

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

FERNANDA ANTUNES MARTINS

ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DO LEITE DE TRANSIÇÃO
BOVINO *IN NATURA* E FERMENTADO

PONTA GROSSA
2019

FERNANDA ANTUNES MARTINS

ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DO LEITE DE TRANSIÇÃO
BOVINO *IN NATURA* E FERMENTADO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para aprovação na disciplina de Orientação de Trabalho de Conclusão de Curso na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Zootecnia.

Orientador (a): Prof^a Dr^a Luciana da Silva Leal Karolewski

Co-orientador (a): Prof^a Dr^a Ester de Moura Rios

PONTA GROSSA
2019

FERNANDA ANTUNES MARTINS

ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DO LEITE DE TRANSIÇÃO
BOVINO *IN NATURA* E FERMENTADO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para aprovação na
disciplina de Orientação de Trabalho de Conclusão de Curso na Universidade
Estadual de Ponta Grossa, Área de Zootecnia

Ponta Grossa, 26 de junho de 2019

Prof^a Dr^a Luciana da Silva Leal Karolewski - Orientadora

Doutorado em Medicina Veterinária – Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia – UNESP - Botucatu

Prof^a Dr^a Ester de Moura Rios – Co-orientadora

Doutorado em Agronomia – UFPR - Curitiba

Prof^a Dr^a Adriana de Souza Martins

Doutorado em Produção Animal – UNESP - Jaboticabal

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por estar ao meu lado e sempre me dando forças para superar os meus medos.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Luciana da Silva Leal Karolewski, pelo exemplo de profissional que és. Pelo conhecimento, empenho dedicado ao meu projeto de pesquisa, atenção, apoio e paciência durante esses anos.

À Prof^a Dr^a Ester de Moura Rios, pelo conhecimento e por despertar em mim a paixão pela microbiologia, nunca esquecerei a sua espontaneidade e alegria ao ver uma lâmina.

À Valquíria Nanuncio Chochel, pelo conhecimento e modo paciente com que me ensinou a realizar as análises, pelas risadas e confiança. Cresci muito pessoalmente nesse período em que estava de licença, foi um período estressante, confesso, mas criei muita responsabilidade e comprometimento.

Às meninas do laboratório Ingrid Caroline da Silva, Gabrielle Marcondes e Alana Cristine de Sousa, pela ajuda, compreensão e respeito durante esses anos, sem vocês não conseguiria desenvolver este projeto.

Aos meus pais Rosana Antunes e Vanderlei Correa Martins, mas em especial à minha mãe que me apoiou desde o início e nunca desacreditou do meu potencial. Meu eterno amor e gratidão por todos os conselhos e compreensão.

Às minhas amigas Caroline de Almeida Ribas, Fabiane Saad Talegnani, Joslaine Aparecida Dezone, Isabel Cristina da Silva e Joyce Isabel Domingos de Oliveira pela amizade forte que criamos, pelas risadas e conversas. Minha eterna gratidão à todas vocês.

À Fundação Araucária, pela bolsa de Iniciação Científica.

Aos demais colegas e professores envolvidos, meu muito obrigada.

RESUMO

Os objetivos da pesquisa foram avaliar as características físico-químicas, o perfil microbiano e determinar a sensibilidade aos antibióticos de enterobactérias isoladas do leite de transição bovino *in natura* e fermentado por 21, 30, 60, 90, 120 e 180 dias, coletados de dez vacas leiteiras. As variáveis físico-químicas estudadas foram: pH, temperatura, porcentagem de sólidos totais (ST) e densidade. Foram realizadas diluições seriadas e inoculações das amostras em meios de cultura enriquecidos e seletivos. Após a quantificação, procederam-se os testes morfotintorial, bioquímico e de antibiograma. Os resultados de pH variaram de 6,00 para o leite de transição *in natura* à 4,00 no D120 e D180 de fermentação. A temperatura oscilou de 21,30 a 23,33°C e a densidade no D0 foi de 1,031 g.mL⁻¹. Em relação a (%)ST, o D0 destacou-se (13,79%) e os demais tempos de fermentação não diferiram. No D60 nenhum crescimento de enterobactérias foi identificado, enquanto que as bactérias ácido-láticas (BAL) aumentaram significativamente até o D90. Bactérias multirresistentes foram encontradas até o D30 e 29% das bactérias do leite de transição *in natura* apresentaram índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA) ≥0,3. Conclui-se que a fermentação do leite de transição resulta em redução do pH, não influencia na temperatura e na densidade e mostra redução na (%)ST apenas com 21 dias de fermentação. As BAL mantiveram-se viáveis até os 90 dias e os patógenos reduziram durante o período de 180 dias. As bactérias multirresistentes são eliminadas com o processo fermentativo e, de maneira geral, as enterobactérias são sensíveis aos antibióticos.

Palavras-chave: Aleitamento. Anaerobiose. Bezerras. Microbiologia.

ABSTRACT

The objectives of the research were to evaluate the physicochemical characteristics, the microbial profile and to determine the antibiotic sensitivity of enterobacteria isolated from *in natura* and transition milk fermented for 21, 30, 60, 90, 120 and 180 days. The samples were collected from ten dairy cows. The physicochemical variables studied were: pH, temperature, percentage of total solids (%TS) and density. Serial dilutions and incubations of the samples were made using enriched and selective culture media. After quantification, the morphotintorial, biochemical and antibiogram tests were performed. The pH results ranged from 6.00 for the *in natura* transition milk to 4.00 on D120 and D180 of fermentation. The temperature ranged from 21,30 to 23,33°C and the D0 density was 1,031 g.mL⁻¹. In relation to %TS, D0 stood out (13.79%) and the remaining fermentation periods did not differ. On D60 no increases of enterobacteria were identified, while lactic acid bacteria (LAB) increased significantly up to D90. Multi-resistant isolated bacteria were found up to D30 and 29% of the bacteria from *in natura* transitional milk had a multiple antibiotic resistance index (IRMA) ≥0.3. It is concluded that the fermentation of the transition milk results in a reduction of pH, does not influence the temperature and the density and there is a reduction in the %TS only up to 21 days of fermentation. The LAB remains viable for 90 days and the pathogens reduce during the 180 day period. The multi-resistant bacteria are eliminated with the fermentation process and the enterobacteria are found to be sensitive to antibiotics.

