

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

ANA PRISCILA DORIA

ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DA SILAGEM DE COLOSTRO
BOVINO

PONTA GROSSA
2016

ANA PRISCILA DORIA

ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DA SILAGEM DE COLOSTRO
BOVINO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de graduação de Bacharel em Zootecnia e para aprovação na disciplina de Orientação de Trabalho de Conclusão de Curso na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Zootecnia.

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

PONTA GROSSA
2016

*À Deus, por estar ao meu lado e sussurrar incontáveis vezes:
calma filha, acalenta teu coração...CORAGEM!*

*Ao meu avô João Maria Doria e avó Suzana Doria,
por serem minha maior inspiração.*

*Aos meus pais, Sandro José e Maura de Fátima
e a toda minha família por todo amor,
incentivo, torcida, dedicação,
confiança, exemplo...*

A vocês dedico todo meu esforço e eterno amor!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a Dr^a Luciana da Silva Leal, pela profissional dedicada e competente que és. Pelo companheirismo, atenção e respeito e por sempre compreender e ajudar em minhas dificuldades e assim colaborar de maneira inigualável para minha formação pessoal e profissional.

À Valquiria Nanuncio Chochel (Val) pelo modo sutil, paciente e atencioso com que me ensinou. Pela pessoa e profissional inspiradora. E ao longo do tempo pela preciosa amizade e companhia, meu profundo carinho e eterna gratidão!

Aos meus amigos Bruno Luiz e Henrique Alberto (pela fundamental, incomparável e animadora ajuda no desenvolvimento deste trabalho) e amigas Aline Cristina, Andressa e Josielen (pelo apoio e atenção em todos os momentos). Agradeço a cada um pelo carinho, compreensão, respeito e confiança ao longo destes quatro anos e por tornarem cada dia mais intenso e divertido. Obrigada guerreiros!

As professoras Ana Angelita Sampaio Baptista, Raquel Abdallah da Rocha Oliveira e Adriana de Souza Martins e aos profissionais envolvidos senhor José Luis Moletta, Bianca Letícia Barbosa e Thaisa Cristina Alves da Cruz, por colaborarem de forma fundamental para a execução desta pesquisa.

Aos funcionários da Fazenda Escola Capão da Onça (FESCON) pela disposição e dedicação para ajudar no possível e as meninas do Grupo de Estudos em Tecnologia da Reprodução Animal (GETRA) por darem continuidade a este projeto.

Aos demais colegas e profissionais envolvidos e a Fundação Araucária pelo recurso fornecido.

Aos meus amados pais Maura e Sandro, que muitas vezes abdicaram de seus sonhos em favor dos meus, por acreditarem em mim, minha eterna gratidão!

Ao meu avô João Maria (“vô” Rico) por ser exemplo de humildade, honestidade e força e minha avó Suzana por ser a pessoa mais doce, paciente e amável. Sem vocês eu não conseguiria nada, eu não seria nada. Meu eterno amor e gratidão!

À Leonardo Vinicius, meu único e preferido irmão, pelo carinho e parceria (e isto inclui algumas horas de estudo), muito obrigada!

À Maria Cristina e Aurivan (Zan), por me acolherem inúmeras vezes de braços abertos, pelo apoio e por serem como minha segunda família. À Adenilson, Taciane e Jorge pelo fundamental incentivo desde o início desta batalha. E a João Pedro, Eloisa e Ercilia por se preocuparem e buscarem me ajudar no que estivesse ao alcance, com carinho!

Ao meu amado noivo Diego, por estar ao meu lado em todos os momentos, por sua compreensão e carinho incondicional e também a sua preciosa família pela preocupação e atenção, obrigada!

E fundamentalmente à Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por serem minha fonte de ânimo, jamais me abandonarem e por me concederem tantas oportunidades.

“Gratidão é reconhecer o esforço alheio. É a memória do coração.”

“ Tudo que hoje considera ser fácil, um dia você achou algo muito difícil de ser realizado.

O que está achando difícil hoje, em breve, você vai executar com grande domínio.

Tenha paciência e humildade para aprender.

