar do efeito significativo ($P < 0,0001$), é possível observar que o processo fermentativo não influenciou a temperatura do colostro durante a armazenagem, sendo sempre próxima à temperatura do ambiente onde estava armazenado (Figura 4.4). O efeito da temperatura no

processo fermentativo fica mais evidente quando se observa as variações na temperatura do colostro armazenado à temperatura ambiente e o armazenado sob condições controladas de 22,5°C. Como apresentaram variações na temperatura praticamente iguais, com variação entre 1-3°C, a maioria dos parâmetros avaliados neste estudo mostrou comportamento semelhante entre esses dois tratamentos.

Figura 4.4 – Efeito do tempo de armazenamento na temperatura (°C) de colostro fermentado sob condições anaeróbicas e armazenado em diferentes temperaturas ambientais

4.3.2 Dinâmica microbiológica

A temperatura do ambiente influencia diretamente o desenvolvimento de microrganismos ($P < 0,05$; Tabela 4.2), com rápido crescimento desde os primeiros dias de fermentação. O intenso desenvolvimento microbiológico era esperado e foi relatado na maioria dos trabalhos de pesquisa com colostro fermentado (PALMER; MUDD, 1972; ELLINGER; MULLER; GLANTZ, 1980; WOUTERS et al., 2002).

A contagem total de bactérias ácido-láticas e enterobactérias mostram que, embora apresentasse um acentuado desenvolvimento durante os primeiros dias de fermentação, quando armazenado em $32,5^{\circ}\text{C}$, foi observado declínio no início do processo (Figura 4.5; Figura 4.6).

Tabela 4.2 – Valores médios, mínimos e máximos observados de contagens totais de microrganismos em colostro fermentado sob condições anaeróbicas e armazenado em diferentes temperaturas ambientais

Contagem total ($\log_{10}$ UFC/ mL)	Temperatura			Intervalo (Mín.-Máx.)	EPM ⁽¹⁾	$P < $ ⁽²⁾	
	32,5°C	22,5°C	Ambiente (17,4- 21,5°C)			T(°C)	Tempo
Ácido-láticas ⁽³⁾	6,52 ^b	7,64 ^a	7,71 ^a	4,60–8,85	0,10	<,0001	<,0001
Enterobactérias	1,38 ^b	2,75 ^a	3,35 ^a	0,0 – 6,38	0,24	0,0007	<,0001
Leveduras	4,18 ^a	3,77 ^b	3,42 ^c	1,0 – 8,0	0,09	0,0005	<,0001
Fungos e bolores	0,25 ^b	1,04 ^a	0,54 ^b	0,0 – 2,48	0,09	0,0007	<,0001

⁽¹⁾ EPM = erro padrão da média

⁽²⁾ T(°C) = efeito da temperatura; Tempo = efeito do tempo de armazenamento

⁽³⁾ BAL = bactérias ácido-láticas

^{a,b,c} Letras minúsculas na mesma linha diferem para $P < 0,05$

Outros estudos também relatam essa dinâmica nas contagens desses microrganismos, com rápido crescimento inicial, seguido de declínio geralmente após aproximadamente um mês de armazenamento (JENNY; O'DELL; JOHNSON, 1977; RINDSIG; JANECKE; BODOH, 1977). Entretanto, como os trabalhos encontrados na literatura reportam o desenvolvimento microbiológico de colostro ou leite somente sob

condições aeróbias, a dinâmica microbiológica observada no presente estudo apresenta algumas diferenças por se tratar de fermentação de colostro em condição anaeróbica.

Figura 4.5 – Efeito do tempo de armazenamento nas contagens de bactérias ácido-láticas (log₁₀ UFC/mL) em colostro fermentado sob condições anaeróbicas e armazenado em diferentes temperaturas ambientais

O desenvolvimento de bactérias ácido-láticas é acelerado quando a fermentação é realizada em condições de temperatura entre 20-30°C e sob condições anaeróbicas. Nessas condições, além do rápido desenvolvimento, ocorre um intenso consumo dos principais componentes do colostro ou do leite, resultando em baixas concentrações de lactose e proteínas após poucos dias de fermentação (ROBINSON; TAMIME, 1999). O consumo da lactose pelos microrganismos resulta na produção de ácido lático, sendo

observado um rápido declínio no pH e concomitante aumento na acidez titulável (Figura 4.1; Figura 4.2). Entretanto, a maioria das bactérias ácido-láticas e enterobactérias, é sensível a baixo pH e, dessa forma, seu desenvolvimento acaba sendo inibido, geralmente quando o pH atinge valores abaixo de 4,0, assim como observado no presente estudo (Figura 4.5; Figura 4.6).

Segundo Jenny, O'Dell e Johnson (1977), embora maiores temperaturas ambientais possam acelerar o processo, com adequada queda de pH, desenvolvimento de bactérias lácticas e inibição de enterobactérias, a maior acidez pode levar a rejeição de consumo pelos animais. Assim, a adoção dessa técnica de conservação do colostro em países de clima quente como o Brasil pode resultar em um grande desafio ao produtor, se um ambiente adequado, com temperatura amena não for encontrado na propriedade.

O desenvolvimento de enterobactérias foi influenciado tanto pela temperatura do ambiente onde o colostro foi armazenado ($P=0,0007$), quanto pelo tempo de armazenamento ($P<0,0001$; Tabela 4.2). O rápido declínio do pH no colostro fermentado em alta temperatura ($32,5^{\circ}\text{C}$), com valores abaixo de 4,0 logo após 7 dias de fermentação, possivelmente criou um ambiente pouco favorável ao desenvolvimento da maioria das enterobactérias, como a *Salmonella* e a *Escherichia coli* (Figura 4.6).

Como o colostro fermentado não é submetido a nenhum tratamento físico, como pasteurização ou aquecimento antes do início da fermentação, as populações de microrganismos indesejáveis, como as enterobactérias, estão sempre presentes. Thompson e Marth (1976) destacam que quando trabalhos com o isolamento desses microrganismos são conduzidos, é observado que 44% desses são *Escherichia coli*, 8% *Enterobacter aerogenes* e 48% de outros agentes. Como esses microrganismos são os principais causadores de diarreia em animais em aleitamento, o armazenamento do colostro para fermentação em ambiente de clima mais quente pode ser eficiente no controle desses patógenos.

Estudos com avaliação de enterobactérias no colostro fermentado sempre mostram reduções nas populações com o tempo de armazenamento (STEWART et al., 2005). Segundo Foley e Otterby (1978), a contagem de *Salmonellae* é geralmente baixa quando o processo fermentativo ocorre em temperatura abaixo de 16°C . Por outro lado,

sob temperaturas mais elevadas (acima de 30°C), reduções desses microrganismos somente são observadas quando há redução de pH.

Figura 4.6 – Efeito do tempo de armazenamento nas contagens enterobactérias (log₁₀ UFC/mL) em colostro fermentado sob condições anaeróbicas e armazenado em diferentes temperaturas ambientais

Loveland, Kesler e Doores (1983) estudando parâmetros fermentativos e o desenvolvimento microbiológico em colostro e leite descartado observaram comportamento semelhante. Jenny, O'Dell e Johnson (1976) avaliaram o desenvolvimento de enterobactérias em colostro armazenado sob clima frio (8-15°C) e clima quente (20-27°C) e também observaram declínio acentuado nas populações destes microrganismos logo nos primeiros dias quando o colostro foi armazenado em

ambiente quente. Por outro lado, da mesma forma que no presente estudo, quando armazenado sob temperaturas mais amenas, a queda na população de enterobactérias foi mais lenta.

Também foram observadas diferenças no crescimento de leveduras e bolores no colostro armazenado sob diferentes temperaturas ambientais ($P < 0,05$; Tabela 4.2). O desenvolvimento de bolores e fungos, apesar de pequeno, é um indicativo de contaminação do colostro, que muitas vezes é coletado sem cuidados com a higiene, em recipientes sujos e contaminados.

Embora o armazenamento sob condições de temperatura mais elevada ($32,5^{\circ}\text{C}$) tenha inibido o desenvolvimento de enterobactérias e reduzido a população de ácidoláticas, nessas mesmas condições as populações de leveduras aumentaram nos primeiros dias de fermentação (Figura 4.7).

Segundo Wouters et al. (2002), em condições de pH próximo ou abaixo de 4,0, ou seja, quando a maioria das bactérias tem seu crescimento retardado, leveduras fermentadoras de lactose tem seu crescimento favorecido. Também, há aumento nas populações de leveduras não fermentadoras de lactose, porém, eficientes em utilizar a galactose proveniente da fermentação e hidrólise da lactose pelas bactérias. Porém, independente do tipo de levedura presente, a fermentação da lactose ou da galactose por esses microrganismos é do tipo alcoólica, levando à formação de vários compostos, principalmente o etanol.

Robinson e Tamime (1999) destacam que apesar de presentes nos produtos lácteos, leveduras e mofos tem seu crescimento lento. Entretanto, quando há condições ideais para seu desenvolvimento, como temperatura adequada e substrato disponível, o rápido desenvolvimento de leveduras leva a intensa degradação de proteínas, principalmente a caseína, tornando o produto lácteo fermentado com aspecto viscoso e denso. No presente estudo, no momento da abertura, as garrafas armazenadas sob temperatura de $32,5^{\circ}\text{C}$ apresentavam aspecto como descrito pelos autores, viscoso e de difícil homogeneização.

Jenny, O'Dell e Johnson (1976) também reportam que em temperaturas mais altas pode ocorrer a formação de mofo e a decomposição de proteínas. Rindsig, Janecke e Bodoh (1977) observaram maior crescimento de fungos e leveduras quando

colostro foi armazenado em temperaturas mais altas. Segundo os autores, da mesma forma que no presente estudo, o desenvolvimento desses microrganismos parece ter sido favorecido pelo abaixamento do pH, assim como relatado por Muller e Smallcomb (1977).

Figura 4.7 – Efeito do tempo de armazenamento nas contagens leveduras (log10 UFC/mL) em colostro fermentado sob condições anaeróbicas e armazenado em diferentes temperaturas ambientais

4.3.3 Composição nutricional

Os efeitos da temperatura do ambiente onde o colostro foi armazenado podem ser observados nas alterações dos principais sólidos, como a lactose e as frações nitrogenadas ($P < 0,05$). Por outro lado, as concentrações de gordura e glicose não foram afetadas pela temperatura, embora efeito do tempo de armazenamento tenha sido observado para esses parâmetros (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 - Composição nutricional de colostro fermentado sob condições anaeróbicas e armazenado em diferentes temperaturas ambientais

Item, %	Temperatura			Intervalo (Mín.-Máx.)	EPM ⁽⁴⁾	P < ⁽⁴⁾	
	32,5°C	22,5°C	Ambiente (17,4- 21,5°C)			T(°C)	Tempo
Lactose	2,60 ^b	3,80 ^a	3,39 ^a	1,08 – 5,50	0,12	0,0002	<,0001
Glicose, % ⁽¹⁾	1,76	1,65	1,52	0,14 – 10,2	0,26	0,83	<,0001
Gordura	5,08	5,12	5,29	4,05 – 5,38	0,06	0,07	<,0001
Nitrogênio total	0,91 ^c	1,22 ^b	1,34 ^a	0,58 – 1,61	0,03	<,0001	<,0001
Proteína bruta	5,83 ^c	7,77 ^b	8,58 ^a	3,7 – 10,3	0,17	<,0001	<,0001
Caseína, % do NT	17,11 ^b	37,84 ^a	35,63 ^a	14,5 - 43,5	0,63	<,0001	0,002
Caseína	0,96 ^b	2,91 ^a	3,07 ^a	0,66 – 4,64	0,09	<,0001	<,0001
NNP, % do NT ⁽²⁾	22,96 ^a	10,12 ^b	8,32 ^b	3,7 - 47,1	1,09	<,0001	<,0001

⁽¹⁾ % peso/volume

⁽²⁾ NNP = nitrogênio não-protéico;

⁽³⁾ EPM = erro padrão da média

⁽⁴⁾ T(°C) = efeito da temperatura; Tempo = efeito do tempo de armazenamento

^{a,b,c} Letras minúsculas na mesma linha diferem para $P < 0,05$

A lactose é o principal substrato utilizado pelos microrganismos para sobrevivência e tem como consequência do seu metabolismo a produção de ácido láctico. Como o armazenamento sob temperatura mais elevada resultou em um rápido declínio do pH e alta acidez titulável, a concentração de lactose apresentou o efeito esperado, com rápido declínio nos primeiros 7 dias de fermentação. Quando

armazenado sob temperatura mais amena (22,5°C ou à temperatura ambiente), embora o esperado efeito de declínio nas concentrações de lactose tenha sido observado, as reduções ocorreram de maneira gradativa, ao longo do processo fermentativo.