Keywords: Suckling. Anaerobiosis. Calves. Microbiology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Frequências absolutas de enterobactérias conforme o índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA) em leite de transição bovino <i>in natura</i> (D0) e fermentado por 21 (D21) e 30 dias (D30), Fazenda Escola Capão da Onça, Ponta Grossa/PR, 2019.....	25
---	----

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Valores médios e erro padrão da média (EPM) de pH, temperatura (°C), sólidos totais (ST – %) e densidade (g.mL⁻¹) do leite de transição bovino *in natura* e da silagem de leite de transição conforme o tempo de fermentação, Fazenda Escola Capão da Onça, Ponta Grossa, PR, 2019.....17
- Tabela 2 – Médias de log UFC mL⁻¹ dos grupos de micro-organismos isolados do leite de transição bovino *in natura* e da silagem de leite de transição nos diferentes tempos de fermentação, Fazenda Escola Capão da Onça, Ponta Grossa/PR, 2019.....20
- Tabela 3 - Frequência relativa em porcentagem de enterobactérias sensíveis aos antibióticos em leite bovino de transição *in natura* e fermentado, Fazenda Escola Capão da Onça, Ponta Grossa/PR, 2019.....24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MRSA	Ágar Man, Rogosa and Sharpe
ANOVA	Análise de Variância
BAL	Bactérias ácido lácticas
LIS	Descarboxilação da lisina
ORN	Descarboxilação da ornitina
FESCON	Fazenda Escola Capão da Onça
GLI	Fermentação da glicose
g	Gramas
°C	Graus Celsius
IgG	Imunoglobulina G
IRMA	Índice de resistência múltipla aos antimicrobianos
IND	Indol
TRI	L-triptofano
µL	Microlitro
mL	Mililitro
MOT	Motilidade
PET	Politereftalato de etileno
%ST	Porcentagem de sólidos totais
pH	Potencial hidrogeniônico
GAS	Produção de gás a partir da glicose
H ₂ S	Produção de gás sulfídrico
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
2.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	13
2.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	13
2.2.1 Caracterização morfológica.....	14
2.2.2 Caracterização bioquímica	14
2.2.3 Antibiograma.....	15
2.2.3.1 Índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA).....	16
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	16
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4. CONCLUSÕES	26
REFERÊNCIAS.....	27

1. INTRODUÇÃO

As fases de cria e recria na bovinocultura leiteira, correspondentes à criação de bezerras e novilhas, respectivamente, constituem parte importante dos custos de uma atividade leiteira. Segundo Silva et al. (2011) o custo da criação dos animais de reposição é de 15 a 20%, atrás somente dos custos com a alimentação. A fase de cria, em particular, é um desafio, pois representa custos sem retorno a curto prazo e os animais nesta idade acabam não recebendo a atenção que é exigida pela categoria (SILPER et al., 2012).

Nas fases supracitadas ocorre o crescimento corporal rápido que afeta diretamente o desenvolvimento do tecido mamário. Do nascimento até três meses de vida, o desenvolvimento da glândula mamária é isométrico, ou seja, acompanha o crescimento do corpo. Dos três até nove meses, o crescimento do tecido mamário é considerado alométrico, pois é maior em comparação ao crescimento corporal. Esse período é de extrema importância, já que as bezerras serão as futuras vacas do plantel. Desta forma, é imprescindível assegurar a substituição das vacas mais velhas por primíparas com maior potencial de produção e saudáveis (AZEVEDO; COELHO, 2016). Esse cuidado especial deve-se iniciar desde as primeiras horas de vida.

A placenta dos bovinos, é do tipo sinepiteliocorial ou também denominada sindesmocorial, pois as células trofoblásticas fetais fundem-se com as células endometriais para formar células binucleadas (FRANDSON; WILKE; FAILS, 2011a). Este tipo de placenta é impermeável às macromoléculas, a fim de prevenir a transmissão vertical de micro-organismos. No entanto, os anticorpos maternos também não são transferidos passivamente para o feto (CHASE; HURLEY; REBER, 2008). Dessa maneira, os bezerros nascem vulneráveis às infecções ambientais, adquirindo a imunidade passiva através do consumo do colostro.

O colostro é a primeira secreção da glândula mamária pós-parto, sendo rico em proteínas, imunoglobulinas, minerais, vitaminas, sólidos totais e cinzas (ANDRADE; ANSELMI; MENDES, 2010). Nas ordenhas seguintes, o colostro passa a ser denominado leite de transição e a partir da 7ª ou 8ª ordenha se obtém o leite (SANTOS et al., 2002).

O colostro é uma ótima fonte de energia oriunda das proteínas e dos lipídios, sendo importante o consumo logo após o nascimento, pois os neonatos nascem com quantidades limitadas de gordura corporal e outras fontes de energia metabólica, além de ser a forma primordial de imunização passiva. Apresenta baixa concentração de

lactose porque a progesterona, que está em concentração elevada no sangue da mãe durante a gestação, inibe a síntese da enzima alfa-lactoalbumina, a qual, é necessária para a síntese de lactose (FRANDSON; WILKE; FAILS, 2011b). Quando verifica-se a redução desse hormônio no final da estação, a alfa-lactoalbumina eleva-se novamente e há a síntese da lactose (SILVA et al., 2014).

No aleitamento convencional, os bezerros recebem quantidades diárias fixas, em torno de quatro litros de leite ou de sucedâneo reconstituído com aproximadamente 12,5% de sólidos (AZEVEDO; COELHO, 2016). Para criar um bezerro até a sua desmama os produtores utilizam em média 200 litros de leite, que poderia ser comercializado. Assim sendo, eles acabam amamentando os bezerros de forma incorreta (HUBERT et al., 2014) fornecendo leite mastítico ou com resíduos de antibióticos sem pasteurização.

O colostro é produzido em quantidades maiores do que as exigidas pelos bezerros e o excedente não é comercializado. Assim técnicas de armazenamento vêm sendo estudadas há muitos anos e uma delas é a fermentação obtida com o armazenamento de forma anaeróbica (AZEVEDO; DUARTE, 2013). O acondicionamento anaeróbico do colostro e do leite de transição excedente em garrafas plásticas de politereftalato de etileno (PET) é conhecido como silagem de colostro, que consiste no preenchimento completo das garrafas PET com colostro ou leite de transição, sem espaço para o ar e por um período mínimo de 21 dias (SAALFELD, 2008).

A fermentação anaeróbica do colostro pode ser uma ótima opção como substituto do leite na alimentação de bezerras, pois a silagem de colostro preserva as características nutricionais e imunológicas, assegurando a transferência de anticorpos para os bezerros, além de não representar custo ao produtor (SAALFELD et al., 2013). O material fermentado e estocado até um ano e meio, quando fornecido às bezerras em quantidades de quatro litros/dia diluídos em água, proporcionou ganhos médios de 823 g/dia (SAALFELD, 2008).

Segundo Ferreira et al. (2013) a fermentação por micro-organismos benéficos, como as bactérias ácido lácticas (BAL), e a redução do potencial hidrogeniônico (pH) com o decorrer do processo fermentativo pode preservar o colostro à temperatura ambiente.

O colostro pode ser contaminado por micro-organismos que prejudicam a performance animal, aumentando as taxas de morbidade e mortalidade dos bezerros.