Por falta delas, no meio desse caminho, muitos fracassam. ”

(Flávio Augusto)

RESUMO

Pesquisas vêm buscando alternativas para reduzir os custos de criação de bezerras leiteiras já que, nos primeiros meses de vida, são dependentes de dieta a base de leite. A silagem de colostro pode ser uma opção econômica, pois conserva o colostro por fermentação anaeróbica. Foram analisados parâmetros físico-químicos (pH, densidade e sólidos totais) e microbiológicos do colostro *in natura* e do colostro fermentado de dez vacas da raça Holandesa, com o objetivo de verificar o potencial de uso da silagem de colostro em substituição ao leite. O colostro foi armazenado em garrafas plásticas de 500 mL, em condição anaeróbica, por 21, 30, 60, 90, 120, 180 e 360 dias. Os valores de densidade foram determinados usando termolactodensímetro e o pH por fita indicadora. A porcentagem de sólidos totais (%ST) foi obtida por um refratômetro Brix. O desenvolvimento microbiano foi determinado a partir do uso de quatro meios de cultura distintos: ágar sangue e MRS onde foi possível observar o desenvolvimento de micro-organismos do gênero *Staphylococcus spp.* e *Lactobacillus spp.*, respectivamente, ágar Sabouraud (desenvolvimento de fungos filamentosos e leveduras) e ágar MacConkey onde se desenvolveram enterobactérias. Para avaliar o efeito do tempo de fermentação, foi utilizado o programa estatístico Minitab[®], sendo que as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Houve decréscimo dos valores de pH nas amostras de silagem de colostro, devido a transformação da lactose em ácido láctico. A fermentação também resultou na diminuição da densidade e da %ST. Apenas no ágar MacConkey (onde há crescimento de bactérias patogênicas, principalmente enterobactérias) houve diferença entre o crescimento microbiano no colostro *in natura* e no fermentado. No presente estudo verificou-se que a silagem de colostro com relação aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos, preparada e armazenada de forma criteriosa, pode ser empregada no aleitamento de bezerras leiteiras.

Palavras-chave: Acidez. Anaerobiose. Bezerras. Fermentação.

ABSTRACT

Studies search for alternatives to reduce the costs of dairy calves breeding, since in the first months of life these animals are almost exclusively dependent on a liquid diet whose base is milk. Colostrum silage may be an economical option because conserves the colostrum by anaerobic fermentation. Physical and chemical (pH, density and total solids) and microbiological parameters of colostrum *in natura* and fermented colostrum of ten Holstein cows were analyzed. The colostrum was stored in 500 mL plastic bottles in anaerobic condition during 21, 30, 60, 90, 120, 180 and 360 days. The density values were determined using a thermolactodensimeter and pH through an indicator strip. The percentage of total solids (%TS) was obtained by a Brix refractometer. The microbial growth was determined from the use of four different agars: blood and MRS where it was possible to observe the development of *Staphylococcus spp.* and *Lactobacillus spp.* microorganisms, respectively, Sabouraud (development of filamentous fungi and yeasts) and MacConkey where developed enterobacteria. To evaluate the effect of fermentation time on the variables studied, the statistical software Minitab[®] was used and the averages were compared by Tukey test at 5% of significance level. There was a decrease in pH rates of colostrum silage, because the conversion of lactose into lactic acid. Fermentation also resulted in reduced density and %TS. Only in MacConkey agar (where there is growth of pathogenic bacteria, particularly enterobacteria) was observed difference of microbial growth between colostrum *in natura* and fermented colostrum. In this study, it was found that colostrum silage with respect to physico-chemical and microbiological parameters, prepared and stored carefully, can be applied to feed dairy calves.

Keywords: Acidity. Anaerobic. Calves. Fermentation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Equipamentos utilizados para realização das análises físico-químicas.....	16
Figura 2 –	Erlenmeyers preparados com vedação adaptada com o sangue colhido desfibrinado.....	18
Figura 3 –	Placas de Petri prontas para uso após controle de contaminação dos meios de cultura Sabouraud, MRS, MacConkey e Sangue.....	19
Figura 4 –	Desenho esquemático referente ao processo de inoculação de amostra para avaliação do crescimento microbiano.....	20
Figura 5 –	Variação do pH da silagem de colostro bovino em função do tempo de fermentação.....	23
Figura 6 –	Padrão de crescimento microbiológico observado no colostro <i>in natura</i> e colostro fermentado para os diferentes meios de cultura utilizados.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Composição do leite e colostro.....	14
Tabela 2 –	Valores médios obtidos para as variáveis densidade e sólidos totais do colostro bovino <i>in natura</i> e da silagem de colostro com diferentes dias de fermentação.....	24
Tabela 3 –	Média de UFC/mL obtidas para os meios de cultura comerciais: ágar sangue, sabouraud, MacConkey e MRS do colostro bovino <i>in natura</i> e do colostro fermentado por diferentes períodos.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
BDA	Batata, Dextrose, Agar
Bx	Brix
MRS	Man, Rogosa and Sharpe
PET	Polietileno Tereftalato
ST	Sólidos Totais
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	12
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.1	Análises Físico-Químicas.....	15
2.2	Análises Microbiológicas.....	17
2.2.1	Preparação dos Meios de Cultura.....	17
2.2.2	Procedimento de Inoculação, Incubação e Contagem de Colônias.....	19
2.2.3	Caracterização das Colônias Segundo o Meio de Cultura.....	20
2.3	Análise Estatística.....	22
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.	CONCLUSÕES.....	28
5.	REFERÊNCIAS.....	28