Dessa forma, a dinâmica observada para as concentrações de lactose (Figura 4.8) confirma os resultados observados para os valores de pH (Figura 4.1), acidez titulável (Figura 4.2) e concentração de ácido lático (Figura 4.3).

Figura 4.8 – Efeito do tempo de armazenamento nas concentrações de lactose (%) em colostro fermentado sob condições anaeróbicas e armazenado em diferentes temperaturas ambientais

Alterações significativas nas concentrações de lactose são observadas em todos os estudos com os efeitos da fermentação de colostro nos principais sólidos totais. Estudos com isolamento de microrganismos mostram que a redução da lactose pode chegar a mais de 80% da concentração do colostro *in natura* quando a população de bactérias ácido-láticas está presente em quantidade abundante (BUSH; McQUEEN; NICHOLSON, 1980). Yu, Stone e Wilson (1975) não observaram reduções significativas nas concentrações de lactose nos primeiros sete dias de armazenamento. Porém, após 35 dias, foi observado apenas 22% da concentração original de lactose no colostro fermentado em condições de clima entre 16-24°C, semelhantes às observadas para o colostro armazenado à temperatura ambiente e à 22,5°C no presente estudo.

Conforme esperado, devido à intensa atividade e crescimento microbiano observados, a proteína bruta do colostro armazenado sob 32,5°C apresentou redução significativa ($P < 0,0001$), com redução do valor inicial de 10% a valores próximos a 4% após 35 dias de fermentação.

Efeitos do tempo de armazenamento também foram observados para os valores de proteína bruta de colostro fermentado sob temperatura ambiente ou de 22,5°C ($P < 0,0001$), porém, com maiores valores ao final de 35 dias de avaliação (Figura 4.9).

Resultados com alterações nas concentrações de proteína bruta na literatura são variáveis e geralmente dependentes das condições ambientais nas quais o colostro foi fermentado. De maneira geral, em condições de clima mais quente, alterações nas concentrações de nitrogênio total e, conseqüentemente de proteína bruta ($NT \times 6,38$) são mais intensas, indicando maior atividade proteolítica (SEIDEL; SHELLENBERGER, 1975; YU; STONE; WILSON, 1975; CARLSON; MULLER, 1977). Quando as condições de clima são mais amenas, ou seja, abaixo de 25°C, decréscimos são observados, porém com menor intensidade (OTTERBY, JOHNSON; POLZIN, 1976).

Figura 4.9 – Efeito do tempo de armazenamento nas concentrações de proteína bruta (%) em colostro fermentado sob condições anaeróbicas e armazenado em diferentes temperaturas ambientais

Reduções significativas foram observadas principalmente nos valores de caseína (Figura 4.10). A intensa redução nas concentrações de caseína no colostro armazenado a 32,5°C corrobora os dados observados de aumento do nitrogênio não-protéico (Figura 4.11) e redução da proteína bruta (Figura 4.9).

Com o favorecimento do desenvolvimento de microrganismos pela temperatura mais alta, a caseína passou a ser utilizada com maior intensidade. Uma comprovação da maior proteólise foi a maior viscosidade observada no colostro armazenado a 32,5°C quando comparado com o armazenado a 22,5°C ou à temperatura ambiente. De acordo com McMartin et al. (2006), quando ocorre a desnaturação de proteínas é sempre

observado aumento da viscosidade do colostro, principalmente pela precipitação da caseína.

Figura 4.10 – Efeito do tempo de armazenamento nas concentrações de caseína (%) em colostro fermentado sob condições anaeróbicas e armazenado em diferentes temperaturas ambientais

Estudo de Polzin, Otterby e Johnson (1976) sobre o efeito da época de armazenamento do colostro (inverno ou verão) na degradação de proteínas mostrou redução mais intensa quando a fermentação ocorreu em época de temperaturas mais elevadas. Foley, Hunter e Otterby (1978) reportam resultado semelhante, com redução significativa da caseína durante o processo fermentativo.

Como é precipitada facilmente em ambiente ácido, o maior desenvolvimento microbiano e a elevada produção de ácido láctico pode ter sido responsável pela redução ainda maior das concentrações de caseína. Rindsig, Janecke e Bodoh (1977) sugerem que a redução do pH apresenta relação direta com a maior precipitação da caseína, principalmente em colostro sob temperatura mais elevada.

Corroborando os resultados observados de intensa redução nas concentrações de proteína bruta e caseína, o acondicionamento do colostro em temperatura mais elevada resultou em processo de intensa proteólise, com valores de nitrogênio não-protéico chegando a 47% do nitrogênio total ao final de 35 dias de fermentação (Figura 4.11), enquanto que, sob temperaturas mais amenas, os valores de nitrogênio não-protéico ficaram entre 15 e 20% do nitrogênio total.

Esses resultados de aumento intenso na fração nitrogênio não-protéico confirmam os resultados de contagem de leveduras e mofos e o odor pútrido nas garrafas armazenadas em temperatura de 32,5°C. Outros autores observaram resultados semelhantes quando a fermentação do colostro ocorreu sob condições de temperatura acima de 30°C, com relatos de casos de rejeição de consumo de colostro nessas condições (MULLER; LUDENS; ROOK, 1976; RINDSIG, 1976; OTTERBY et al., 1980).

Muller e Smallcomb (1977) observaram valor máximo de NNP de 37% do N total quando colostro foi armazenado em ambiente a 39°C. Otterby, Dutton e Foley (1977) reportam valores ainda maiores, chegando a 47% do N total após 28 dias de fermentação sob condições de 37°C. No presente estudo, valores semelhantes foram observados, embora a temperatura fosse menor (32,5°C), com a concentração de nitrogênio não-protéico chegando a 47% do N total em 35 dias de armazenamento (Figura 4.9).

Os valores de nitrogênio não-protéico observados para o colostro armazenado à temperatura ambiente ou à 22,5°C também apresentaram aumento, porém com menor intensidade, comportamento semelhante ao observado com outros autores quando colostro foi fermentado sob temperaturas mais amenas (MULLER; BEARDSLEY; LUDENS, 1974; OTTERBY; DUTTON; FOLEY, 1977; CARLSON; MULLER, 1977).

Figura 4.11 – Efeito do tempo de armazenamento nas concentrações de nitrogênio não-protéico (% do NT) em colostro fermentado sob condições anaeróbicas e armazenado em diferentes temperaturas ambientais

As concentrações de gordura não foram influenciadas pela temperatura ambiental ($P>0,05$), embora efeitos do tempo de armazenamento tenham sido observados ($P<0,0001$).

Otterby, Dutton e Foley (1976) em experimento bastante semelhante ao presente estudo também não observaram efeito nas concentrações de gordura, embora os outros sólidos totais apresentassem grande variação.

Foley, Hunter e Otterby (1978) também não reportam alterações nas porcentagens de gordura do colostro que, segundo os autores, é a fração menos alterada durante o processo fermentativo. Resultados semelhantes foram obtidos por

Muller e Smallcomb (1977), que não observaram alterações importantes na porcentagem de gordura, com proporção final igual a 90% ou mais da porcentagem inicial observada.

Figura 4.12 – Efeito do tempo de armazenamento nas concentrações de gordura (%) em colostro fermentado sob condições anaeróbicas e armazenado em diferentes temperaturas ambientais

4.4 Conclusões

A temperatura do ambiente onde o colostro é armazenado tem influência direta na velocidade e intensidade da degradação dos principais parâmetros nutricionais, como a caseína e a lactose, e crescimento de microrganismos indesejáveis. Assim, a utilização de colostro fermentado anaerobicamente como substituto de leite para bezerras leiteiras pode não ser adequada, principalmente quando o processo fermentativo for realizado em locais de clima quente.

Referências

APHA **Standard methods for the examination of water and wastewater.**

Washington: American Public Health Association, 1992. 46p.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification.

Canadian Journal of Biochemistry Physiology, Ottawa, v.37, p.911-917, 1959.

BUSH, R.S.; MCQUEEN, R.E.; NICHOLSON, J.W.G. Chemical changes in bovine colostrum preserved with formalin or by fermentation. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.63, p.464-470, 1980.

CARLSON, S.M.A.; MULLER, L.D. Compositional and metabolic evaluation of colostrum preserved by four methods during warm ambient temperatures. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.60, p.566, 1977.

DAVIS, C.L.; DRACKLEY, J.K. **The development, nutrition, and management of the young calf.** Ames: Iowa State University Press, 1998. 339p.

ELLINGER, D.K.; MULLER, L.D.; GLANTZ, P.J. Influence of feeding fermented colostrum and lactobacillus acidophilus on fecal flora of dairy calves. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.63, p.478-482, 1980.

FEDERATION INTERNATIONALE DE LAITERIE **Yaourt: détermination de l'acidité titrable (methode potenciométrique).** Bruxelles: Federation Internationale de Laiterie, 1991. 1v.

FEITOSA-TELES, F.F.; YOUNG, C.K.; STULL, J.W. A method for rapid determination of lactose. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.61, p.506-508, 1978.

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

FOLEY, J.A.; OTTERBY, D.E. Performance of calves fed colostrum stored by freezing, fermentation, or treatment with lactic or adipic acid. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.62, p.459-467, 1979.

FOLEY, J.A. HUNTER, A.G. OTTERBY, D.E. Absorption of colostral proteins by newborn calves fed unfermented, fermented, or buffered colostrum. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.61, p.1450-1456, 1978.

JENNY, B.F.; O'DELL, G.D.; JOHNSON, M.G. Microbial and acidity changes in colostrum fermented by natural flora at low and high ambient temperatures. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.60, p.453, 1976.

LOVELAND, J.; KESLER, E.M.; DOORES, S. Fermentation of a mixture of wastemilk and colostrum for feeding young calves. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.66, p.1312, 1983.

MARINAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Comparative Study on Total Lipid Determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer Extraction Methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, Amsterdam, v.14, p.93-100, 2001.

McMARTIN, S.; GODDEN, S.; METZGER, L.; FEIRTAG, J.; BEY, R.; STABEL, J.; GOYAL, S.; FETROW, J.; WELLS, S.; CHESTER-JONES, H. Heat treatment of bovine colostrum. I: Effects of temperature on viscosity and immunoglobulin G Level. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 89, p.2110–2118, 2006.

MULLER, L.D.; SMALLCOMB, J. Laboratory evaluation of several chemicals for preservation of excess colostrum. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.60, p.627, 1977.

MULLER, L.D.; LUDENS, F.C.; ROOK, J.A. Performance of calves fed fermented colostrum or colostrum with additives during warm ambient temperatures **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.59, p.930-935, 1976.

MULLER, L.D.; BEARDSLEY, G.L.; LUDENS F.C. Amounts of sour colostrum for growth and health of calves. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.58, p.1360, 1975.

MULLER, L.D.; SYHRE, D.R. Influence of chemicals and bacterial cultures on preservation of colostrum. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.58, p.957, 1974.

OTTERBY, D.E.; JOHNSON, D.G.; POLZIN, H.W. Fermented colostrum or milk replacer for growing calves. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.59. p.201-204, 1976.

OTTERBY, D.E.; DUTTON, R.E.; FOLEY, J.A. Comparative fermentations of bovine colostrum milk. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.60, p.73, 1976.

OTTERBY, D.E. ; JOHNSON, D.G.; FOLEY, J.A.; TOMSCHE, D.S. ; LUNDQUIST, R. G.; HANSON, P.J. Fermented or chemically-treated colostrum and nonsalable milk in feeding programs for calves. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.63. p.951-958, 1980.

PALMER, G.H.; MUDD, A.J. A note on the growth of some micro-organisms in stored bovine colostrum. **Journal of Dairy Research**, Amsterdam, v.39, p.227, 1972.

POLZIN, H.W.; OTTERBY, D.E. ; JOHNSON, D.G. Responses of calves fed fermented or acidified colostrum. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.60, p.224, 1977.