Esses micro-organismos são oriundos da glândula mamária ou da contaminação do colostro durante a ordenha, a manipulação e o armazenamento (SANTOS et al., 2017). Silagens de colostro com fermentação adequada apresentam ausência de enterobactérias, *Staphylococcus* spp. e fungos. A maior prevalência destes pode ser um dos fatores responsáveis pelo aspecto pútrido e odor característico (AZEVEDO et al., 2014a).

Deste modo, o presente estudo teve como objetivos avaliar as características físico-químicas, conhecer o perfil microbiano e a susceptibilidade aos antimicrobianos de interesse zootécnico do leite de transição bovino *in natura* e fermentado por até 180 dias.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Fazenda Escola Capão da Onça (FESCON), localizada em Ponta Grossa/PR (latitude 25°05'49"S, longitude 50°03'11"W, sendo o ponto mais alto a 1.027 m de altitude com precipitação média anual de 1.545 mm e temperatura média anual de 18,7°C) no período de junho de 2017 a dezembro de 2018. Foram utilizadas amostras de leite de transição de dez vacas leiteiras da raça Holandesa e *tricross* (Jersey x Holandesa x Illawarra), com idade média de 5,9 anos e número médio de lactações de 3,7.

Os leites de transição foram obtidos assepticamente entre o 1º e o 3º dia pós-parto (a partir da 2ª até a 6ª ordenha) e armazenados em garrafas plásticas PET de 500 mL, previamente higienizadas com detergente neutro, enxaguadas com água quente e secadas naturalmente. O líquido preencheu completamente o volume da garrafa, para não ocorrer o acúmulo de ar e, conseqüentemente, proporcionar um ambiente anaeróbico. As garrafas foram identificadas (nome do animal, data do parto e dia da colheita após o parto) e armazenadas em um local sem a incidência da luz solar direta, à temperatura ambiente.

As amostras do leite de transição *in natura* foram mantidas refrigeradas até o momento da análise. O leite de transição foi analisado *in natura* (D0) e nos dias 21 (D21), 30 (D30), 60 (D60), 90 (D90), 120 (D120) e 180 (D180) após o envase, totalizando dez repetições em sete momentos diferentes. As análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Anatomia e Reprodução Animal, Departamento de Zootecnia, na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa – PR.

2.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Os parâmetros estudados foram: pH, temperatura, porcentagem de sólidos totais e densidade.

Desse modo, 100 mL de cada amostra foram transferidos para um béquer para imersão da fita indicadora de pH (J. Prolab[®]). Para a mensuração da temperatura e da densidade (°Quevenne) com o uso de termolactodensímetro calibrado a 20°C (Incoterm[®]) 250 mL da amostra foram depositados em proveta plástica. A densidade, obtida em °Quevenne foi corrigida conforme a temperatura e transformada para unidade g.mL⁻¹ por meio da fórmula (1) descrita por López (2007).

$$^{\circ}\text{Quevenne} = (\text{densidade} - 1) \times 1000 \quad (1)$$

Para análise de sólidos totais (ST) inicialmente foi obtida a % Brix, utilizando-se o refratômetro manual (Biobrix Equipar[®] - escala 0 a 32%), em que duas gotas da secreção láctea foram depositadas no equipamento com auxílio de uma pipeta de *Pasteur* descartável, e por meio da equação (2) descrita por Moore et al. (2009), obteve-se a porcentagem ST.

$$(\%)\text{ST} = \% \text{ Brix} + 2 \quad (2)$$

2.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

O procedimento iniciou com a deposição de 500 mL de leite de transição *in natura* ou fermentado em béquer de 1000 mL que foram homogeneizados com bastão de vidro. Posteriormente foram feitas as diluições em série onde em um tubo plástico do tipo *ependorf* (1,5 e 2 mL de volume) 100 µL do leite de transição foram adicionados e homogeneizados a 900 µL de água salina estéril obtendo-se a diluição 10⁻¹. Em seguida, 100 µL da solução diluída 10⁻¹ foram adicionados a 900 µL de água salina estéril obtendo-se a diluição 10⁻² e assim sucessivamente até a diluição 10⁻⁶.

As amostras diluídas em série foram inoculadas nos seguintes meios de cultura: MRSA (bactérias lácticas), ágar sangue (bactérias totais), ágar fungo acrescido de Chemitril[®] Injetável 2,5% na dosagem de 1 mL/500 mL (fungos e leveduras), ágar macconkey (enterobactérias), ágar cetrimide (*Pseudomonas*) e ágar manitol (estafilococos). Após incubação em estufa tipo BOD a 35°C por 24 a 48 horas para bactérias e 25°C por 5 dias para fungos e leveduras, procedeu-se as contagens das

placas que teriam crescimento microbiano entre 30 e 300 colônias e assim se determinou as Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Posteriormente realizou-se a caracterização morfotintorial, bioquímica e o antibiograma das colônias prevalentes.

2.2.1 Caracterização morfotintorial

Procedeu-se a coloração de Gram das principais colônias isoladas em cada meio de cultura, a fim de se determinar a morfologia (cocos ou bacilos), o arranjo das bactérias (diplococos, tétrades, sarcina, estreptococos, estafilococos, diplobacilos, estreptobacilos e cocobacilos) e se eram Gram-positivas ou negativas.

2.2.2 Caracterização bioquímica

A prova de catalase foi realizada para bactérias Gram-positivas, da seguinte maneira: com a alça de platina flambada, colocava-se sobre uma lâmina um pouco da colônia e adicionava-se uma gota de água oxigenada. Observava-se a formação de bolhas de ar, indicando resultado positivo para catalase, devido a conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio gasoso. Já a prova de oxidase foi aplicada para bactérias Gram-negativas, com uma ponteira estéril encostava-se em uma colônia e a pressionava sobre a superfície da fita de oxidase (Laborclin®). O desenvolvimento de uma coloração preta caracterizava prova de oxidase positiva, indicando a produção intracelular da enzima oxidase pela bactéria.

Para a identificação bioquímica das bactérias foi usado o Kit para Enterobactérias (Laborclin®), que identificava apenas bacilos Gram-negativos, oxidase negativa e que eram fermentadores de glicose.

Com a agulha bacteriológica flambada e fria encostava-se na superfície de uma colônia e a inoculava no tubo número 1 (Rugai) por picada central até o fundo do tubo e depois semeava-se por estrias na superfície inclinada do meio. O tubo era fechado deixando-se a tampa frouxa, devido a produção de gás no decorrer da incubação. Usando a mesma agulha, a amostra da colônia foi inoculada no tubo número 2 (LMI) por picada central e ainda com a mesma agulha foi inoculada no tubo número 3 (MIO) também por picada central. Para o tubo número 4 (Rhamnose) era flambada a agulha, encostada na mesma colônia, semeada em superfície no meio e colocadas duas a três gotas de vaselina estéril a fim de garantir um ambiente anaeróbio. A agulha era flambada novamente, encostada na mesma colônia e

semeada na superfície do tubo número 5 (Citrato). Todos os tubos foram incubados em estufa tipo BOD, a uma temperatura média de 35°C por 18-24 horas.