1. INTRODUÇÃO

Dentro de uma propriedade leiteira, normalmente a composição do rebanho é bem variada já que existem diversas categorias animais presentes. Estas vão desde vacas lactantes e secas até animais mais jovens como novilhas e bezerras.

Sabe-se que, dentre todas as categorias, a fase de cria dos animais é um desafio, pois exige atenção que nem sempre lhe é dada e este fato normalmente ocorre devido às bezerras representarem custos sem retorno em curto prazo. Segundo Silper et al. (2012) a criação de bezerras e novilhas representa parte importante dos custos de sistema de produção de leite, sendo a saúde desses animais fundamental para a criação eficiente.

Devido esses animais terem uma dieta quase que exclusivamente líquida, sendo o leite o principal alimento nas primeiras semanas de vida, a alimentação pode ser considerada o item mais oneroso. A dependência de uma dieta líquida se deve ao fato do processo de digestão ser ineficiente no início da vida dos animais, além disso, sabe-se também que logo após o nascimento, o abomaso ocupa em torno de 50% do volume dos compartimentos gástricos; esta mesma porcentagem é alcançada pelo rúmen-retículo em torno da idade de quatro semanas, já que é durante os dois primeiros meses de vida da bezerra que o rúmen mais se desenvolve (SANTOS et al., 2002), ou seja, nas primeiras semanas de vida a bezerra ainda não é um “ruminante funcional”, sendo mais eficiente na digestão dos nutrientes provenientes do leite materno.

De acordo com Oliveira et al. (2010) o leite de vaca possui em média 3,5% de proteínas, 3,8% de gordura, 5,0% de lactose, 0,7% de minerais (cinzas) e 87% de água sendo que esses valores médios podem apresentar desvios, uma vez que a variação em sua composição é muito grande e em todos os componentes a fração que mais varia é a gordura. Do ponto de vista biológico, o leite pode ser considerado um dos alimentos mais completos, por apresentar, entre outras características, alto teor de proteínas e sais minerais (LUIZ et al., 2010).

Hubert et al. (2014) afirmaram que, na maioria das explorações leiteiras do país, os bezerros recebem o colostro e depois passam a ser alimentados com leite comercializável. Isso representa um gasto em torno de 200 litros de leite para criar um bezerro até a desmama, leite este que poderia ser entregue a indústria.

Desta forma, a busca de alternativas para reduzir os custos com a dieta sem prejudicar o desenvolvimento das bezerras torna-se fundamental. Ferreira (2011) destaca que existem vários alimentos disponíveis que podem ser usados para a nutrição das bezerras nesta fase inicial, dentre eles, além do leite integral, há também os sucedâneos comerciais e ainda o

leite não comercializável (que inclui o colostro, leite de transição e leite mastítico ou com resíduos de antibióticos).

Os sucedâneos são produtos comerciais que tem como destino substituir o leite integral da dieta de bezerras. A substituição do leite cru pode apresentar bons resultados quando empregada em unidades de produção que utilizam mão de obra capacitada para atender exclusivamente ao setor de cria e recria de bezerras (ZANOTTI, 2013), já que um ponto crítico do uso de sucedâneo é a diluição do produto e seu fornecimento em temperatura adequada. Além disso, Vasconcelos (2012) afirmou que mesmo que o sucedâneo possa ser usado como fonte alimentícia a partir de quatro a seis dias de idade, os bezerros que o consomem ganham menos peso que bezerros alimentados com leite integral, devido à menor concentração de gordura e energia do sucedâneo (composição muito variável, sendo intimamente ligada a qualidade do produto, uma vez que produtos de melhor qualidade possuem um balanceamento melhor de nutrientes); e também outro problema é que entre as fontes de proteína utilizadas na formulação dos sucedâneos, está a soja, a qual não é indicada para bezerras até a oitava semana de vida, uma vez que esses animais não possuem as enzimas necessárias para digerir os nutrientes contidos nesse alimento (ZANOTTI, 2013). Vale ressaltar também que, para o uso do sucedâneo ser viável, além de atender as recomendações nutritivas, ainda há a questão do preço deste produto, que obviamente deve ser menor que do leite comercial para ser uma boa alternativa de economia dentro da propriedade.