PRYCE, J.D. A modification of the Barker-Summeson method for the determination of lactic acid. **Analyst**, London, v.94, p. 1151-1152, 1969.

REUTER, J.W.; SMITH, N.E. Effects of temperature and milk composition on fermentation of colostrum and whole milk. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.60, p.73, 1977.

RINDSIG, R.B. Sour colostrum dilutions compared to whole milk for calves. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.59, p.1293, 1977.

RINDSIG, R.B.; JANECKE, J.G.; BODOH, G.W. Influence of formaldehyde and propionic acid on composition and microflora of colostrum. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.60, p.63, 1977.

ROBINSON, R.K.; TAMIME, A.Y. Microbiology of fermented milks In: ROBINSON, R.K. **Dairy microbiology**. Amsterdam: Elsevier, 1999, p.291-343.

SEIDEL G.R.; SHELLENBERGER, P.R. Evaluation of composition and preparation of fermented colostrum. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.58, p.743, 1975.

SHAHANI, K.M.; SOMMER, H.H. The protein and non-protein nitrogen fractions in milk. I. Methods of analysis. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.34, p.1003-1009, 1951.

STEWART, S.; GODDEN, S.; BEY, R.; RAPNICKI, P.; FETROW, J.; FARNSWORTH, R. SCANLON, M.; ARNOLD, Y.; CLOW, L.; MUELLER, K.; FERROUILLET, C. Preventing bacterial contamination and proliferation during the harvest, storage, and feeding of fresh bovine colostrum. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.88, p.2571–2578, 2005.

SWANNECK, K.P. Dairy heifer calf rearing on cold milk substitute or colostrum. **Animal Production**, Washington, v.13, p.381-386, 1971.

THOMPSON, T.L.; MARTH, E.H. Changes in the microflora of bovine colostrum during natural fermentation. **Journal of Milk and Food Technology**, Beltsville, v.39, p.27-31, 1976.

WOUTERS, J.T.M.; AYAD, E.H.E.; HUGENHOLTZ, J.; SMIT, G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 12, p. 91–109, 2002.

YU, Y.; STONE, J.B.; WILSON, M. R. Fermented colostrum for Holstein replacement calf rearing. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.59, p.936, 1976

5 DESEMPENHO E PARÂMETROS SANGUÍNEOS DE BEZERROS LEITEIROS RECEBENDO SUCEDÂNEO LÁCTEO OU SILAGEM DE COLOSTRO

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho e parâmetros sanguíneos de bezerros consumindo colostro bovino fermentado sob condições anaeróbicas como dieta líquida exclusiva durante todo o período de aleitamento. Após o nascimento, dezoito bezerros da raça Holandês foram alojados em abrigos individuais até a oitava semana de vida, com livre acesso à água e concentrado inicial, e passaram a receber 4L da dieta líquida, sucedâneo lácteo ou silagem de colostro (diluído na razão de 1:1), divididos em duas refeições (07 e 17h). A silagem de colostro foi produzida um mês antes do início do experimento, com colostro de 2ª e 3ª ordenha, em garrafas plásticas tipo PET as quais foram armazenadas em temperatura ambiente. O consumo de concentrado inicial e o escore fecal foram registrados diariamente, enquanto que a pesagem e as medidas de altura na cernelha, perímetro torácico e largura da garupa foram realizadas semanalmente, a partir da segunda semana, até a oitava semana de idade, quando se encerrou o período experimental. A partir da segunda semana, foram realizadas colheitas semanais de amostras de sangue, duas horas após o aleitamento da manhã, para a determinação das concentrações plasmáticas de glicose, proteínas totais, nitrogênio uréico (NUP), ácidos graxos livres (AGL) e β -hidroxibutirato (BHBA). Os animais alimentados com silagem de colostro apresentaram menor consumo de concentrado ($P<0,07$) durante o período experimental, em comparação aos animais consumindo sucedâneo lácteo. Também foram observados efeitos significativos para o ganho de peso diário e o peso vivo ($P<0,07$) e, conforme esperado, efeitos da idade dos animais para todos os parâmetros de desempenho avaliados. As avaliações de altura na cernelha, perímetro torácico e largura da garupa não apresentaram diferenças entre os tratamentos ($P>0,05$). Todos os parâmetros sanguíneos avaliados (glicose, NUP, AGL e BHBA) foram afetados pelos tratamentos ($P<0,07$), exceto a concentração plasmática de proteínas totais ($P>0,07$). O escore fecal foi afetado pelos tratamentos durante a segunda semana de vida ($P<0,07$), com animais alimentados com silagem de colostro apresentando fezes anormais e muito secas. O fornecimento de silagem de colostro como dieta líquida exclusiva durante o período de aleitamento não resulta em desempenho animal adequado, não sendo uma boa alternativa de substituto de leite.

Palavras-chave: Aleitamento; Colostro fermentado; Dieta líquida; Fermentação anaeróbica; Substituto de leite

Abstract

The objective of this study was to evaluate performance and plasma metabolites of calves fed colostrum fermented under anaerobic conditions as an exclusive liquid feed during the whole milk-feeding period. After birth, eighteen Holstein male calves were housed in individual hutches until eighth weeks of life, receiving water free choice, starter feed, and fed four liters of liquid diet, milk replacer or colostrum silage (diluted at a 1:1 ratio), divided into two meals (07 and 17h). The colostrum silage was made from 2nd and 3rd milking colostrum one month before the start of the experiment in PET plastic bottles which were stored at room temperature. The starter feed intake and fecal scores were recorded daily, and body weight, withers height, heart girth and hip width were measured weekly from the second week until the eighth week of age. Blood samples were taken weekly after second week of age, two hours after the morning feeding, for the determination of plasma glucose, total protein, urea nitrogen (PUN), free fatty acids (FFA) and β -hydroxybutyrate (BHBA). Animals fed colostrum silage had lower intake of starter feed ($P<0.07$) during the experimental period, compared to animals consuming milk replacer. Significant effects were also observed for average daily gain ($P<0.07$) and body weight ($P<0.07$). As expected, an animal age effect was observed for all evaluated performance parameters. The measurements of withers height, heart girth and hip width did not differ between treatments ($P>0.07$). All blood parameters measured (glucose, PUN, FFA and BHBA) were affected by the treatments ($P<0.07$), except the total protein plasma concentration ($P>0.07$). The fecal score was affected by treatments during the second week of life ($P<0.07$), with animals fed colostrum silage presenting abnormal and very dry feces. Feeding colostrum silage as exclusive liquid diet during the whole milk-feeding period result in inadequate animal performance, being considered a bad alternative as milk replacer.

Keywords: Anaerobic fermentation; Colostrum storage, Fermented colostrum, Liquid diet, Milk-feeding

5.1 Introdução

O colostro pode ser definido como uma mistura de secreções e constituintes do soro sanguíneo, principalmente as imunoglobulinas e outras proteínas do sangue, que se acumulam na glândula mamária durante o pré-parto e é secretado logo após o nascimento do bezerro (FOLEY; OTTERBY, 1978). Assim, podemos chamar de colostro somente o produto coletado na primeira ordenha após o parto. Dessa forma, embora geralmente o produto coletado entre o primeiro e terceiro dia pós-parto também seja chamado de colostro, o termo mais correto para a classificação seria "leite de transição", que compreende todo o produto secretado pela vaca durante os primeiros dias pós-parto. Entretanto, embora seja correta a adoção dessa nomenclatura, em geral, o termo "leite de transição" acaba sendo substituído pelo termo colostro na maioria dos trabalhos de pesquisa.

A importância da transferência de imunidade passiva da mãe ao recém-nascido, essencial para a sobrevivência durante os primeiros dias de vida, é relatada por diversos pesquisadores (MACHADO NETO et al., 1995; WEAVER et al., 2000). Além disso, também são relatados efeitos benéficos de proteção local do intestino quando os bezerros são alimentados com o colostro por período prolongado (BUHLER et al., 1998; BERGE et al., 2009).

Com características nutricionais importantes para o desenvolvimento durante os primeiros dias de vida, o colostro também é considerado um alimento essencial para os recém-nascidos (FOLEY; OTTERBY, 1978). Entretanto, é importante lembrar que a composição e as características físicas do colostro podem variar devido a diferentes fatores, tais como idade do animal, número de lactações, nutrição pré-parto e longevidade.

Nos sistemas de produção, o leite é um dos componentes que mais onera o custo de criação de bezerras leiteiras. Dessa forma, a adoção de técnicas como o desaleitamento precoce ou o fornecimento de dieta líquida de baixo custo, como é o caso dos substitutos de leite, pode reduzir o custo final da novilha de reposição.

De maneira geral, a dieta líquida de bezerros pode ser composta por leite integral, leite não comercializável (coloostro, leite de transição, leite mamítico ou leite com resíduo de antibiótico), sucedâneos, ou ainda uma mistura de todos esses (DAVIS; DRACKLEY, 1998). Dessa forma, desde que bem conservado, tanto o colostro excedente quanto o leite de transição (entre a primeira e sexta ordenha pós-parto) podem ser fornecidos sem problemas para bezerros em aleitamento, geralmente diluído na proporção de 2 litros de colostro para 1 litro de água devido a sua composição (JENNY; MILLS; O'DELL, 1976).

No entanto, em algumas situações, a quantidade de dieta líquida disponível é superior ao total utilizado para bezerros em aleitamento, havendo necessidade de armazenamento do excedente. Além disso, os produtores que consideram a qualidade do colostro para o armazenamento podem obter grandes quantidades de colostro excedente com baixa concentração de imunoglobulinas, que pode servir como fonte de alimento disponível.

O método mais adequado de conservação de grandes volumes de colostro excedente por longos períodos de tempo sem grandes alterações na composição nutricional é, sem dúvida, por congelamento ou refrigeração (FOLEY; OTTERBY, 1979). Porém, muitas vezes não há espaço disponível no congelador ou freezer para o congelamento de grandes volumes de colostro ou leite de transição. Além disso, em algumas situações os produtores não possuem recurso financeiro disponível compra de freezer. Assim, a fermentação de colostro ou leite de transição torna-se um método alternativo para o armazenamento de colostro excedente e fornecimento futuro como dieta líquida aos animais.

Vários estudos publicados nas décadas de 70 e 80 avaliaram o fornecimento de colostro fermentado em baldes ou recipientes revestidos com sacos plásticos a animais em aleitamento (CARLSON; MULLER, 1976; JENNY et al., 1976; FOLEY; OTTERBY, 1979; BUSH et al., 1981). No entanto, nesses casos, o colostro era fermentado de forma aeróbica, ou seja, o material ficava em contato com o ar, e por isso, podia ser armazenado por no máximo quatro semanas. Os relatos sobre a adoção dessa tecnologia do Brasil se referem sempre a baixíssimos desempenhos, alta frequência de diarreia e recusa para consumo voluntário. O sucesso da adoção dessa prática

depende de vários fatores, sendo mais importantes os que reduzem a contaminação por bactérias que levam à fermentação indesejável. Fatores relacionados com a limpeza da ordenha, a utilização de recipientes adequados, escolha de colostro ou leite de transição de boa qualidade, sem a presença de sangue ou de mastite e o armazenamento em ambiente fresco e sem luz são alguns exemplos.

No entanto, trabalhos publicados nas últimas décadas sempre avaliaram a qualidade e a dinâmica fermentativa de colostro fermentado em recipientes que permitiam o contato com o ambiente externo, não sendo encontrados trabalhos de pesquisa onde a preservação do colostro tenha sido estritamente em ambiente anaeróbio.

Nos últimos anos produtores da região Sul do Brasil começaram a armazenar colostro excedente através de fermentação anaeróbia para fornecimento futuro para animais em aleitamento. Devido ao tipo de fermentação ao qual o colostro é submetido este produto passou a ser chamado de silagem de colostro. Estes produtores tem como característica comum rebanhos pequenos, com vacas de alta produção, de forma que o volume de colostro excedente é superior a demanda de dieta líquida para animais em aleitamento. Embora a silagem de colostro venha sendo utilizada por muitos produtores ainda não existem dados publicados sobre seu fornecimento para animais durante a fase de aleitamento no que diz respeito ao desempenho e alterações de parâmetros metabólicos.