A leitura dos resultados foi realizada com o auxílio de um manual disponibilizado pelo fabricante. Para o tubo número 1, o Kit oferecia as provas bioquímicas de desaminação do L-triptofano (TRI), fermentação da glicose (GLI), produção de gás a partir da glicose (GAS), produção de gás sulfídrico (H₂S) e hidrólise da ureia; o tubo número 2 disponibilizava a prova de descarboxilação da lisina (LIS); o tubo número 3 concedia as provas de descarboxilação da ornitina (ORN), motilidade (MOT) e indol (IND) no qual eram adicionadas duas a quatro gotas do reativo de Kovac's sobre a superfície do meio; o tubo número 4 proporcionava a prova de rhamnose e o tubo número 5 a prova do citrato.

2.2.3 Antibiograma

Os morfotipos predominantes caracterizados como bacilos Gram-negativos e oxidase negativos foram testados.

Os antibiogramas das bactérias identificadas foram realizados em meio ágar Mueller-Hinton. Com a agulha bacteriológica flambada encostava-se na superfície da colônia e colocava-se a amostra em recipientes de vidro com água destilada até ajustar a turvação conforme ao tubo número cinco da escala de *Mc Farland*. A semeadura do inóculo no meio ágar Mueller-Hinton foi realizada com *swab*, este era embebido no inóculo e delicadamente esfregado em toda a superfície do ágar. Os discos de antibióticos de interesse zootécnico usados foram das seguintes classes: β-lactâmicos (ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, penicilinas e as cefalosporinas como cefoxitina, ceftiofur, ceftazidima, cefalotina, cefepime e cefuroxima axetil - oral), tetraciclina (doxiciclina e tetraciclina), aminoglicosídeos (gentamicina e amicacina), anfenicóis (cloranfenicol), fluoroquinolonas (ciprofloxacino, enrofloxaxina e norfloxacino), carbapenêmicos (meropenem) e sulfametoxazol/trimetoprim (sulfazotrim). As placas foram incubadas em estufa tipo BOD, a temperatura média de 35°C por 24 horas. Os halos de inibição foram quantificados com uma régua e com o auxílio de tabelas fornecidas pelos fabricantes dos antibióticos os agentes foram classificados como suscetíveis, intermediários ou resistentes ao antibiótico em questão.

2.2.3.1 Índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA)

O IRMA foi calculado através da fórmula (3).

$$\text{IRMA} = a/b \quad (3)$$

Em que o número de classes de antibióticos ao qual o isolado foi resistente (a) foi dividido pelo número de classes de antibióticos ao qual o isolado foi testado (b) (KRUMPERMAN, 1983).

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizou-se o programa estatístico Minitab18[®] e para avaliar o efeito do tempo de fermentação nas variáveis pH, temperatura, %ST e densidade, as médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA). As contagens de UFC foram convertidas em log UFC mL⁻¹ e para avaliar o efeito do tempo de fermentação, as médias também foram submetidas à ANOVA. Para as variáveis que apresentaram resposta significativa, as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

A porcentagem de enterobactérias sensíveis aos antibióticos testados foi calculada através da frequência relativa e, posteriormente, foi determinado o IRMA para cada enterobactéria isolada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 encontram-se os resultados médios obtidos para as análises físico-químicas.

Tabela 1 - Valores médios e erro padrão da média (EPM) de pH, temperatura (°C), sólidos totais (ST – %) e densidade (g.mL⁻¹) do leite de transição bovino *in natura* e da silagem de leite de transição conforme o tempo de fermentação, Fazenda Escola Capão da Onça, Ponta Grossa, PR, 2019

Dias de fermentação	Variáveis			
	pH ± EPM	Temperatura (°C) ± EPM	(%) ST ± EPM	Densidade (g.mL ⁻¹) ± EPM
D0	6,0±0,00 ^a	21,90±0,86	13,79±0,33 ^a	1,031±0,00
D21	4,9±0,10 ^b	22,60±1,06	9,17±0,58 ^b	1,030±0,00
D30	4,7±0,15 ^{bc}	22,10±0,92	8,67±0,36 ^b	1,026±0,00
D60	4,4±0,16 ^{cd}	21,30±0,79	9,90±0,46 ^b	1,024±0,00
D90	4,2±0,13 ^d	22,80±0,73	10,66±0,85 ^b	1,025±0,00
D120	4,0±0,00 ^d	22,40±0,96	9,67±0,42 ^b	1,028±0,00
D180	4,0±0,00 ^d	23,33±0,67	10,66±0,50 ^b	1,025±0,00

Letras minúsculas divergentes nas colunas indicam diferença significativa (P<0,05).

Fonte: A autora

Os resultados obtidos para a análise de pH mostraram aumento da acidez de forma significativa (P<0,05) conforme o tempo de armazenamento, sendo que a queda do pH estabilizou-se a partir dos 90 dias. Os valores médios oscilaram de 6,0 para o leite de transição *in natura* ao valor mínimo de 4,0 medido na silagem de leite de transição com 120 e 180 dias de fermentação. O declínio do pH coincide com um maior desenvolvimento de BAL e, conseqüentemente, transformação da lactose em ácido láctico que é responsável pelo aumento da acidez (FERREIRA et al., 2013).

Os resultados encontrados foram semelhantes aos obtidos por Saalfeld et al. (2013), que obtiveram pH médio de 6,5 para o colostro fresco e pH médio de 4,0 para a silagem de colostro com 60 dias de fermentação e sugeriram que o pH foi um dos fatores de inibição do crescimento dos micro-organismos na silagem de colostro.

A temperatura do leite de transição não apresentou diferença significativa ao longo do tempo de armazenamento, com valores oscilando entre 21,30 a 23,33°C. Sabe-se que a temperatura ambiente tem maior influência sobre a temperatura da silagem do que o próprio processo fermentativo. No estudo, poucas garrafas quando abertas apresentaram odor pútrido, característico de intensa atividade proteolítica de

colostros fermentados a 32,5°C (FERREIRA et al., 2013) e houve apenas 3% de perdas, devido ao estouro de garrafas em processo fermentativo.

Quanto à porcentagem de sólidos totais (minerais, lactose, gordura e proteína) houve diferença significativa ($P < 0,05$) apenas entre o D0 e os demais tempos de fermentação. De acordo com Moore et al. (2009) o pH é significativamente correlacionado com o teor de ST, ou seja, quanto menor o pH, menor o teor de ST. Como já mencionado, a lactose é o principal substrato usado pelas BAL para a sua sobrevivência e como produto desse metabolismo há produção de ácido láctico, reduzindo o pH. Segundo Ferreira et al. (2013) as mudanças mais pronunciadas na composição nutricional de silagens de colostro ocorrem durante os primeiros dias de fermentação e quando submetidas a altas temperaturas (32,5°C). Quando a fermentação ocorre em temperaturas mais baixas (22,5°C) a mudança na composição nutricional é mais suave. No presente trabalho, as temperaturas de armazenamento foram mais baixas, podendo ser a possível explicação de não ter ocorrido diferença significativa na concentração de ST a partir do D21.