Como citado anteriormente, atender a dieta das bezerras nem sempre é tão fácil, pois o leite é a fonte mais significativa de renda de uma propriedade leiteira e o uso de sucedâneos pode se tornar inviável dependendo do nível tecnológico e da rentabilidade da propriedade. Portanto é neste contexto que o uso do leite não comercializável pode ser uma boa opção, já que normalmente a quantidade de colostro e do leite de transição produzidos pelas vacas recém-paridas são maiores do que o consumo das bezerras. Assim, na maioria das vezes, o produtor acaba descartando esta parte da produção.

O colostro é uma secreção produzida pelas vacas, até cinco dias após o parto, que é rica em proteínas, dentre estas as imunoglobulinas, minerais, vitaminas, gordura, sólidos totais e cinzas (ANDRADE; ANSEMI; MENDES, 2010), portanto é um alimento indispensável, em especial aos animais recém-nascidos. Com a evolução da lactação, essa secreção é gradativamente substituída pela secreção de leite, em um período de transição, produzindo assim o chamado leite de transição que, assim como o colostro, não tem valor comercial (AZEVEDO et al., 2013).

Na Tabela 1, mostra-se a composição média do colostro, do leite de transição e do leite integral de vaca, segundo Wattiaux (1997).

Tabela 1 – Composição do leite e colostro

Componentes	Número de ordenhas					
	1	2	3	4	5	11
	Colostro	Leite de transição			Leite integral	
Sólidos totais, %	23,90	17,90	14,10	13,90	13,60	12,50
Gordura, %	6,70	5,40	3,90	3,70	3,50	3,20
Proteína*, %	14,00	8,40	5,10	4,20	4,10	3,20
Anticorpos, %	6,00	4,20	2,40	0,20	0,10	0,09
Lactose, %	2,70	3,90	4,40	4,60	4,70	4,90
Minerais, %	1,11	0,95	0,870	0,82	0,81	0,74
Vitamina A, ug/dL	295,00	-	113,00	-	74,00	34,00

*Inclui percentagem de anticorpos indicados na próxima linha.

Fonte: (WATTIAUX,1997)

Diversas pesquisas vêm buscando formas de aproveitar o colostro e o leite de transição excedentes para a alimentação das bezerras até o momento do desmame. Saalfeld (2008) desenvolveu uma forma de conservar o colostro através de fermentação anaeróbica, técnica conhecida como silagem de colostro. Em seus trabalhos concluiu que a silagem de colostro não necessita de refrigeração, congelamento ou aditivos, o que contribui para o seu baixo custo de elaboração.

Ademais, sabe-se que o processo de fermentação inativa bactérias patogênicas. Wray e Callow (1974 apud AZEVEDO; DUARTE, 2014) afirmaram que o uso de colostro fermentado como substituto do leite não favorece a ocorrência de salmonelose ou colibacilose nos bezerros, pois, normalmente, produtos acondicionados e fermentados de forma adequada não permitem a sobrevivência de agentes da família Enterobacteriaceae em concentrações suficientes para promover alterações intestinais nos bezerros.

Saalfeld (2008) concluiu ainda que os animais alimentados com silagem de colostro obtiveram ganho de peso superior ao observado em animais alimentados com leite, constituindo-se assim, num alimento viável para a utilização como sucedâneo do leite.

Deste modo, o presente estudo teve como objetivo avaliar as características físico-químicas e microbiológicas da silagem de colostro bovino e comparar os resultados do

colostro *in natura* (dia 0) e após 21, 30, 60, 90, 120, 180 e 360 dias de fermentação, buscando verificar a manutenção da qualidade do colostro e sua viabilidade como fonte alimentícia para bezerras como um bom substituto do leite comercial.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Fazenda Escola “Capão da Onça”, 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 1545 mm e temperatura média anual de 18,7 °C) no período de abril de 2014 a novembro de 2015. Foram utilizados os colostros de 10 vacas da raça Holandesa obtidos entre o 3º e o 5º dia pós-parto, filtrados em peneira e armazenados em garrafas plásticas PET de 500 mL, previamente higienizadas com água quente e detergente neutro 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 e número de identificação do animal, dia da colheita após o parto e data da colheita) e armazenadas em local sem a incidência da luz solar, à temperatura ambiente.

A amostra de colostro *in natura* foi mantida sob refrigeração até o momento da análise. O colostro foi analisado antes do processo de fermentação (dia zero – D0) e nos dias 21 (D21), 30 (D30), 60 (D60), 90 (D90), 120 (D120), 180 (D180) e 360 (D360) após o envase, totalizando 10 repetições em oito momentos diferentes.