O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho e parâmetros sanguíneos de bezerros leiteiros consumindo colostro bovino fermentado sob condições anaeróbias como dieta líquida exclusiva durante todo o período de aleitamento.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Animais, instalações e manejo alimentar

Foram utilizados dezoito bezerros da raça Holandês em um delineamento experimental do tipo blocos completos casualizados. Os animais foram adquiridos de fazendas comerciais da região, sendo transportados entre 1 e 5 dias de vida para o

bezerreiro experimental da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ, da Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, onde o experimento foi conduzido durante o período de agosto a novembro de 2010.

Na fazenda de nascimento os animais foram separados da mãe, alojados em abrigos individuais e alimentados com dois litros de colostro, e, a cada 12 horas, até o segundo dia de vida. Decorrido este período, os animais passaram a receber 4 litros de dieta líquida. Ao serem transportados para o bezerreiro experimental os animais passaram a receber 4 L/d de sucedâneo lácteo ou silagem de colostro, divididos em duas refeições (07 e 17h), e tiveram livre acesso à água e ao concentrado inicial.

Os animais foram divididos em blocos, de acordo com o peso ao nascer e data de nascimento, e distribuídos em um dos seguintes tratamentos, de acordo com a dieta líquida: 1) Controle: sucedâneo lácteo (Nattimilk E-Max, Auster Nutrição Animal, Campinas, SP, Brasil); 2) Silagem de colostro (colostro fermentado anaerobicamente).

A silagem de colostro foi produzida com colostro proveniente de segunda e terceira ordenhas de vacas de diversas propriedades particulares da região, com no mínimo um mês antes do início do experimento, em garrafas plásticas tipo PET com capacidade de dois litros que foram armazenadas em sala escura à temperatura ambiente.

Garrafas utilizadas na alimentação de todos os bezerros deste tratamento foram abertas no momento do fornecimento formando um *pool* e diluídas em água morna na proporção de 1:1, conforme recomendação de Jenny, Mills e O'Dell (1976) para garantir aceitação da dieta líquida pelos bezerros.

O concentrado comercial peletizado (Rumina 18P, Guabi Nutrição Animal, Campinas, SP, Brasil), com mínimo de 18% de proteína bruta (PB) e 70% de nutrientes digestíveis totais (NDT), foi fornecido toda tarde, *ad libitum*, pesando-se a sobra do dia anterior, de forma a se obter o consumo diário de concentrado.

O desaleitamento dos animais foi realizado de acordo com a idade, de forma abrupta, na oitava semana de vida, sendo o fornecimento de dieta líquida interrompido a partir desta data, quando se encerrou o período experimental.

5.2.2 Análises químico-bromatológicas

Amostras do concentrado fornecido foram colhidas e moídas a 1mm em moinho do tipo Wiley para determinação de matéria seca (MS) à 105° C, matéria mineral (MM) e extrato etéreo (EE) de acordo com Campos, Nussio e Nussio (2002); proteína bruta (PB) através de combustão, conforme método de Dumas, utilizando-se o analisador de nitrogênio LECO, modelo FP-528 (LECO Corporation, St. Joseph, MI, EUA); fibra insolúvel em detergente neutro (FDN), fibra insolúvel em detergente ácido (FDA) e lignina pelo método descrito por Van Soest, Robertson e Lewis (1991); nitrogênio insolúvel em FDN (N-FDN) e nitrogênio insolúvel em FDA (N-FDA) pelo método descrito por Goering e Van Soest (1970). Os valores de nutrientes digestíveis totais (NDT) foram calculados de acordo com as equações propostas por Weiss (1993) e os teores de carboidratos não-fibrosos (CNF) foram estimados através da equação (1):

$$_{(1)} \text{ CNF (\%MS)} = 100 - (\text{PB} + \text{EE} + \text{FDN}_{\text{ip}} + \text{MM})$$

Onde,

PB, EE, FDN_{ip} e MM são expressos em % da MS

Amostras do *pool* de silagem de colostro fornecido aos animais foram colhidas periodicamente para composição de amostras que representassem os lotes de colostro ensilado ao longo do período experimental para determinação da composição da silagem de colostro. Amostras foram analisadas para determinação de proteína bruta (PB), nitrogênio total (NT), nitrogênio não-protéico (NNP) e caseína pelo método de micro-Kjeldahl (SHAHANI; SOMMER, 1951), gordura pelo método proposto por Bligh e Dyer (1959) e adaptado por Manirakiza, Covaci e Schepens (2001) e lactose (FEITOSA TELES et al, 1978).

5.2.3 Avaliação do desempenho e desenvolvimento corporal

Os animais foram pesados ao nascer e semanalmente, sempre antes do fornecimento do leite da manhã, em balança mecânica (ICS-300, Coimma Ltda., Dracena, SP, Brasil), até a oitava semana de vida, quando se encerrou o período experimental. Foram mensuradas semanalmente, a altura na cernelha e largura da garupa, utilizando-se régua com escala em centímetros; e perímetro torácico com fita flexível, também com escala em centímetros.

5.2.4 Escore fecal e sanidade

Diariamente foram realizadas avaliações das fezes de acordo com sua coloração, consistência e aspecto geral conforme proposto por Larson et al. (1977). As fezes foram classificadas como (1) quando normais e firmes; (2) quando com consistência pastosa, porém com aspecto geral saudável; (3) quando com consistência líquida; (4) quando com consistência aquosa, coloração cinza, presença de bolhas, espuma ou grande quantidade de partículas de grãos; (5) quando com consistência aquosa, presença de sangue ou coloração esbranquiçada. Além disso, todos os eventos relativos à saúde dos animais como ocorrência de pneumonia ou tristeza bovina parasitária, além da diarreia, foram anotados, registrando-se o período de sua duração e da aplicação de medicamentos.

5.2.5 Colheita de sangue e metodologia analítica

5.2.5.1 Colheita de sangue

Amostras de sangue foram colhidas a partir da segunda semana de vida, através de punção da jugular, utilizando-se tubos vacuolizados contendo fluoreto de sódio como antiglicolítico e EDTA de potássio como anticoagulante (VACUETTE do Brasil, Campinas, SP, Brasil). As colheitas de sangue foram realizadas semanalmente, sempre

duas horas após o aleitamento da manhã. As amostras foram centrifugadas a 2000 x g, durante 20 minutos, à temperatura de 4°C. O plasma foi armazenado em tubetes plásticos e mantido em freezer para posterior determinação de glicose, proteínas totais, nitrogênio uréico (NUP), ácidos graxos livres (AGL) e β -hidroxibutirato (BHBA).

5.2.5.2 Determinação de glicose plasmática

As concentrações de glicose foram determinadas utilizando-se o kit enzimático GLICOSE HK LIQUIFORM – Ref.: 85 (LABTEST Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil) por espectrofotometria de ponto final, utilizando-se filtro de absorvância de 505 nm em Sistema Automático para Bioquímica – Modelo SBA-200 (CELM, Barueri, SP, Brasil). Uma alíquota de 4 μ L da amostra foi pipetada em cubetas de reação, acrescida de 400 μ L de reagente fornecido pelo kit. Após período de incubação de 10 minutos, foi realizada a leitura da absorvância para obtenção dos valores de glicose em mg/dL. Para calibração do equipamento, solução padrão fornecida com o kit enzimático com concentração de 100 mg/dL de glicose foi analisada a cada rodada. As concentrações obtidas em mg/dL foram transformadas em mmol/L multiplicando-se os valores obtidos por 0,0555.

5.2.5.3 Determinação de proteínas totais no plasma

As concentrações de proteínas totais foram determinadas a partir do kit enzimático PROTEÍNAS TOTAIS – Ref.: 99-250 (LABTEST Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil) por espectrofotometria de ponto final, utilizando-se filtro de absorvância de 540 nm em Sistema Automático para Bioquímica – Modelo SBA-200 (CELM, Barueri, SP, Brasil). O método utiliza 1000 μ L de reagente de Biureto pipetado em 200 μ L de amostra ou solução padrão (4g/dL) incubados a 37°C por 10 minutos. Após o período de incubação, as reações das amostras com o reagente formaram um composto de cor púrpura, cuja absorvância foi proporcional à concentração de proteínas da amostra.

5.2.5.4 Determinação de ácidos graxos livres (AGL) no plasma

As concentrações de ácidos graxos livres no plasma foram determinadas através do kit enzimático NEFA – Ref.: FA115 (RANDOX Laboratories - Life Sciences Ltd., Crumlin, UK), modificado para leitura em Sistema Automático para Bioquímica – Modelo SBA-200 (CELM, Barueri, SP, Brasil), utilizando-se filtro de absorvância de 540 nm. O padrão interno (1 mmol/L) foi diluído em água destilada para obtenção da curva padrão, com as concentrações de 0; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 mmol/L. As amostras foram pipetadas (10µL) em cubetas de reação seguidas de 200µL de reagente enzimático A. Em seguida, as cubetas foram incubadas em estufa a 37°C por 5 minutos. Após este período, 400µL de reagente enzimático B foram adicionados da mesma maneira e incubados por mais 5 minutos a 37°C, sendo a leitura das amostras realizada 3 minutos após a retirada da estufa.

5.2.5.5 Determinação de β -hidroxibutirato (BHBA) no plasma

A determinação de β -hidroxibutirato foi realizada utilizando-se kit enzimático RANBUT – Ref.: RB1007 (RANDOX Laboratories - Life Sciences Ltd., Crumlin, UK), utilizando-se filtro de absorvância de 340 nm em Sistema Automático para Bioquímica – Modelo SBA-200 (CELM, Barueri, SP, Brasil). Foi utilizado para calibração do equipamento solução padrão fornecida com o kit com concentração de 1,000 mmol/L. Uma alíquota de 12,5 µL de amostra foi pipetada na cubeta de reação, acrescida de 500 µL de reagente enzimático, seguida por leitura no aparelho após 60 segundos para obtenção da absorvância inicial. Após incubação por mais 120 segundos, foi realizada uma nova leitura da amostra. A diferença entre as leituras inicial e final foi utilizada para construção da curva de regressão e obtenção dos resultados.

5.2.5.6 Determinação nitrogênio uréico no plasma

A determinação da concentração de nitrogênio uréico plasmático foi realizada de acordo com metodologia proposta por Chaney e Marbach (1962) adaptada para leitura em Sistema Automático para Bioquímica – Modelo SBA-200 (CELM, Barueri, SP, Brasil). Em tubos de ensaio, 20µL de amostra foram diluídos em 20µL de água deionizada, seguida de 500µL de solução de urease em duplicatas. Em seguida, os tubos foram colocados em banho-maria a 37°C por 10 minutos, retirados e adicionados de 2,5 mL de reagente fenol (0,1 g de nitroprussiato dihidratado ($\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) + 20 g de fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) + água destilada para dois litros de solução) e 2 mL de reagente hipoclorito (10 g de hidróxido de sódio (NaOH) + 75,5 g de fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) + 100 mL de hipoclorito de sódio 5% + água destilada para dois litros de solução). Após agitação, os tubos foram levados para nova incubação em banho-maria a 37°C por 10 minutos. A leitura da absorbância foi realizada em Sistema Automático para Bioquímica – Modelo SBA-200 (CELM, Barueri, SP, Brasil) utilizando-se filtro de absorbância de 550 nm para todas as amostras e soluções padrão de uréia (67 mg/dL ; 33 mg/dL ; 16,6 mg/dL ; 8,3 mg/dL ; 0 mg/dL), utilizadas na construção da curva padrão, sendo água deionizada utilizada como branco. Os dados foram transformados para mmol/L multiplicando-se os valores obtidos em mg/dL por 0,357.

5.2.6 Análise estatística

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, sendo os animais alocados nos blocos de acordo com seu peso ao nascer. Os dados dos parâmetros de consumo de concentrado, ganho de peso diário, medidas corporais (altura na cernelha, perímetro torácico, largura da garupa) e parâmetros sanguíneos (glicose, BHBA, N-uréico, AGL e proteínas totais) foram analisados como medidas repetidas no tempo com auxílio do procedimento MIXED do pacote estatístico SAS (version 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC), conforme modelo (2). Para efeito de comparação de médias foi

utilizado o teste t de Student, sendo as médias estimadas através do método dos quadrados mínimos (LSMEANS), com nível de significância de 7%.

$$(2) Y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + W_k + E_{ijk}$$

Onde,

Y_{ijk} = variável resposta;

μ = média geral;

T_i = efeito do tratamento (dieta líquida);

B_j = efeito do bloco;

W_k = efeito da idade dos animais

E_i = efeito devido ao acaso (resíduo)

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Composição químico-bromatológica

O concentrado inicial apresentou composição nutricional, expressa em %MS, de acordo com o recomendado pelo NRC (2001) para atender as exigências de animais em aleitamento, que são o mínimo de 18% de proteína bruta (PB) e 70% de nutrientes digestíveis totais (NDT).