Os valores de ST encontrados para o leite de transição *in natura* foram superiores aos valores médios encontrados por Ribas et al. (2015) que analisaram 1.950.034 amostras de leite refrigeradas de tanques coletadas pelas indústrias de beneficiamento em propriedades leiteiras localizadas em dez regiões no Estado do Paraná. Os autores encontraram médias de $12,29 \pm 0,85\%$ de sólidos totais, porém, em países como a Nova Zelândia e Canadá, que implementam programas de melhoria da qualidade do leite, o teor de ST variou de 13,12% a 13,95%.

Yu; Stone e Wilson (1975) analisaram o comportamento dos ST durante o processo fermentativo do colostro e identificaram valores de 20,06% no colostro fermentado *in natura* e decréscimo de até 14,75% dos oito aos 35 dias de armazenamento.

A verificação do teor de ST de amostras de silagem de colostro ou de leite de transição antes do fornecimento às bezerras é um procedimento importante que pode servir como parâmetro da qualidade nutricional. Uma alternativa para as silagens que apresentam baixo teor de ST é o seu fornecimento misturado em leite, pois, dessa forma, não compromete o desenvolvimento corporal e do trato digestivo de bezerros até os 60 dias de idade (AZEVEDO et al., 2014b).

A densidade do leite está ligada à matéria dissolvida e suspensa no volume em estudo, ou seja, está ligada à sua composição (BRASIL, 2013) e é a relação entre

a massa e o volume da secreção láctea. No presente trabalho, o tempo de fermentação não mostrou efeito significativo sobre a densidade da secreção láctea, mas verificou-se redução numérica.

A densidade do leite de transição *in natura* foi de $1,031 \pm 0,00 \text{ g.mL}^{-1}$, concordando com os valores obtidos por Morin et al. (2001) que identificaram a densidade específica do colostro ordenhado até 12 horas após o parto, de 1,026 a $1,085 \text{ g.mL}^{-1}$.

De acordo com Morin et al. (2001) a densidade do colostro está associada à raça, ao número de lactações, ao mês de parição e ao ano do parto. Colostro de vacas Pardo Suiço e Ayrshire apresentaram valores mais baixos de densidade comparados com colostro de vacas das raças Holandesa e Jersey. Na FESCON, as vacas eram da raça Holandesa e *tricross* (Jersey x Holandesa x Illawarra) o que influenciou na densidade do leite de transição analisado. Segundo Thaler Neto; Rodrigues e Córdova (2013) vacas mestiças Holandesas x Jersey apresentam teores mais elevados de gordura (2,63%) no leite em comparação às vacas puras Holandesas (2,35%).

Colostros de vacas com três ou mais lactações possuem maior densidade, em razão da maior concentração de imunoglobulinas, em comparação com as vacas primíparas e de segunda lactação (MORIN et al., 2001). Neste estudo, 50% dos animais apresentaram três ou mais lactações e os demais menos do que três lactações. Esse atributo não influenciou nos resultados de densidade, já que o número de animais com três ou mais lactações e menos do que três lactações foi o mesmo.

Outro fator que pode interferir na densidade do leite de transição é a estação climática de parição. No caso do presente estudo, 90% das vacas pariram nas estações compreendidas entre outono e inverno que, segundo Morin et al. (2001), propiciam valores superiores de densidade, uma vez que o estresse calórico, observado no verão, causa a diminuição da densidade láctea.

Os sólidos não gordurosos (proteína, lactose e minerais) possuem densidade maior do que a da água, portanto, quanto maior o teor de sólidos não gordurosos, maior a densidade (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008). De acordo com os estudos realizados por Saalfeld et al. (2013), a silagem de colostro mantém os valores de proteína (14,2%), matéria seca (17,5%), gordura (5,5%), minerais (1,7%) e pH abaixo de 4,0 após 60 dias de fermentação, demonstrando que a silagem de colostro é capaz de manter as características necessárias para atender as exigências nutricionais de bezerros em desenvolvimento.

Já a gordura possui densidade menor do que a da água, assim sendo, quanto menor o teor de gordura, maior a densidade (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008). Tavares (2018) analisou os teores de gordura de amostragens de leite de transição oriundas de quatro vacas leiteiras nos tempos de fermentação D0 e D21. No D0 o teor de gordura variou de 2,93 a 3,64% e no D21 oscilou de 2,60 a 3,43%. Segundo o NRC (2001) a exigência nutricional de bezerros, em fase de aleitamento, em relação à energia digestível é de 1,17 Mcal/dia à 3,86 Mcal/dia, para bezerros com 25 e 50 kg, respectivamente. A baixa variação é explicada pela pouca presença de lipases, enzimas encarregadas por degradar os lipídios, produzidas pelos micro-organismos presentes no material (ROBISON; TAMINE, 1999 apud FERREIRA, 2011).

Pode-se observar que o tempo de armazenamento da silagem do leite de transição bovino influenciou algumas características físico-químicas avaliadas, dessa maneira a realização de análises bromatológicas é interessante para estudar de forma mais detalhada a composição dos sólidos totais e assim compreender as mudanças dos componentes conforme o tempo de fermentação.

As contagens dos principais grupos de micro-organismos isolados do leite de transição *in natura* e fermentado estão listadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Médias de log UFC mL⁻¹ dos grupos de micro-organismos isolados do leite de transição bovino *in natura* e da silagem de leite de transição nos diferentes tempos de fermentação, Fazenda Escola Capão da Onça, Ponta Grossa/PR, 2019

Grupos de micro-organismos	Tempo de fermentação						
	D0	D21	D30	D60	D90	D120	D180
Bactérias totais	5,13 ^{bc*}	7,53 ^a	6,75 ^{ab}	5,26 ^{abc}	5,39 ^{abc}	3,73 ^{cd}	1,86 ^d
BAL	3,89 ^d	7,31 ^a	6,83 ^{ab}	6,43 ^{ab}	5,98 ^{abc}	5,19 ^{bcd}	4,05 ^{cd}
Enterobactérias	3,39 ^a	2,46 ^a	1,60 ^{ab}	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b
Leveduras	0,79	1,15	0,40	0	0,71	0	0,71
Estafilococos	1,20	1,57	0,56	0	0,68	0,28	0
Pseudomonas	1,11	0	0	0	0	0	0,40

* Médias com letras diferentes nas linhas são significativamente diferentes (P<0,05).

Fonte: A autora

A quantidade de bactérias totais no leite de transição *in natura* foi de 5,13 log UFC mL⁻¹, não diferindo estatisticamente do D30, D60, D90 e D120. Com 21 dias de fermentação houve aumento significativo nas contagens de bactérias totais, mas as mudanças também foram qualitativas.