As análises físico-químicas e microbiológicas foram procedidas no Laboratório de Microbiologia, Biologia Celular e Parasitologia Animal do Departamento de Zootecnia em Castro/PR. O processamento e a metodologia empregados estão descritos a seguir.

2.1 Análises físico-químicas

Os parâmetros físico-químicos quantificados foram: pH, densidade e % de sólidos totais (%ST).

Para a realização das análises físico-químicas, 500 mL de colostro *in natura* ou da silagem de colostro foram colocados em béquer de 1000 mL e homogeneizados. Depois 250 mL da amostra foram colocados em proveta para a mensuração da temperatura e da densidade (°Quevenne) por meio de termolactodensímetro (Incoterm®). A densidade mensurada em °Quevenne foi transformada para a unidade g/mL através da fórmula (1) descrita por López (2007).

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

Em seguida, 100 mL da amostra foram depositados em béquer para a total imersão da fita indicadora de pH (J. Prolab®).

Já a %Bx (%brix) foi aferida com o auxílio de um refratômetro manual (Biobrix Equipar® - escala 0 a 32%) onde duas gotas da amostra foram depositadas no equipamento com auxílio de uma pipeta de Pasteur descartável e a partir da equação (2) proposta por Moore et al. (2009) a %ST foi determinada.

Vale ressaltar que todos os equipamentos (Figura 1) após a leitura de cada amostra, foram higienizados com água destilada e detergente neutro (no caso do termolactodensímetro) para a retirada de qualquer resíduo e assim não afetar os resultados das análises subsequentes.

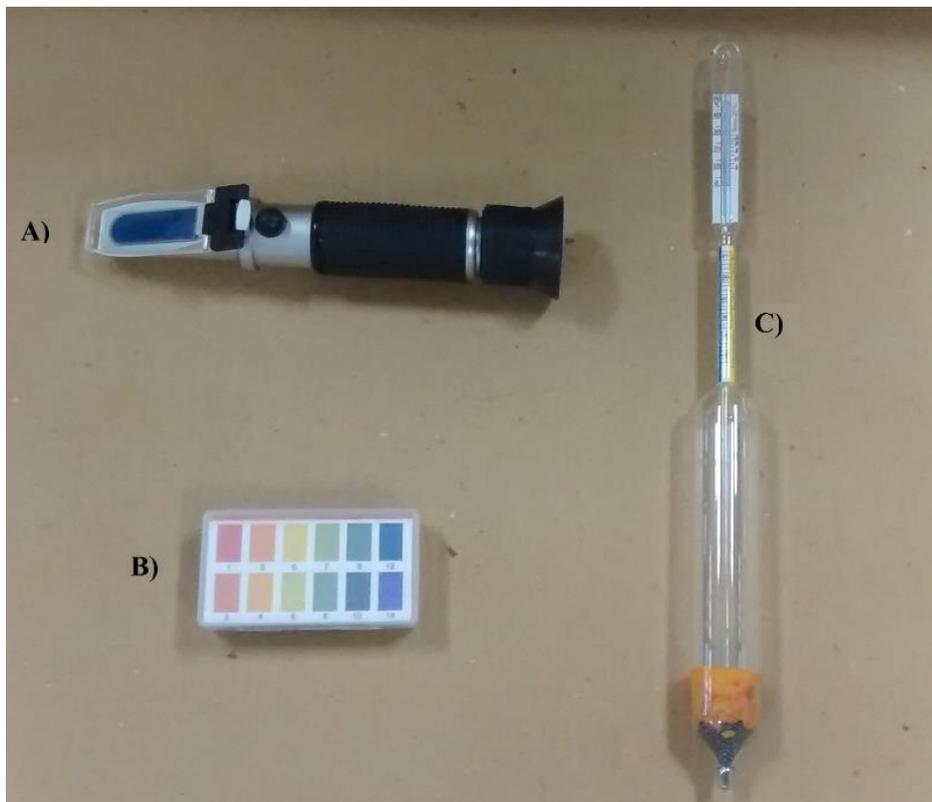
$$(2) \%ST = \%Bx + 2$$

Onde,

%ST = porcentagem de sólidos totais

%Bx = porcentagem de brix

Figura 1 – Equipamentos utilizados para realização das análises físico-químicas. A) refratômetro manual; B) fitas indicadoras de pH e C) termolactodensímetro



2.2 Análises microbiológicas

Para a avaliação do perfil de crescimento microbiano foram utilizados quatro meios de cultura comerciais distintos: ágar MRS (Man, Rogosa e Sharpe), ágar MacConkey, ágar Sabouraud e ágar sangue.