Os resultados da composição químico-bromatológica do sucedâneo lácteo e da silagem de colostro (colostro fermentado sob condições anaeróbicas), após cerca de 30 dias de armazenamento, estão expressos em porcentagem da matéria original, conforme mostra a Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Composição químico-bromatológica da silagem de colostro, sucedâneo lácteo e concentrado inicial

Variável, %	% ⁽¹⁾		% MS ⁽¹⁾
	Silagem de Colostro	Sucedâneo lácteo ⁽²⁾	Concentrado inicial ⁽³⁾
Matéria Seca	---	---	90,3
Matéria Mineral	---	---	6,8
Gordura	4,6	2,3	3,0
Lactose	1,1	5,8	---
Proteína Bruta (PB)	15,5	2,8	20,3
Nitrogênio total (NT)	2,4	---	3,2
Caseína, % do NT	24,2	---	---
Nitrogênio não-protéico, % do NT	14,9	---	---
Fibra em detergente neutro (FDN)	---	---	9,7
Fibra em detergente ácido (FDA)	---	---	7,3
Carboidratos não-fibrosos (CNF)	---	---	40,94
Nutrientes digestíveis totais (NDT)	---	---	71,32

⁽¹⁾ %= composição do alimento no fornecimento; % MS = valores expressos para 100% de matéria seca

⁽²⁾ *Nattimilk E-Max*, Auster Nutrição Animal, Campinas, SP, Brasil (12,5% de sólidos; 18:22 | proteína:gordura, em %MS)

⁽³⁾ *Rumina 18P*, Guabi Nutrição Animal, Campinas, SP, Brasil

Alterações importantes podem ser observadas, principalmente na composição da fração nitrogenada, que durante o processo fermentativo tem grande parte no nitrogênio protéico, representado principalmente pela caseína, convertido em nitrogênio não-protéico. De acordo com Foley e Otterby (1978), os valores de proteína bruta observados no colostro variam entre 9 e 23%. Esta grande variação é devida, principalmente, a concentração de imunoglobulinas no colostro, que é alterada ao longo dos dias pós-parto e é variável entre animais. Dessa forma, ao se observar os valores de nitrogênio total (NT) e proteína bruta ($PB\% = NT\% \times 6,38$), se têm a idéia de que a silagem de colostro é um alimento com elevado teor proteína (15,5%), mesmo após mais de 30 dias de fermentação. Entretanto, vale lembrar que a principal proteína do leite, a caseína, é reduzida significativamente devido à utilização dessa fração pelos microrganismos durante o processo fermentativo (CARLSON; MULLER, 1977). Assim,

os resultados mostram que somente 24,2% do nitrogênio total e, conseqüentemente, da proteína bruta, são caseína, sendo o restante representado principalmente por imunoglobulinas ou fragmentos de imunoglobulinas, nitrogênio não-protéico e pela flora microbiana desenvolvida no processo fermentativo.

Os teores de lactose observados mostram que esta fração é consumida intensamente pelos microrganismos durante a fermentação. Trabalhos de pesquisa com fermentação de colostro ou leite mostram que as bactérias ácido-láticas são os microrganismos responsáveis pela fermentação dos açúcares, principalmente a lactose (FOLEY; OTTERBY, 1978). A fermentação dos açúcares leva a maior produção de ácidos orgânicos, principalmente o ácido láctico, responsável pela redução do pH e conservação do produto (MULLER; SYHRE, 1974; JENNY; O'DELL, JOHNSON, 1976). Os resultados mostram também que os teores de gordura, embora sejam alterados durante a fermentação, apresentaram valor médio de 4,6%. Assim, a gordura foi, provavelmente, o principal substrato energético da dieta líquida dos animais, já que os teores de lactose apresentavam-se bastante reduzidos.

Também é importante lembrar que, seguindo a recomendação de Jenny, Mills e O'Dell (1976), a silagem de colostro foi fornecida aos animais diluída na proporção de 1:1. Dessa forma, os animais recebiam metade dos constituintes originalmente contidos nas garrafas e expressos na Tabela 5.1. Embora a diluição da silagem de colostro em água morna reduzisse ainda mais os valores dos principais constituintes (caseína, lactose, gordura), esta foi maneira encontrada para garantir o consumo pelos animais, pois, após a fermentação, o colostro apresentava textura espessa e sabor bastante ácido, sendo recusado pelos animais quando fornecido sem diluição.

5.3.2 Consumo de concentrado e desempenho

O fornecimento da silagem de colostro afetou o consumo de concentrado ($P<0,07$) durante o período experimental (Tabela 5.2). Conforme esperado, foram observados efeitos da idade ($P<0,0001$), com consumo crescente ao longo das semanas de vida dos animais, fator importante para que o processo de desaleitamento possa ser realizado de maneira satisfatória.

Tabela 5.2 - Consumo de concentrado (kg/dia), ganho de peso diário (kg/dia) e peso vivo (kg) de bezerros recebendo sucedâneo lácteo ou silagem de colostro

	Tratamento		EPM ⁽¹⁾	P< ⁽²⁾		
	Sucedâneo lácteo	Silagem de colostro		T	I	T x I
Consumo de concentrado						
Ao desaleitamento	0,905 ^a	0,559 ^b	0,09	0,01	-	-
Média do período total	0,409 ^a	0,230 ^b	0,07	0,07	<,0001	0,29
Peso vivo						
Inicial	38,5	39,2	1,33	0,71	-	-
Ao desaleitamento	52,6	49,1	1,42	0,47	-	-
Média do período total	42,1 ^a	40,6 ^b	0,48	0,06	<,0001	0,76
Ganho de peso diário						
Ao desaleitamento	0,605	0,517	0,09	0,49	-	-
Média do período total	0,279 ^a	0,181 ^b	0,03	0,07	<,0001	0,69

⁽¹⁾ EPM = erro padrão da média

⁽²⁾ T = efeito da dieta líquida; I = efeito da idade dos animais; T x I = efeito da interação dieta líquida e idade dos animais

⁽³⁾ Inicial = valores médios à primeira semana; Ao desaleitamento = valores médios à oitava semana

^{a,b,c} Letras minúsculas na mesma linha diferem para P<0,07

Adequados valores de consumo de concentrado são essenciais para garantir o desenvolvimento ruminal, já que o consumo de alimentos sólidos está intimamente relacionado à maior produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principais estimuladores do desenvolvimento do epitélio ruminal (NOCEK; HEALD; POLAN, 1984).

De acordo com Quigley (1996) para que o desaleitamento possa ser realizado sem prejuízos ao desempenho animal, bezerros da raça Holandês devem apresentar consumo entre 700-800 g de matéria original de concentrado, durante pelo menos três dias consecutivos. Dessa forma, pode-se observar que no momento do desaleitamento os animais alimentados com a silagem de colostro não apresentavam consumo dentro dos padrões recomendados pela literatura (Tabela 5.2).

Figura 5.1 – Consumo de concentrado (kg/dia), de acordo com a idade, por bezerras recebendo sucedâneo lácteo ou silagem de colostro

Embora os animais aleitados com silagem de colostro apresentassem tendência de consumo de concentrado crescente após a quinta semana de vida, o baixo consumo nas primeiras semanas (entre a primeira e quarta semanas) pode ter comprometido o comportamento normalmente esperado para animais durante este período. Esse fato provavelmente resultou em consumo abaixo do esperado (0,559 kg/dia) por ocasião do desaleitamento.

Resultados semelhantes foram observados por Muller, Ludens e Rook (1975) que forneceram colostro fermentado em condições aeróbicas para bezerras em aleitamento e verificaram menor consumo de concentrado pelos animais deste tratamento quando comparado com animais consumindo leite integral durante as quatro primeiras semanas de vida. Polzin, Otterby e Johnson (1977), também observaram redução no consumo de concentrado durante os primeiros 28 dias de vidas de bezerras alimentados com colostro fermentado. Entretanto, segundo estes autores, ao longo das semanas, o consumo de concentrado foi aumentado e não apresentou diferenças no

momento do desaleitamento quando comparado com os animais consumindo leite integral.

Por outro lado, Daniels et al. (1977) forneceram sucedâneo lácteo ou colostro fermentado naturalmente ou com inoculação de culturas de microrganismos a bezerras em aleitamento e observaram menor consumo de concentrado pelos animais alimentados com sucedâneo. Os autores sugerem que uma das possíveis explicações para esta diferença no consumo durante as primeiras semanas foi a forma como o colostro fermentado foi fornecido aos animais, ou seja, diluído em água morna na proporção de 1:1, assim como no presente estudo. Assim, o maior consumo de concentrado observado poderia ser consequência do menor consumo de matéria seca proveniente da dieta líquida, que após diluição apresentou composição nutricional abaixo do recomendado pelo NRC (2001) para garantir adequado desenvolvimento dos animais. Entretanto, os autores relatam que, embora tenha sido observado maior consumo de concentrado pelos animais alimentados com colostro fermentado, não foram observados resultados satisfatórios no desempenho durante as primeiras semanas de vida. Outros autores como Foley e Otterby (1979) e Otterby et al. (1980), também não observaram efeito negativo no consumo quando bezerros foram alimentados com colostro fermentado naturalmente ou acidificado com ácido propiônico.

O baixo consumo de concentrado durante as primeiras semanas de vida refletiu diretamente no ganho de peso abaixo do esperado, conforme mostra a Figura 5.2. Assim, o ganho de peso diário (kg/d) foi afetado pelos tratamentos durante o período experimental ($P < 0,07$), com os animais alimentados com silagem de colostro apresentando perda de peso até a quarta semana de vida.

Devido à dependência pelo consumo de dieta líquida, principalmente durante as primeiras semanas de vida, o fornecimento de uma dieta líquida de baixo valor nutricional como é o caso da silagem de colostro (Tabela 5.1), de maneira geral, deixou os animais aparentemente apáticos e com menor vigor em relação aos bezerros alimentados de maneira tradicional.

Os resultados de desempenho animal observados no presente estudo corroboram as estimativas de ganho reportadas pelo NRC (2001) quando os resultados da composição nutricional da silagem de colostro foram inseridos no programa,

considerando matéria seca média de 18% no momento do fornecimento. Os resultados apontam taxas de ganho a partir da proteína de 0,15 kg/dia, mas ganho nulo a partir da energia disponível na dieta líquida.

Portanto, o baixo vigor dos animais é provavelmente consequência do consumo de energia e proteína oriundas da silagem de colostro abaixo do mínimo necessário para o adequado crescimento e manutenção (RINDSIG; BODOH, 1976). Além disso, o processo fermentativo do colostro resultou em um produto com elevado teor de nitrogênio não-protéico, o que possivelmente demandou um gasto metabólico extra para seu metabolismo e eliminação. Dessa forma, o estado geral dos animais alimentados com a silagem de colostro comprometeu o seu desenvolvimento adequado, afetando diretamente o consumo de concentrado e consequentemente, o desempenho.

Figura 5.2 – Ganho de peso diário (kg/dia), de acordo com a idade, de bezerros recebendo sucedâneo lácteo ou silagem de colostro

Outros autores também observaram desempenho abaixo do esperado por bezerros alimentados com colostro fermentado, principalmente quando o tratamento

controle era o fornecimento de leite integral (MULLER; BEARDSLEY; LUDENS, 1975; YU; STONE; WILSON, 1976; RINDSING; BODOH, 1977; FOLEY; OTTERBY, 1978).

Muller, Ludens e Rook (1976) observaram ganho de peso abaixo do esperado para animais consumindo colostro fermentado quando comparados com animais alimentados com leite integral (0,15 vs. 0,34 kg/d) durante as quatro primeiras semanas de vida. Entretanto, os autores reportam que no período subsequente o desempenho dos animais apresentou valores satisfatórios (0,39 kg/d) com média geral adequada quando avaliado todo o período experimental. Resultados semelhantes foram observados por Foley e Otterby (1979) com desempenho abaixo do esperado durante as primeiras semanas (-0,29 kg/d na primeira semana), assim como Otterby et al. (1980) que somente observaram ganho de peso pelos animais após 15 dias de vida.