Níveis de contaminação para bactérias totais acima de 100.000 UFC mL⁻¹ (5 log UFC mL⁻¹) não são adequados para alimentação de bezerros (McGUIRK; COLLINS, 2004; SANTOS et al., 2017). No presente estudo foram encontradas médias acima deste valor no D0, D21, D30, D60 e D90. Considerando o nível de contaminação para bactérias totais, o leite de transição *in natura* e a silagem de leite de transição até 90 dias de fermentação não poderiam ser fornecidos para os bezerros. No entanto, como mencionado, as mudanças também foram qualitativas e o meio de cultura ágar sangue é enriquecido, por isso, as contagens de bactérias totais neste meio não refletiram a mudança na composição da microbiota que ocorreu durante o processo fermentativo observada nos meios seletivos.

As colônias crescidas no MRSA foram isoladas e caracterizadas como bacilos ou cocos Gram-positivos, não esporulados e catalase negativos, características presuntivas para BAL. Santos et al. (2017) relataram quantidades de BAL em colostro entre 4,5 a 5,1 log UFC mL⁻¹.

Houve aumento significativo das BAL aos 21 dias e esta população manteve-se viável até os 90 dias de fermentação e, posteriormente, houve um declínio, possivelmente pela falta de substrato para a sua manutenção. A sobrevivência desse grupo no alimento fermentado é fundamental, pois as BAL são importantes agentes probióticos e antagonistas das bactérias patogênicas e, ao fermentarem a lactose do leite produzindo ácido lático, podem impedir a deterioração do produto e a transmissão de doenças e toxinas (WOUTERS, 2002). A ação antimicrobiana das BAL deve-se também à biossíntese de compostos antimicrobianos (HUERTAS, 2010). Entre os compostos produzidos pelas BAL, destacam-se os ácidos orgânicos, diacetil, peróxido de hidrogênio, bacteriocina ou proteínas bactericidas (BARTKIENE et al., 2018). Estes eventos podem explicar a redução significativa das enterobactérias.

Os morfo-tipos predominantes (enterobactérias) em ágar macconkey foram isolados e caracterizados como bacilos Gram-negativos e oxidase negativos. No leite de transição *in natura* foram identificadas bioquimicamente as espécies: *Enterobacter amnigenus*, *Escherichia coli*, *Citrobacter diversus*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter amalonanicus*, *Serratia liquefaciens* e *Citrobacter freundii*, importantes agentes

causadores de diarreia em bezerros. Aos 21 de fermentação foram isoladas seis enterobactérias predominantes e dentre elas foram identificadas *Hafnia alvei* e *Escherichia coli*. Com 30 dias de fermentação foram isoladas *Escherichia coli*, *Citrobacter diversus* e *Serratia rubidaea*. Houve redução significativa das enterobactérias apenas aos 60 dias de fermentação. Desta forma, considerando este atributo, a silagem do leite de transição bovino pode ser fornecida aos bezerros aos 60 dias de fermentação, pois reduz o risco potencial de transmissão de doenças, além de que as BAL mantêm-se viáveis garantindo a qualidade da silagem.

O principal fator para desenvolvimento de enterobactérias é a falta de higiene antes e durante a ordenha do colostro e em seu armazenamento. Além de degradarem os carboidratos, micro-organismos como *Escherichia coli* e *Salmonella* podem estar presentes no colostro e são responsáveis por causar diarreia em bezerros (SANTOS et al., 2017). Além do mais, as enterobactérias presentes no colostro e no leite de transição ligam-se às imunoglobulinas livres no lúmen intestinal ou bloqueiam a absorção e o transporte das imunoglobulinas através das células epiteliais, impedindo a absorção das mesmas (GODDEN, 2008).

Com 60 dias de armazenamento não houve crescimento de leveduras, no entanto, com 90 e 180 dias de armazenamento houve crescimento de fungos filamentosos e leveduras em apenas uma das vacas, podendo se tratar de uma possível contaminação ambiental do material no decorrer da realização da análise.

No D90 e D120 foram isolados do ágar manitol *Staphylococcus aureus* e diplococos, Gram-positivos, respectivamente. Segundo Oliveira e Medeiros (2015) o *Staphylococcus aureus* é o principal causador de mastite em bovinos leiteiros, em razão de seus mecanismos de defesa, presença do biofilme, resistência aos antibióticos, a baixa taxa de cura e à presença desses micro-organismos no ambiente de ordenha, nos animais e no homem.

A glândula mamária das novilhas é considerada não infectada por micro-organismos causadores de mastite até o início da primeira lactação. No entanto, estafilococos coagulase negativo (ECN) têm sido isolados (LAFFRANCHI et al., 2001). Os autores avaliaram 88 novilhas e descreveram que 84% dos quartos mamários examinados foram positivos para ECN no primeiro dia pós-parto.

Segundo Vlieghe et al. (2012) o controle e a prevenção da mastite em novilhas consiste em evitar a mamada cruzada em bezerras; oferecer uma dieta balanceada, de modo a minimizar o balanço energético negativo pré-parto e pós-

parto; higiene e disponibilizar bem-estar às novilhas, já que são mais susceptíveis aos patógenos causadores de mastite.

O grupo das *Pseudomonas* sp., micro-organismos aeróbios estritos e psicrotróficos, foi eliminado com o processo fermentativo até os 120 dias, no entanto houve a identificação de bactérias deste mesmo gênero no último período de análise (D180). A presença desses micro-organismos sinaliza que o leite começou a se deteriorar (BALLARDIN et al., 2014; NUÑEZ; NUÑES, 1983) o que pode ocorrer em um processo fermentativo longo.

Diferentemente do presente experimento, Saalfeld et al. (2013) verificaram a presença de *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Bacillus* spp., e leveduras do gênero *Candida* spp. no colostro e na silagem até 14 dias de armazenamento. A partir de 21 dias de fermentação isolaram apenas bactérias do gênero *Lactobacillus* spp.

Para escolha adequada do antimicrobiano a ser utilizado no tratamento de mastite ou no protocolo de secagem, recomenda-se fazer a cultura microbiológica, a fim de identificar o micro-organismo e realizar o antibiograma do isolado, com a finalidade de monitorar o perfil de resistência aos antibióticos do isolado em questão.

O perfil de susceptibilidade aos antibióticos das enterobactérias isoladas do leite de transição *in natura* e fermentado encontra-se na Tabela 3. Todas as enterobactérias isoladas foram sensíveis aos antibióticos de amplo espectro: fluorquinolonas (ciprofloxacino, enrofloxacino e norfloxacino), anfenicóis (cloranfenicol) e à cefalosporina de terceira geração (ceftiofur).