A interpretação e determinação das colônias “padrão” que se desenvolveram nos meios de cultura: sangue, Sabouraud e MacConkey foram realizadas com base no descrito por Brasil (2013) e para o meio MRS segundo Man; Rogosa e Sharpe (1960) apud Costa et al. (2011).

2.2.1 Preparação dos meios de cultura

O início das avaliações microbiológicas se dava com a preparação dos meios de cultura; estes foram pesados em balança de precisão e depositados em balões volumétricos ou erlenmeyers para serem hidratados conforme recomendações dos fabricantes (ágar MacConkey: 50 g de ágar/ 1000 mL de água destilada; ágar MRS: 67,15 g de ágar/ 1000 mL de água destilada e ágar Sabouraud: 65 g de ágar/ 1000 mL de água destilada). Posteriormente, o recipiente foi vedado e o meio fundido sobre tela de amianto em tripé, no bico de Bunsen. Após o meio estar totalmente diluído, este foi levado para esterilização em autoclave, por 15 minutos a 121°C. Após a esterilização, em câmara de fluxo, aproximadamente 20 mL de meio de cultura eram transferidos para placas de Petri previamente esterilizadas.

Para averiguar a qualidade da esterilização de todas as placas de Petri com o meio de cultura confeccionado, estas foram incubadas em estufa tipo (BOD) a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. As placas que não apresentavam alteração de cor e nem crescimento de qualquer colônia (Figura 3) foram revestidas com filme plástico transparente (para evitar ressecamento do meio) e armazenadas na geladeira para serem usadas posteriormente.

A preparação do meio de cultura ágar sangue diferiu um pouco dos demais meios, já que foi necessária a adição de sangue de ovinos ou bovinos. O processo iniciou com a preparação de erlenmeyers de 100 mL estéreis vedados com uma adaptação para facilitar o processo de deposição de sangue no mesmo de maneira mais rápida e estéril possível (Figura 2). Em todos os erlenmeyers foram colocadas esferas de vidro pequenas, de modo a cobrir o fundo do frasco, para que sob agitação manual em movimento circular, constante e uniforme (por mais ou menos 10 minutos) o sangue colhido fosse desfibrinado.

Figura 2 – Erlenmeyers preparados com vedação adaptada já com o sangue colhido desfibrinado



A desfibrinação foi comprovada quando visivelmente observou-se grandes grumos formados pelas fibrinas e o líquido restante foi o sangue desfibrinado (constituído por soro e glóbulos). Na câmara de fluxo, o sangue desfibrinado era transferido para tubos Falcon de 15 mL para facilitar a preparação do meio.

Na sequência de preparação, o ágar base (Blood Agar Base – Infusion Agar) era pesado em balança de precisão e depositado em balões volumétricos ou erlenmeyers para ser hidratado (40 g de ágar/ 1000 mL de água destilada). Então, o recipiente era vedado e o meio fundido sobre tela de amianto em tripé, no bico de Bunsen e após o meio estar totalmente diluído este era levado para esterilização em autoclave (15 minutos a 121°C). Após a esterilização, uma particularidade da preparação do meio ágar sangue, era que este era resfriado sobre água corrente até temperatura de 45°C aproximadamente e imediatamente após isto, já na câmara de fluxo, eram misturados 5 mL do sangue desfibrinado para cada 100 mL do meio resfriado sob agitação constante e de modo delicado, a fim de se evitar a formação de bolhas.

Imediatamente após a adição do sangue e da sua completa mistura no meio ágar base, este era transferido para placas de Petri e também se empregava o controle de qualidade em estufa tipo (BOD) a $32 \pm 1^\circ\text{C}$, porém neste caso por um período de 48 horas, pois desde a colheita do sangue até a preparação do meio havia inúmeros pontos de contaminação, além de se tratar de um meio extremamente nutritivo. As placas que conservassem as características

originais do meio e sem crescimento de qualquer colônia (Figura 3) eram revestidas com filme plástico transparente e armazenadas na geladeira para serem usadas posteriormente.