Corroborando os resultados encontrados na literatura, no presente estudo, o ganho de peso diário após a quinta semana de vida apresentou valores adequados para animais desta idade, com valores bastante próximos aos observados nos animais alimentados com sucedâneo lácteo. Dessa forma, embora tenham sido observadas diferenças no ganho de peso durante o período total, no momento do desaleitamento não foram observadas diferenças entre os tratamentos ($P>0,07$), conforme mostra a Tabela 5.2.

No único trabalho em que a silagem de colostro foi avaliada Saalfeld (2008) observou rejeição de consumo pelos animais quando o fornecimento era realizado sem diluição. Entretanto, em acompanhamento de propriedade particular com o emprego da técnica e desaleitamento aos 60 dias de vida, Saalfeld (2008) observou ganho de peso diário de 0,823 kg/d no primeiro mês de vida, valor bastante acima dos encontrados na literatura para animais de mesma idade e em período de aleitamento.

Os resultados observados com inadequadas taxas de ganho de peso, principalmente pelos animais alimentados com silagem de colostro (Figura 5.2), resultaram em diferenças entre os tratamentos para o peso vivo durante o período experimental ($P<0,07$). Na Figura 5.3 pode-se observar de maneira clara que a perda de peso observada durante as primeiras semanas de vida comprometeu o crescimento dos animais alimentados com silagem de colostro, embora, ao desaleitamento, não fossem observadas diferenças entre os tratamentos ($P>0,07$).

Figura 5.3 – Peso vivo (kg), de acordo com a idade, de bezerros recebendo sucedâneo lácteo ou silagem de colostro

O fornecimento de silagem de colostro não alterou as principais medidas corporais dos animais. Dessa forma, apesar dos dados de ganho de peso e peso vivo terem apresentado efeito significativo, não foram observadas diferenças ($P > 0,07$) nas avaliações do perímetro torácico, altura na cernelha e largura da garupa, bem como nos ganhos semanais (Tabela 5.3).

Entretanto, embora não tenham sido observadas diferenças entre os tratamentos, foram observados efeitos da idade dos animais ($P < 0,0001$) para todas as medidas corporais, conforme pode ser observado na Figura 5.4.

Os dados de altura à primeira semana apresentam-se de acordo com os padrões para a idade e raça. Heinrichs e Losinger (1998) estudaram a variação na altura de animais com idades entre 0,5 e 23,5 meses de 659 fazendas norte-americanas e observaram valores médios de 79,4 ($\pm 3,3$) cm entre os rebanhos para altura inicial de bezerras da raça Holandês. Embora exista grande variabilidade genética entre os

rebanhos, o conhecimento de algumas medidas corporais importantes como a altura na cernelha e o perímetro torácico são de suma importância para o acompanhamento do crescimento dos animais. Isto porque, através de medidas corporais é possível avaliar o crescimento esquelético e a composição do ganho servindo como um parâmetro para a tomada de decisões importantes para aumento do ganho de peso dos animais (HOFFMAN, 1997).

Tabela 5.3 - Perímetro torácico, altura na cernelha e largura da garupa de bezerros recebendo sucedâneo lácteo ou silagem de colostro

	Tratamento		EPM ⁽¹⁾	P< ⁽²⁾		
	Sucedâneo lácteo	Silagem de colostro		T	I	T x I
Perímetro torácico						
Inicial ⁽³⁾	77,55	77,67	0,77	0,92	---	---
Ao desaleitamento ⁽³⁾	85,63	85,36	0,85	0,82	---	---
Média do período total	79,94	79,43	0,28	0,23	<,0001	0,88
Ganho, cm/semana	1,23	1,04	0,19	0,52	<,0001	0,69
Altura na cernelha						
Inicial	77,57	77,79	0,51	0,76	---	---
Ao desaleitamento	81,3	80,3	0,58	0,23	---	---
Média do período total	78,9	78,5	0,18	0,16	<,0001	0,79
Ganho, cm/semana	0,56	0,45	0,09	0,39	0,0007	0,84
Largura da garupa						
Inicial	21,62	21,56	0,26	0,87	---	---
Ao desaleitamento	23,09	22,94	0,27	0,72	---	---
Média do período total	21,97	22,06	0,21	0,78	<,0001	0,73
Ganho, cm/semana	0,21	0,18	0,05	0,68	0,06	0,56

⁽¹⁾ EPM = erro padrão da média

⁽²⁾ T = efeito da dieta líquida; I = efeito da idade dos animais; T x I = efeito da interação dieta líquida e idade dos animais

⁽³⁾ Inicial = valores médios à primeira semana; Ao desaleitamento = valores médios à oitava semana

Figura 5.4 – Medidas do perímetro torácico (1), altura na cernelha (2) e largura da garupa (3), de acordo com a idade, de bezerros recebendo sucedâneo lácteo ou silagem de colostro

5.3.3 Morbidade e mortalidade

O escore fecal foi afetado pelos tratamentos durante a segunda semana ($P<0,07$), com os animais consumindo sucedâneo lácteo apresentando maior escore de fezes quando comparados aos animais alimentados com silagem de colostro (Figura 5.5). Segundo Godden et al. (2003), a diarreia é a principal doença que acomete bezerros durante as três primeiras semanas de vida. Através da Figura 5.5 é possível observar claramente que os maiores escores foram registrados durante a segunda e terceira semanas e, no período subsequente, os animais de ambos os tratamentos apresentaram fezes normais (Escore=1).

Entretanto, embora um menor escore fecal possa indicar a baixa ocorrência de diarreia e, portanto, animais mais saudáveis, de maneira geral os animais alimentados com silagem de colostro apresentaram, ao longo do período experimental, fezes com aspecto anormal e muito seco.

Embora se esperasse que o fornecimento do colostro fermentado pudesse resultar em maior frequência de diarreia alimentar, o inverso foi observado neste estudo. Outros autores que forneceram este tipo de dieta líquida também não reportam aumento de casos de diarreia em seus bezerreiros (OTTERBY; JOHNSON; POLZIN, 1976; JENNY; MILLS; O'DELL, 1976; POLZIN; OTTERBY; JOHNSON, 1977). Ao contrário, reduções na frequência de diarreia são reportadas na literatura quando colostro fermentado é fornecido a bezerros em aleitamento (YU; STONE; WILSON, 1976; RINDSIG; BODAH, 1977), sendo algumas vezes sugerido efeito probiótico desse tipo de dieta líquida.

Muller, Ludens e Rook (1975) forneceram colostro fermentado sob condições de alta temperatura ambiente e também não observaram maior incidência de diarreia. Entretanto, os autores observaram que os animais alimentados com colostro fermentado apresentavam distúrbios digestivos por período prolongado, necessitando de maiores cuidados que os animais alimentados com leite integral.

Figura 5.5 – Escore fecal (sendo 1 = fezes normais e 5 = diarreia severa) em bezerros recebendo de bezerros recebendo sucedâneo lácteo ou silagem de colostro

O baixo pH e a elevada concentração de ácidos orgânicos na silagem de colostro pode ter contribuído na redução da incidência de diarreia entre os animais. Segundo Erickson; Schauff e Murphy (1988), a acidificação de substitutos de leite com ácidos orgânicos com o objetivo de reduzir a incidência de diarreia é uma prática comum. O fornecimento da dieta líquida acidificada reduz o pH do abomaso e do trato intestinal, melhorando o processo digestivo e, principalmente, reduzindo a proliferação de microrganismos causadores da diarreia (JASTER et al., 1990). Dessa forma, a menor incidência de diarreia nos animais alimentados com silagem de colostro pode ser consequência do consumo de ácido láctico, por exemplo, que se apresentava em alta concentração no colostro após a fermentação. Ellinger; Muller e Glantz (1980) demonstraram redução na frequência de diarreia de bezerros alimentados com colostro fermentado, sugerindo a presença de ácidos orgânicos na dieta líquida como responsável por este resultado.

A Tabela 5.4 apresenta um resumo do estado geral dos animais durante o estudo. Dentre os problemas encontrados, a rejeição da dieta líquida durante os primeiros dias de alimentação merece destaque. Em média, os animais recusaram-se a consumir os dois litros de silagem de colostro, disponíveis para a alimentação a cada período, durante pelo menos 2,5 dias. Embora não tenha havido diferenças no escore fecal e nos dias em tratamento para distúrbios digestivos, alguns animais alimentados com silagem de colostro apresentavam claros sintomas de dor abdominal (Figura A), aumentando o grau de morbidade dos animais. Além disso, foi registrada a morte de um animal do tratamento silagem de colostro, provavelmente por consequência de freqüentes recusas no consumo, o que pode ter comprometido seu adequado crescimento.

Tabela 5.4 – Mortalidade, rejeição de dieta líquida e incidência de doenças em bezerros de bezerros recebendo sucedâneo lácteo ou silagem de colostro

	Tratamento	
	Sucedâneo lácteo	Silagem de colostro
Número de animais		
Início (semana 1)	9	9
Final (semana 8)	9	8
Mortalidade	0	1
Dieta líquida, rejeição		
Número de animais	0	6
Período de rejeição, em dias	0	2,5
Quantidade recusada, em litros/dia	0	0,6
Diarréia/ distúrbios intestinais		
Número de animais	9	9
Dias em tratamento	6,0	5,4
Pneumonia/ doenças respiratórias		
Número de animais	0	2
Dias em tratamento	0	5,5

Figura A - Aspecto geral dos animais (sintomas de dor abdominal) e das fezes de bezerros aleitados com silagem de colostro

A rejeição inicial no consumo de colostro fermentado é relatada por diversos autores (OTTERBY; JOHNSON; POLZIN, 1976; DANIELS et al., 1977). Além disso, mesmo depois do período inicial, em alguns casos pode ocorrer a recusa no consumo por alguns animais, conforme relata Muller, Ludens e Rook (1975) e Rindsig (1977). Segundo os autores, a excessiva acidez do colostro fermentado (pH entre 4 e 5) é, provavelmente, a principal causa para a não aceitação pelos animais. De acordo com Foley e Otterby (1978), o consumo pelos microrganismos durante a fermentação de grande parte dos componentes do colostro como a lactose e a caseína, responsáveis pela palatabilidade da dieta, contribuem ainda mais para a rejeição do consumo por alguns animais.

5.3.4 Parâmetros sanguíneos

Todos os parâmetros sanguíneos avaliados (β -hidroxibutirato (β HBA), ácidos graxos livres (AGL), nitrogênio uréico (NUP) e glicose, exceto as concentrações de proteínas totais, apresentaram diferenças entre os tratamentos ($P < 0,07$). Também foram observados efeitos da idade dos animais para os parâmetros sanguíneos avaliados ($P < 0,07$), e efeitos da interação dieta líquida e idade para as concentrações plasmáticas de nitrogênio uréico e β -hidroxibutirato.