Tabela 3 - Frequência relativa em porcentagem de enterobactérias sensíveis aos antibióticos em leite bovino de transição *in natura* e fermentado, Fazenda Escola Capão da Onça, Ponta Grossa/PR, 2019

Antibiótico	<i>In natura</i>	Fermentado
Ciprofloxacino	100 (21)*	100 (9)
Cloranfenicol	100 (7)	100 (3)
Ceftiofur	100 (8)	100 (3)
Enrofloxacino	100 (12)	100 (5)
Norfloxacino	100 (8)	100 (3)
Gentamicina	91(21)	100 (9)
Sulfazotrin	90 (20)	89(9)
Doxiciclina	88 (8)	100(3)
Meropenen	86 (21)	100 (10)
Cefoxitina	57 (21)	89(9)
Amox/Clav**	50 (12)	80(5)
Ampicilina	52 (21)	70(10)
Penicilina	0 (7)	0(2)

*(n): número de colônias analisadas.

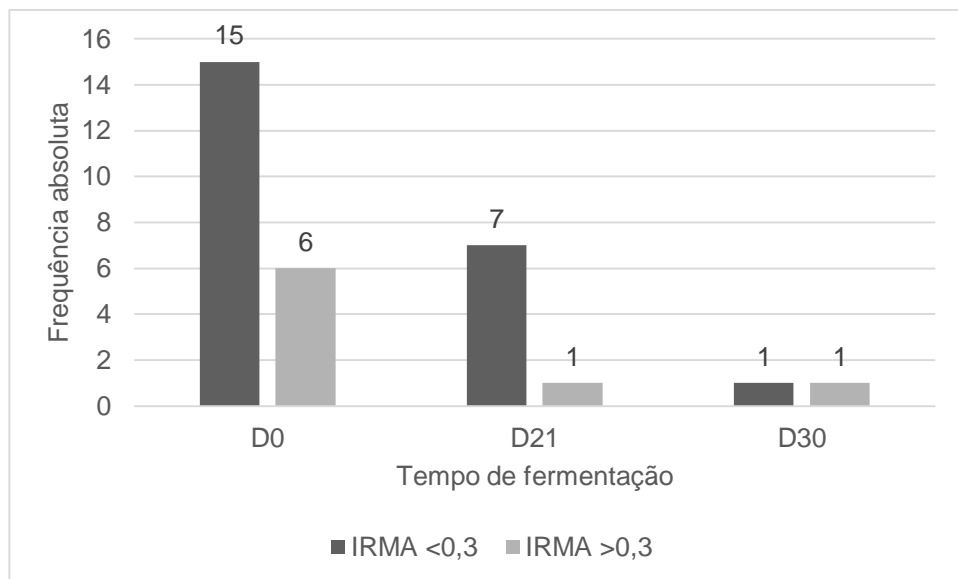
**Amox/Clav = associação de amoxicilina e ácido clavulânico.

Fonte: A autora

As enterobactérias possuem resistência intrínseca para penicilina que foi utilizada neste experimento como controle. Alguns isolados apresentaram resistência aos inibidores de β -lactâmicos (amoxicilina/ácido clavulânico e ampicilina). A sensibilidade variável das enterobactérias frente à cefoxitina, tetraciclina (doxiciclina), aminoglicosídeos (gentamicina e amicacina), carbapenêmicos (meropenem) e sulfametoxazol/trimetoprin (sulfazotrin) foram confirmadas.

Bactérias multirresistentes foram encontradas nos tratamentos D0, D21 e D30 (Figura 1) e 29% dos isolados do leite de transição *in natura* apresentaram IRMA $\geq 0,3$. Isolados com IRMA $\geq 0,3$ são considerados fonte potencial de transmissão de genes de resistência (KRUMPERMAN, 1983).

Figura 1 - Frequências absolutas de enterobactérias conforme índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA) em leite de transição bovino *in natura* (D0) e fermentado por 21 (D21) e 30 dias (D30), Fazenda Escola Capão da Onça, Ponta Grossa/PR, 2019



Fonte: A autora

As bactérias multirresistentes encontradas no leite de transição *in natura* foram a *Escherichia coli* e *Citrobacter diversus*.

Não foram encontrados estudos sobre a sensibilidade das enterobactérias frente a antimicrobianos em silagem de leite de transição bovino, no entanto Peter et al. (2016) identificaram a presença de *Escherichia coli* no leite cru coletado de tanques resfriadores, de pequenos produtores rurais do município de Canguçu/RS. Os pesquisadores observaram que 80% dos isolados de *Escherichia coli* mostraram-se sensíveis aos princípios ativos sulfazotrim e imipenem. Mais de 60% dos isolados apresentaram sensibilidade a sete antimicrobianos (sulfazotrim, nitrofurantoína, ciprofloxacina, polimixina B, norfloxacina, ampicilina, imipenem) dos doze testados e o fármaco com menor ação foi a cefotaxima, apenas 32,5% dos isolados foram sensíveis. No presente estudo, 90% das enterobactérias analisadas no leite de transição *in natura* foram sensíveis ao sulfazotrim e na silagem de leite de transição, 89% foram sensíveis ao antibiótico em questão. Os antibióticos cefoxitina e ceftiofur são da mesma classe de antibióticos do cefotaxima; no entanto, as taxas de sensibilidade registradas foram superiores, sendo de, respectivamente, 57% e 100% (leite de transição *in natura*) e 89% e 100% (silagem de leite de transição).