Figura 3 – Placas de Petri prontas para uso após controle de contaminação dos meios de cultura (da esquerda para direita) Sabouraud, MRS, MacConkey e sangue



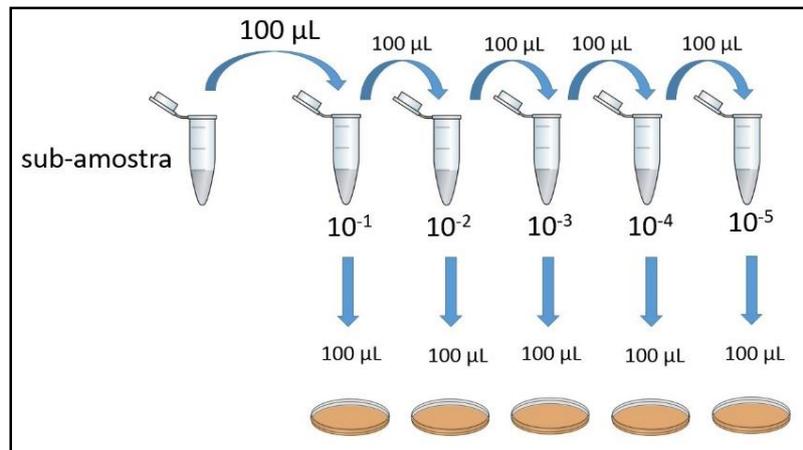
2.2.2 Procedimento de inoculação, incubação e contagem de colônias

O processo de análise do crescimento microbiano teve início na câmara de fluxo com a realização da deposição da amostra do colostro *in natura* ou da silagem de colostro em béquer para homogeneização, antes das análises físico-químicas serem realizadas de modo a evitar contaminações. Em seguida, colhia-se três alíquotas de 1000 μL que eram misturadas a 150 μL de glicerol e depositadas em três *ependorfs* previamente identificados para assim serem congeladas.

Posteriormente eram feitas as diluições seriadas onde em um *ependorf* 100 μL da alíquota era adicionada a 900 μL de água salina estéril obtendo-se assim a diluição 10^{-1} . Em seguida, 100 μL da solução diluída a 10^{-1} foi adicionada a 900 μL de água salina estéril resultando assim na diluição 10^{-2} e assim sucessivamente até a diluição 10^{-5} , ou seja, para cada amostra eram necessárias a utilização de cinco placas de cada meio de cultura.

Logo após a diluição seriada era feita a inoculação da amostra nas placas de Petri, em câmara de fluxo. Neste processo, 100 μL de cada diluição eram inoculados em cada placa, sempre com troca de ponteiros (Figura 4). Com a alça de Drigalski, espalhava-se a amostra uniformemente sobre os ágar.

Figura 4 – Desenho esquemático referente ao processo de inoculação de amostra para avaliação de crescimento microbiano



Posteriormente ao processo de inoculação ocorria a incubação em estufa tipo (BOD) a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 a 48 horas. Havia uma particularidade para o meio MRS, sendo que as placas inoculadas eram colocadas juntamente com uma vela acesa em recipiente vedado (para criar um ambiente de anaerobiose) e somente depois da vela apagar naturalmente devido o consumo total do oxigênio do recipiente este era levado para a estufa.

No fim do processo, eram feitas as contagens das colônias das placas para cada meio de cultura, onde se quantificava o número de colônias da última placa que apresentasse crescimento maior que três colônias e assim se determinava a UFC (Unidades Formadoras de Colônia).

2.2.3 Caracterização das colônias segundo o meio de cultura

O meio MRS é indicado para promover o crescimento de *Lactobacillus* spp. Já que os reagentes que compõem o meio MRS são: extrato de carne, extrato de levedura e peptona que são fontes de carbono, nitrogênio e vitaminas e a dextrose o carboidrato a ser fermentado. Além disso, se tem o Tween 80 que é um agente surfactante que facilita a captura dos nutrientes pelos *Lactobacillus* spp. Trata-se de um meio seletivo já que o acetato de sódio e citrato de amônio presentes na composição são agentes inibidores e seletivos para *Lactobacillus* spp., cujas colônias se apresentam de tamanho pequeno a grandes e de cor branca (MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960 apud COSTA et al. 2011).

Segundo Brasil (2013), o ágar MacConkey é um meio com cor original rosa avermelhada que tem como utilidade isolar bacilos Gram-negativos principalmente enterobactérias (*Salmonellas*, *Shigellas* e bactérias coliformes) e também verificar a fermentação ou não da lactose. As colônias que se apresentarem rosadas e opacas são

fermentadoras de lactose (possibilidades: *E.coli*, *Klebsiella* spp, Grupo *Enterobacter* spp) e as colônias transparentes a incolores são não fermentadoras de lactose (possibilidades: *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Proteus* spp e *Edwardsiella*). Não há crescimento de cocos Gram-positivos, já que o cristal violeta presente no meio inibe o crescimento destes micro-organismos especialmente enterococos e estafilococos.