Tabela 5.5 - Concentrações plasmáticas de β -hidroxibutirato (β HBA), ácidos graxos livres (AGL), nitrogênio uréico (NUP), glicose e proteínas totais de bezerros recebendo sucedâneo lácteo ou silagem de colostro

	Tratamento		EPM ⁽¹⁾	P< ⁽²⁾		
	Sucedâneo lácteo	Silagem de colostro		T	I	T x I
βHBA, mmol/L						
Inicial	0,119 ^b	0,348 ^a	0,03	<0,0001	---	---
Ao desaleitamento	0,225 ^b	0,308 ^a	0,03	0,07	---	---
Média do período total	0,151 ^b	0,302 ^a	0,01	<0,0001	0,02	0,02
AGL, mmol/L						
Inicial	0,38	0,57	0,06	0,09	---	---
Ao desaleitamento	0,19 ^b	0,37 ^a	0,05	0,01	---	---
Média do período total	0,28 ^b	0,36 ^a	0,02	0,03	0,001	0,17
NUP, mmol/L						
Inicial	2,72 ^b	4,84 ^a	0,44	0,001	---	---
Ao desaleitamento	1,45	2,18	0,42	0,22	---	---
Média do período total	2,32 ^b	4,01 ^a	0,14	<0,0001	<,0001	0,01
Glicose, mmol/L						
Inicial ⁽³⁾	4,31 ^a	3,84 ^b	0,20	0,10	---	---
Ao desaleitamento ⁽³⁾	5,12 ^a	4,19 ^b	0,21	0,002	---	---
Média do período total	4,57 ^a	3,84 ^b	0,07	0,001	0,006	0,89
Proteínas totais, g/dL						
Inicial	5,92	6,15	0,21	0,44	---	---
Ao desaleitamento	6,39	6,63	0,21	0,42	---	---
Média do período total	6,14	6,23	0,08	0,46	0,02	0,89

⁽¹⁾ EPM = erro padrão da média

⁽²⁾ T = efeito da dieta líquida; I = efeito da idade dos animais; T x I = efeito da interação dieta líquida e idade dos animais

⁽³⁾ Inicial = valores médios à segunda semana; Ao desaleitamento = valores médios à oitava semana

^{a,b,c} Letras minúsculas na mesma linha diferem para P<0,07

As concentrações plasmáticas de β -hidroxibutirato observadas para os animais consumindo sucedâneo lácteo apresentaram comportamento conforme o esperado para

bezerros em período de aleitamento e com o rúmen em desenvolvimento, com valores crescentes com o avanço da idade (Figura 5.6). De acordo com Quigley, Smith e Heitmann (1991), as concentrações de β HBA tendem a aumentar com o avanço da idade devido ao consumo de alimento sólido crescente ao longo das primeiras semanas de vida, e, conseqüentemente, início do metabolismo do butirato a corpos cetônicos pelo do epitélio ruminal em desenvolvimento. Isto ocorre porque as células do epitélio ruminal de bezerros durante as primeiras semanas oxidam glicose e butirato a taxas similares. Entretanto, com o avanço da idade, a taxa de oxidação da glicose pelas células do epitélio ruminal decrescem, e o butirato produzido na fermentação passa a ser o substrato preferencial a ser oxidado (BALDWIN; JESSE, 1992).

Figura 5.6 – Concentrações plasmáticas de β -hidroxibutirato (mmol/L), de acordo com a idade, de bezerros recebendo sucedâneo lácteo ou silagem de colostro

Esta é a principal razão de, em ruminantes adultos, a concentração de corpos cetônicos, principalmente β HBA, ser geralmente maior que a concentração em monogástricos. Isto ocorre porque a β -oxidação que ocorre no epitélio ruminal metaboliza entre 30 e 70% de todo butirato produzido através da fermentação ruminal,

o que resulta em concentrações plasmáticas entre 0,1 e 0,3 mmol/L em animais bem alimentados (SANTOS, 2006).

Por outro lado, o fornecimento de silagem de colostro resultou em elevadas concentrações de β HBA no plasma durante todo o período experimental ($P < 0,0001$), com maiores diferenças entre os tratamentos nas primeiras semanas de vida (Tabela 5.5; Figura 5.6).

O comportamento atípico nos valores de β HBA, com valores elevados para animais em aleitamento, sugere que os animais alimentados com silagem de colostro apresentavam características típicas de animais em condição de cetose. Dentre os sintomas clínicos observados, muitos deles são característicos de cetose clínica, como a falta de apetite (Figura 5.1), fezes escassas e de consistência firme (Figura 5.5) e perda de peso (Figura 5.2), observados claramente nos bezerros alimentados com silagem de colostro.

O consumo de dieta líquida com insuficiente densidade energética, como foi o caso da silagem de colostro, que apresentava, após diluição, teor de lactose abaixo de 0,55%, aumentou a predisposição desses animais ao desenvolvimento dos sintomas de cetose clínica. De acordo com Santos (2006), em condições de insuficiente consumo calórico, como nesse caso, ocorre grande influxo de ácidos graxos livres na corrente sanguínea, decorrentes da mobilização de gordura corpórea, para atender as necessidades energéticas do organismo.

Confirmando a afirmação de Santos (2006), os valores de ácidos graxos livres (AGL) apresentados pelos animais alimentados com silagem de colostro foram significativamente maiores ($P = 0,03$) quando comparados com os animais alimentados com sucedâneo lácteo. Também, as concentrações plasmáticas de AGL foram alteradas de acordo com a idade dos animais ($P = 0,001$), porém de maneiras distintas entre os tratamentos. Pode ser observado na A Figura 5.7 que os animais alimentados com silagem de colostro apresentaram concentração plasmática de AGL decrescente ao longo das semanas de vida; enquanto que os animais alimentados com sucedâneo lácteo apresentaram poucas alterações ao longo do período de aleitamento.

Além disso, é possível observar que a diferença entre os tratamentos na concentração plasmática de AGL é reduzida a partir da quinta semana de vida (Figura

5.7). Provavelmente, os menores valores de AGL observados são consequência do aumento do consumo de concentrado pelos animais alimentados com silagem de colostro, que se deu de maneira satisfatória somente após a quinta semana (Figura 5.1). O início no consumo de concentrado consequentemente melhorou o consumo de energia pelos animais deste tratamento, o que resultou em valores de β HBA e AGL menores que os observados nas primeiras semanas, contribuindo na redução dos sintomas do quadro de cetose e melhoria no desempenho dos animais (Figura 5.6; Figura 5.7).

Figura 5.7 – Concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres (mmol/L), de acordo com a idade, de bezerros recebendo sucedâneo lácteo ou silagem de colostro

Conforme esperado, a concentração de nitrogênio uréico no plasma (NUP) dos animais alimentados com silagem de colostro apresentou valores significativamente maiores, durante todo o período de aleitamento ($P < 0,0001$; Figura 5.8). Este comportamento já era esperado uma vez que a silagem de colostro apresentou

concentração de nitrogênio não-protéico, oriundo da proteólise da fração protéica durante a fermentação, bastante elevada (Tabela 5.1). De acordo com Foley e Otterby (1978), a concentração de nitrogênio não-protéico no colostro chega a dobrar após cerca de 20 dias de fermentação.

Figura 5.8 – Concentrações plasmáticas de nitrogênio uréico (mmol/L), de acordo com a idade, de bezerras recebendo sucedâneo lácteo ou silagem de colostro

Carlson e Muller (1976) avaliaram o fornecimento de colostro fermentado aerobicamente para bezerras em aleitamento e encontraram uma correlação positiva ($r=0,42$) para a concentração de nitrogênio não-protéico no colostro e a concentração de nitrogênio uréico no soro dos animais.

Segundo estudo de Hayashi et al. (2006), o comportamento típico esperado para as concentrações de nitrogênio uréico em bezerras em aleitamento é de pequeno aumento com o avanço da idade dos animais e início da digestão de alimentos sólidos no rúmen em desenvolvimento. Isto ocorre porque a amônia proveniente da degradação protéica dos alimentos é absorvida pela parede ruminal e entra na circulação porta-

hepática, sendo convertida a uréia no fígado. A uréia é então reciclada ao rúmen via saliva ou por difusão através da parede ruminal via corrente sanguínea, onde é uma importante fonte de nitrogênio para síntese microbiana no rúmen. Entretanto, do ponto de vista de nutrição protéica, o ciclo da uréia é mais importante para animais adultos, com o rúmen desenvolvido tanto sob aspectos físicos quanto metabólicos, do que para animais em aleitamento e dependentes basicamente da dieta líquida para suprir suas exigências em energia e proteína.

De acordo com Quigley e Bernard (1992), a concentração plasmática de nitrogênio uréico apresenta correlação positiva ($r=0,71$) com início do consumo de grãos por bezerros em aleitamento. Quigley (1996) relata que as concentrações aumentam, principalmente após o desaleitamento, quando o consumo de concentrado também aumenta.

O fornecimento de silagem de colostro como dieta líquida exclusiva aos animais, com concentração de lactose após período de fermentação de 1,06% resultou em concentrações plasmáticas de glicose abaixo do observado normalmente para animais em período de aleitamento (Figura 5.9).

Conforme relatado anteriormente, a dieta líquida é a principal fonte de alimento para bezerros durante a fase de aleitamento e a lactose a principal fonte de carboidrato. De acordo com Davis e Drackley (1998) a digestão e aproveitamento de dissacarídeos e polissacarídeos, exceto a lactose, são extremamente baixos em bezerros jovens, sendo a produção e atividade das enzimas digestivas aumentadas com a idade dos animais. Dessa forma, pesquisas com fontes alternativas à lactose na formulação de substitutos de leite, por exemplo, sempre encontram resultados insatisfatórios.

De acordo com Haga et al. (2007), durante as primeiras semanas de vida, a glicose é a principal fonte energética para animais pré-ruminantes. Portanto, a quantidade de lactose presente no leite ou na dieta líquida fornecida aos animais durante este período é essencial para garantir crescimento adequado dos animais. Assim, o reduzido aporte energético proveniente do consumo de carboidratos, que na silagem de colostro é representado principalmente pela lactose e glicose livre, teve como principal consequência a maior demanda pelos animais por fontes alternativas de energia para garantir a sobrevivência. As elevadas concentrações plasmáticas de β -

hidroxibutirato (Figura 5.6) e de ácidos graxos livres (Figura 5.7) confirmam esta condição.

Figura 5.9 – Concentrações plasmáticas de glicose (mmol/L), de acordo com a idade, de bezerros recebendo sucedâneo lácteo ou silagem de colostro

Devido à fermentação ruminal, ruminantes adultos normalmente absorvem pouca ou quase nenhuma glicose proveniente da dieta (Bergman, 1990) e por isso grande parte da glicose é produzida pela gluconeogênese hepática. Entretanto, ao nascer, os ruminantes apresentam o trato digestório superior, principalmente o retículo-rúmen, pouco desenvolvido, sendo sua capacidade fermentativa limitada. Dessa forma, até a fase de transição e o total desenvolvimento do retículo-rúmen, a digestão é bastante semelhante a animais monogástricos, sendo a glicose circulante proveniente da absorção intestinal e proveniente na sua grande maioria da dieta líquida consumida.

De acordo com Hayashi et al. (2006), com o desenvolvimento do rúmen e o estabelecimento de populações microbianas se tem o início da produção de ácidos graxos de cadeia curta provenientes da fermentação de carboidratos da dieta. Os AGCC produzidos são absorvidos pelo epitélio ruminal do animal que altera sua fonte

de energia. Esta alteração resulta no decréscimo da absorção de glicose pelo intestino delgado e aumento da produção de glicose a partir da gluconeogênese (OTTERBY; LINN, 1981). Portanto, durante as primeiras semanas de vida, a concentração plasmática de glicose de bezerros passa de concentrações encontradas em animais monogástricos (em torno de 100 mg/dL ou 5,55 mmol/L) a concentrações típicas de animais ruminantes adultos, próximos de 60 mg/dL ou 3,33 mmol/L (DAVIS; BROWN, 1962).

Quigley; Smith e Heitmann (1991) observaram redução nas concentrações de glicose com o avanço da idade dos animais, assim como Haga et al. (2008). Por outro lado, em experimento conduzido por Quigley e Bernard (1992) as concentrações plasmáticas de glicose não apresentaram redução significativa com o avanço da idade dos animais. Segundo os autores, o baixo consumo de matéria seca, principalmente de concentrado inicial, pode ter comprometido o adequado desenvolvimento ruminal e, conseqüentemente comprometido a resposta esperada.

Ao contrario dos outros parâmetros sanguíneos avaliados, as concentrações plasmáticas de proteínas totais não foram afetadas pelos tratamentos ($P>0,07$), mas efeito da idade dos animais foi observado ($P<0,07$), com aumentos na concentração com o avanço da idade (Figura 5.10). Variações nas concentrações de proteínas totais são utilizadas como parâmetros para controle do estado geral dos animais. Níveis baixos são observados quando teores de proteína da dieta são insuficientes ou quando ocorre baixo aproveitamento; níveis elevados podem indicar casos de desidratação, ou alguma doença crônica (LUCA; REIS, 2002).

Poucos trabalhos avaliaram o efeito do fornecimento de colostro fermentado nas concentrações de proteínas totais no plasma de bezerros. Os resultados observados neste trabalho mostram valores próximos aos normalmente observados em bezerros de idade equivalente (BLOME et al., 2003; QUIGLEY; WOLFE, 2003). Em um dos poucos trabalhos avaliando a flutuação sérica de proteínas totais de animais alimentados com colostro fresco ou fermentado Foley, Hunter e Otterby (1978) observaram maior concentração para animais alimentados com colostro fresco. Segundo os autores, possivelmente a proteólise que ocorre durante a fermentação pode ter sido responsável por essa diferença.