4. CONCLUSÕES

A fermentação do leite de transição resulta em diminuição do pH, não interfere na temperatura e na densidade láctea e ocasiona a diminuição significativa dos sólidos totais até 9,17%, com 21 dias de fermentação. As BAL mantêm-se viáveis até os 90 dias, há redução da população de patógenos durante o processo fermentativo, com a eliminação de bactérias patogênicas multirresistentes a partir dos 30 dias. As enterobactérias foram totalmente sensíveis ao ciprofloxacino, cloranfenicol, ceftiofur, enrofloxacino e norfloxacino, estes resultados podem auxiliar na escolha do antibiótico a ser utilizado na propriedade rural, de modo a evitar a ocorrência de mais bactérias multirresistentes.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, E. A.; ANSEMI, R.; MENDES, C. Q. Silagem de colostro: alternativa sustentável para a bovinocultura leiteira. **SR Rural – Caderno Rural**, n. 49, p. 1, 2010.
- AZEVEDO, R. A. de; COELHO, S. G. Efeito dos programas de nutrição, do nascimento até a puberdade sobre o desenvolvimento mamário de novilhas leiteiras. **Nutri Time Revista Eletrônica**, v. 13, n. 5, p. 4794-4799, 2016.
- AZEVEDO, R. A. de et al. Silagem de colostro: riscos microbiológicos e caracterização do pH em função do dia de coleta. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 36, n. 3, p. 271-276, 2014a.
- AZEVEDO, R. A. de et al. Desenvolvimento de bezerros leiteiros alimentados com silagem de leite de transição. I – Trato digestivo. Arq. **Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 66, n. 2, p. 489-496, 2014b.
- AZEVEDO, R. A. de; DUARTE, E. R. Aspectos microbiológicos do colostro bovino em diferentes técnicas de conservação e armazenamento: uma revisão. **Revista Eletrônica de Pesquisa Animal**, v. 1, n. 2, p.84-98, 2013.
- BALLARDIN, A. C. et al. Análise de microrganismos presentes em amostras de leite fermentado durante a vida de prateleira do produto. In: __II Congresso de Pesquisa e Extensão da Faculdade da Serra Gaúcha, 2., 2014, Caxias do Sul. **Anais...** Caxias do Sul:FSG, 2014. p. 388-399.
- BARTKIENE, E. et al. The effects of ultrasonication, fermentation with *Lactobacillus* sp., and dehydration on the chemical composition and microbial contamination of bovine colostrum. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 8, p. 6787-6798, 2018.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Determinação da densidade em leite fluido com uso do termolactodensímetro**. 2013. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/legislacoes-e-metodos/arquivos-metodos-da-area-poa-iqa/met-poa-09-02-densidade-em-leite-fluido.pdf> Acesso em: 6 jun. 2019.
- CHASE, C. C. L.; HURLEY, D. J.; REBER, A. J.; Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v. 24, n. 1, p. 87-104, 2008.
- FERREIRA, L. F. **Silagem de colostro**: caracterização do perfil de fermentação anaeróbica e desempenho de bezerros leiteiros. 2011, 161 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2011.
- FERREIRA, L. F. et al. Colostrum silage: fermentative, microbiological and nutritional dynamics of colostrum fermented under anaerobic conditions at different temperatures. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 4, p. 395-401, 2013.
- FRANDSON, R. D.; WILKE, W. L.; FAILS, A. D. Prenhez e Parto. In: __**Anatomia e fisiologia do animais de fazenda**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011a. p. 351-358.

FRANDSON, R. D.; WILKE, W. L.; FAILS, A. D. Anatomia e Fisiologia das Glândulas Mamárias. In: **__Anatomia e fisiologia do animais de fazenda**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011b. p. 359-368.

GODDEN, S. Colostrum management for dairy calves. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v. 24, p. 19-39, 2008.

HUBERT, M. et al. Substituição do leite *in natura* pela silagem de colostro na criação de bezerros leiteiros. In: **__MOSTRA NACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTIFICA E TECNOLÓGICA INTERDISCIPLINAR**, 7., 2014, Araquari. **Resumos...** Concórdia: Instituto Federal Catarinense, 2014.

HUERTAS, R. A. P. Bacterias acido laticas: papel funcional en los alimentos. **Facultad de Ciencias Agropecuarias**, v. 8, n. 1, p. 93-105, 2010.

KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of Escherichia coli to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied Environmental Microbiology**, v.46, n.1, p.165-170, 1983.

LAFFRANCHI, A. et al. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas ao longo dos primeiros quatro meses de lactação. **Ciência Rural**, v. 31, n. 6, p. 1027-1032, 2001.

LÓPEZ, J. A. G. Densidad relativa = specific gravity, para instrumentistas y lingüistas. **Tempo Real SA**, Barcelona, mar. 2007. Disponível em: <http://www.tiemporeal.es>
Acesso em: 2 maio 2019.

McGUIRK, S. M; COLLINS, M. Managing the production, storage, and delivery of colostrum. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v. 20, p. 593-603, 2004.

MOORE, D. A. et al. Quality assessments of waste milk at a calf ranch. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 3503-3509, 2009.

MORIN, D. E. et al. Factors associated with colostrum specific gravity in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 937-943, 2001.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7. ed. Washinton: D.C, 2001. 401 p.

NUÑEZ, M.; NUÑEZ, J. A. Proteasas de psicrotrofos gram negativos: efectos sobre la leche y los bacilluictos lácteos. **Revista Espanhola de Lecheria**, Madrid, n. 130, p.251-260, 1983.

OLIVEIRA, M. R. M. de.; MEDEIROS, M. Agentes causadores de mastite e resistência bacteriana. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, Brasília, v. 2, n. 1, p.45-60, dez. 2015.

PETER, C. M. et al. Caracterização e sensibilidade de cepas de *Escherichia coli* isoladas do leite proveniente de tanques resfriadores de pequenas propriedades do município da Canguçu – RS. **Science and Animal Health**, v. 4, n. 3, p. 310-322, 2016.

RIBAS, N. P. et al. Porcentagem de sólidos totais em amostras de leite de tanque no estado do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, v. 20, p. 57-65, 2015.

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

SAALFELD, M. H. Uso da Silagem de colostro como substituto do leite na alimentação de terneiras leiteiras. **A Hora Veterinária**, v. 162, p. 59-62. 2008.

SAALFELD, M. H. et al. Anaerobically fermented colostrum: an alternative for feeding calves. **Ciência Rural**, v. 43, n. 9, p.1636-1641, set. 2013.

SANTOS, G. T. dos. et al. Importância do manejo e considerações econômicas na criação de bezerras e novilhas. In: __SUL-LEITE: SIMPÓSIO SOBRE SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA DE LEITE NA REGIÃO SUL DO BRASIL, 2., 2002, Maringá. **Anais...**Toledo: NUPEL, 2002. p. 239-267.

SANTOS, H. L. et al. Nutritional and microbiological quality of bovine colostrum samples in Brazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 46, n. 1, p.72-79, 2017.

SILPER, B. F. et al. Avaliação da qualidade do colostro e transferência de imunidade passiva em animais mestiços Holandês Zebu. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 64, p. 281-285, dez. 2012.

SILVA, M. P. C. J. et al. **Manejo administrativo na Bovinocultura leiteira**. 2. ed. Viçosa, MG: Suprema gráfica e Editora, 2014. p. 167-184.

SILVA, H. A. da. et al. Desempenho de novilhas leiteiras em pastagens anuais de inverno sob sistema de integração lavoura-pecuária. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 46, n. 10, p. 1372-1378, out. 2011.

TAVARES, F. S. **Análise nutricional do leite de transição bovino “in natura” e fermentado**. 2018, 42 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2018.

THALER NETO, A.; RODRIGUES, R. S.; CÓRDOVA, H. A. Desempenho produtivo de vacas mestiças Holandês x Jersey em comparação ao Holandês. **Rev. Ciênc. Agrovet.**, v.12, p.7-12, 2013.

VLIEGHER, S. et al. Invited review: Mastitis in dairy heifers: Nature of the disease, potential impact, prevention, and control. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 3, p. 1025-1040, mar. 2012.

WOUTERS, J. T. M. et al. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 12, p.91-109, 2002.

YU, Y.; STONE, J. B.; WILSON, M. R. Fermented bovine colostrum for holstein replacement calf rearing. **Journal of Dairy Science**, v. 59, n. 5, p. 936-943, 1975.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. Leite e derivados. In:___ ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. p. 823-881.