Figura 5.10 – Concentrações plasmáticas de proteínas totais (g/dL), de acordo com a idade, de bezerros recebendo sucedâneo lácteo ou silagem de colostro

5.4 Conclusões

Embora a dinâmica fermentativa observada aponte que o colostro pode ser conservado em condições anaeróbias, seu uso como substituto do leite não resulta em desempenho animal adequado, principalmente devido à ocorrência de casos de rejeição de consumo, perda de peso e estado geral de saúde dos animais durante as quatro primeiras semanas de vida.

A silagem de colostro não deve ser utilizada como dieta líquida exclusiva para bezerros em aleitamento.

Referências

- BALDWIN, R.L.; JESSE, B.W. Developmental changes in glucose and butyrate metabolism by isolated sheep ruminal cells. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.122, p.1149–1153, 1992.
- BERGE, A.C.B.; BESSER, T.E.; MOORE, D.A.; SISCHO, W.M. Evaluation of the effects of oral colostrum supplementation during the first fourteen days on the health and performance of preweaned calves. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.92, p.286–295, 2009.
- BERGMAN, E.N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, Bethesda, v.70, p.567-590, 1990.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry Physiology**, Ottawa, v.37, p.911-917, 1959.
- BLOME, R.M.; DRACKLEY, J.K.; MCKEITH, F.K.; HUTJENS M.F.; MCCOY G.C. Growth and body composition of dairy calves fed milk replacers containing different amounts of protein at two feeding rates **Journal of Animal Science**, Lancaster, v.84, p.1454-1467, 2006.
- BUHLER, C.; HAMMON, H.; ROSSI G.L.; BLUM J.W. SMALL intestinal morphology in eight-day-old calves fed colostrum for different durations or only milk replacer and treated with long-R3-insulin-like growth factor I and growth hormone. **Journal of Animal Science**, Lancaster, v.76, p.758-765, 1998.
- BUSH, R.S.; MCQUEEN, R.E.; NICHOLSON, J.W.G. Effect of fermentation and formalin preservation on the protein component of bovine colostrum. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.64, p.1695-1699, 1981.
- CAMPOS, F.P.; NUSSIO, C.M.B.; NUSSIO, L.G. **Métodos de análises de alimentos**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 135p.

CARLSON, S.M.A.; MULLER, L.D. Compositional and metabolic evaluation of colostrum preserved by four methods during warm ambient temperatures. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.60, p.566, 1977.

CHANEY A.L.; MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, Washington, v.8, p.130-132, 1962.

DANIELS, L.B.; HALL, J.R.; HORNSBY, Q.R.; COLLINS, J.A. Feeding naturally fermented, cultured, and direct acidified colostrum to dairy calves. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.60, p.992, 1977.

DAVIS, C.L.; DRACKLEY, J.K. **The development, nutrition, and management of the young calf**. Ames: Iowa State University Press, 1998. 339p.

DAVIS, C.L.; BROWN, R.E. Availability and metabolism of various substrates in ruminants. IV. Glucose metabolism in the young calf and growing steer **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 45, p.513-516, 1962.

ELLINGER, D.K.; MULLER, L.D.; GLANTZ, P.J. Influence of feeding fermented colostrum and lactobacillus acidophilus on fecal flora of dairy calves. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.63, p.478-482, 1980.

ERICKSON, P.S.; SCHAUFF, D.J; MURPHY, M.R. Diet digestibility and growth of holstein calves fed acidified milk replacers containing soy protein concentrate. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.72, p.1528-1533, 1989.

FEITOSA-TELES, F.F.; YOUNG, C.K.; STULL, J.W. A method for rapid determination of lactose. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.61, p.506-508, 1978.

FOLEY, J.A.; OTTERBY, D.E. Performance of calves fed colostrum stored by freezing, fermentation, or treatment with lactic or adipic acid. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.62, p.459-467, 1979.

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

FOLEY, J.A. HUNTER, A.G. OTTERBY, D.E. Absorption of colostral proteins by newborn calves fed unfermented, fermented, or buffered colostrum. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.61, p.1450-1456, 1978.

GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. Forage fiber analysis (Apparatus, reagents, procedures and some applications). Washington, DC: USDA, 1970. (Agricultural Handbook, 379).

GODDEN, S.M.; SMITH, S.; FEIRTAG, J.M.; GREEN, L.R.; WELLS, S.J.; FETROW, J.P. Effect of on-farm commercial batch pasteurization of colostrum on colostrum and serum immunoglobulin concentrations in dairy calves. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.86, p.1503-1512, 2003.

HAGA, S.; FUJIMOTO, S.; YONEZAWA, T.; YOSHIOKA, K.; SHINGU, H.; KOBAYASHI, Y. TAKAHASHI, T.; OTANI, Y.; KATOH, K.; OBARA, Y. Changes in hepatic key enzymes of dairy calves in early weaning production systems. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.91, p.3156–3164, 2008.

HAYASHI, H.; KAWAI, M.; NONAKA, I.; TERADA, F.; KATOH, K.; OBARA, Y. Developmental Changes in the kinetics of glucose and urea in holstein calves **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 89, p.1654-1661, 2006.

HEINRICHS A.J.; LOSINGER, W.C. Growth of Holstein dairy heifers in the United States. **Journal of Animal Science**, Lancaster, v.76, p.1254-1260, 1998.

HOFFMAN, P. Optimum body size of Holstein replacement heifers. **Journal of Animal Science**, Albany, v.75, p. 836-845, 1997.

JASTER, E.H.; MCCOY, G.C.; TOMKINS, T.; DAVIS, C.L. Feeding acidified or sweet milk replacer to dairy calves. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.73, p.3563-3566, 1990.

JENNY, B.F.; MILLS, S.E.; O'DELL, G.D. Dilution rates of sour colostrum for dairy calves. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.60, p.942, 1976.

JENNY, B.F.; O'DELL, G.D.; JOHNSON, M.G. Microbial and acidity changes in colostrum fermented by natural flora at low and high ambient temperatures. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.60, p.453, 1976.

LARSON, L.L.; OWEN, F.G.; ALBRIGHT, J.L.; APPLEMAN, R.D.; LAMB, R.C.; MULLER, L.D. Guidelines toward more uniformity in measuring and reporting calf experimental data. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.60, p.989–991, 1977.

LUCA, G.C.; REIS, B.F. Espectrofotometria de proteínas totais em plasma de sangue bovino por análise em fluxo. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, p.251-256, 2002.

MACHADO NETO, R.; PRADO, G.V.B.; BESSI, R.; HATTNHER, F.L. Flutuação das proteínas séricas em vacas primíparas e múltíparas no período pré-parto. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 52, n. 1, p. 158-160, 1995.

MARINAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer Extraction Methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, Amsterdam, v.14, p.93-100, 2001.

MULLER, L.D.; LUDENS, F.C.; ROOK, J.A. Performance of calves fed fermented colostrum or colostrum with additives during warm ambient temperatures **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.59, p.930-935, 1976.

MULLER, L.D.; BEARDSLEY, G.L.; LUDENS F.C. Amounts of sour colostrum for growth and health of calves. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.58, p.1360, 1975.

MULLER, L.D.; SYHRE, D.R. Influence of chemicals and bacterial cultures on preservation of colostrum. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.58, p.957, 1974.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirement in dairy cattle**. 7th . ed. Washington : National Academy of Science, 2001. 381p.

NOCEK, J.E.; HEALD, C.W.; POLAN, C.E. Influence of ration physical form and nitrogen availability on ruminal morphology of growing bull calves. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.67, p. 334-343, 1984.

OTTERBY, D.E.; LINN, J.G. Advances in nutrition and management of calves and heifers. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.64, p. 1365-1377, 1981.

OTTERBY, D.E.; JOHNSON, D.G.; POLZIN, H.W. Fermented colostrum or milk replacer for growing calves **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.59, p.2001, 1976.

OTTERBY, D.E. ; JOHNSON, D.G.; FOLEY, J.A.; TOMSCHE, D.S. ; LUNDQUIST, R. G.; HANSON, P. J. Fermented or chemically-treated colostrum and nonsalable milk in feeding programs for calves. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.63, p.951-958, 1980.

POLZIN, H.W.; OTTERBY, D.E. ;JOHNSON, D.G. Responses of calves fed fermented or acidified colostrum. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.60, p.224, 1977.

QUIGLEY III, J.D. Feeding prior to weaning. In: CALVES, HEIFERS AND DAIRY PROFITABILITY NATIONAL CONFERENCE, 1996, Harrisburg. **Proceedings...**, Harrisburg: Northeast regional agricultural engineering service cooperative extension, 1996. p.245-255.

QUIGLEY III, J.D.; BERNARD, J.K. Effects of nutrient source and time of feeding on changes in blood metabolites in young calves. **Journal of Animal Science**, Albany, v.70, p. 1543-1549, 1992.

QUIGLEY III, J.D.; WOLFE, T.M. Effects of spray-dried animal plasma in calf milk replacer on health and growth of dairy calves. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.86, p.586-592, 2003.

QUIGLEY III, J.D; SMITH, Z.P.; HEITMANN, R.N. Changes in plasma volatile fatty acids in response to weaning and feed intake in young calves. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.74, p.258-263, 1991.

RINDSIG, R.B. Sour colostrum dilutions compared to whole milk for calves. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.59, p.1293, 1977.

RINDSIG, R.B.; BODAH, G.W. Performance of calves fed colostrum naturally fermented, or preserved with propionic acid or formaldehyde. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 60, p.79, 1977.

SAALFELD, M.H. Uso da Silagem de colostro como substituto do leite na alimentação de terneiras leiteiras. **A Hora Veterinária**, São Paulo, v.27, p.162, 2008.

SANTOS, J.E.P. Distúrbios metabólicos. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 583p.

SHAHANI, K.M.; SOMMER, H.H. The protein and non-protein nitrogen fractions in milk. I. Methods of analysis. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 34, p. 1003-1009, 1951.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.74, p.3583-3597, 1991.

WEAVER, D.M.; TYLER, J.W.; VANMETRE, D.C.; HOSTETLER, D.E.; BARRINGTON, G.M. Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Melbourne, v.14, p.569–577, 2000.

WEISS, W.P. Predicting energy values of feeds. In: Symposium: prevailing concepts in energy utilization by ruminants. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.76, p.1802-1811, 1993.

YU, Y.; STONE, J.B.; WILSON, M.R. Fermented colostrum for Holstein replacement calf rearing. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.59, p.936, 1976.

6 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A busca por dietas líquidas com custo reduzido para fornecimento a animais em aleitamento é o foco de pesquisas há décadas, principalmente devido ao pouco retorno financeiro relacionado a esses animais durante os primeiros anos de vida.

Desde a década de 70, estudos mostraram que o colostro ou o leite de transição podem ser fornecidos aos animais contribuindo na redução dos custos com o fornecimento de dieta líquida. Todavia, apesar de ser uma prática comum nos sistemas de produção, seu fornecimento fica restrito ao dia da colheita, não sendo comum o armazenamento desse material.

Contudo, embora a possibilidade de armazenamento de colostro excedente sem a necessidade de investimentos em equipamentos pareça válida, a difusão dessa tecnologia não deve ser estendida sem que estudos mais conclusivos sejam conduzidos.

Os resultados deste trabalho mostraram que a composição nutricional do colostro após a fermentação apresentou significativa variação, com expressiva redução em seu valor nutritivo. Estas variações foram ainda mais intensas quando o processo foi realizado em ambiente com maiores temperaturas. Os resultados deste experimento mostram que, em um país com regiões e climas variados como o Brasil, a adoção da técnica de fermentação anaeróbica de colostro pode apresentar diferenças em relação ao produto final que será fornecido aos animais.

Dados disponíveis atualmente sugerem que o balanço nutricional até pelo menos oito semanas de idade têm grande efeito na vida produtiva futura dos animais. Os resultados observados no experimento de desempenho animal mostraram que, quando utilizado como dieta líquida exclusiva, a silagem de colostro compromete o ganho de peso dos animais durante as primeiras semanas. Os dados deste trabalho sugerem que estudos em relação à redução do processo de fermentação inadequada, principalmente em relação à proteólise, devem ser conduzidos para que a técnica possa ser validada e, assim, recomendada a produtores sem restrições ou variações que possam comprometer o crescimento adequado dos animais.