O mesmo autor descreve que o ágar Sabouraud é um meio com nutrientes que favorece o crescimento de uma grande gama de fungos leveduriformes e filamentosos, deste modo sua utilidade é para cultivo de micro-organismos do gênero *Candida* spp e fungos filamentosos (caracterização macroscópica do fungo filamentosos: colônia gigante), sendo necessário também proceder a identificação dos micro-organismos que cresceram, pois não é um meio altamente específico.

Já o ágar sangue é uma base rica, que oferece ótimas condições de crescimento para a maioria dos micro-organismos. A conservação dos eritrócitos íntegros favorece a formação de halos de hemólise nítidos, úteis para a diferenciação e cultivo primário para o isolamento de *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp., sendo possíveis três interpretações:

- a) Beta hemólise: presença de halo transparente ao redor das colônias semeadas (lise total dos eritrócitos);
- b) Alfa hemólise: presença de halo esverdeado ao redor das colônias semeadas (lise parcial dos eritrócitos);
- c) Gama hemólise (sem hemólise): ausência de halo ao redor das colônias (eritrócitos permanecem íntegros).

Tendo em vista o relato anterior, se tomou como base para a identificação das colônias: as características macroscópicas e a relação do crescimento com o meio de cultura.

- a) Ágar Sangue: colônias circulares, tamanhos variados, com elevação convexa e margem lisa, sem a presença de hemólise e na coloração branca ou transparente e em alguns casos amarelas;
- b) Ágar Sabouraud: colônias de tamanhos variados, circulares, com a margem lisa, brancas e de elevação convexa.
- c) Ágar MacConkey: não foi observado um padrão de crescimento em nenhum tempo de fermentação. O crescimento mais expressivo ocorreu no colostro *in natura* e foi desde colônias fermentadoras a não fermentadoras de lactose.
- d) Ágar MRS: colônias circulares, com a margem lisa, de elevação convexa, brancas e de tamanhos variados.

2.3 Análise estatística

Para avaliar o efeito do tempo de fermentação em todas as variáveis estudadas, utilizou-se o programa estatístico Minitab®. As médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA). Para as variáveis que apresentaram resposta significativa, as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para a análise de pH, assim como o esperado, mostraram que todos os tempos de fermentação da silagem de colostro diferiram de forma significativa ($P < 0,05$) do colostro fresco. As médias obtidas oscilaram de 6,10 para o colostro fresco ao valor mínimo de 4,35 medido no colostro com 60 dias de fermentação como demonstrado na Figura 5.

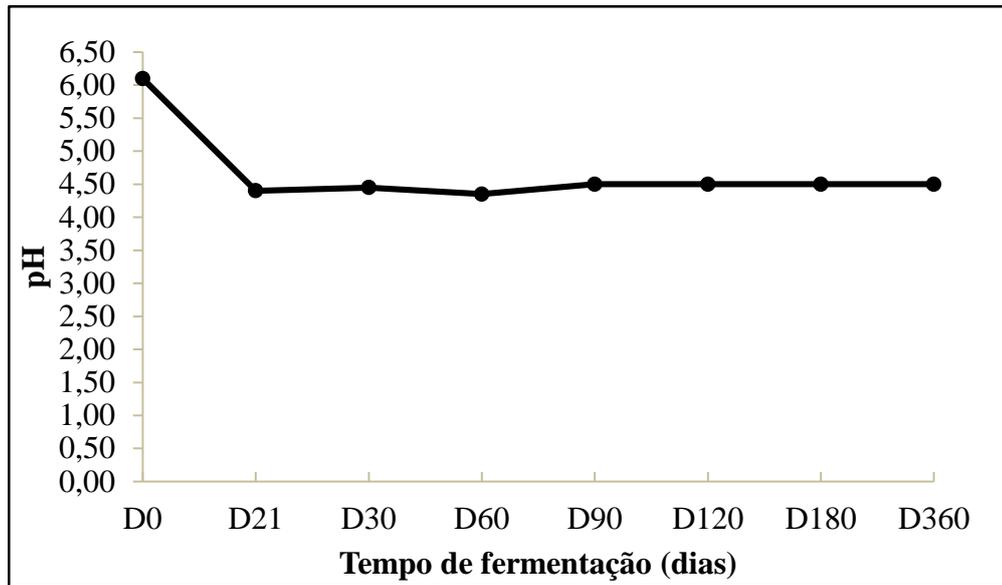
A fermentação pode resultar em uma perda nutritiva do colostro, já que o processo implica em consumo da lactose pelas bactérias ácido-lácticas e ainda por consequência há também o aumento da acidez o que pode ser um fator limitante no consumo da silagem de colostro pelas bezerras.

No entanto, segundo Ferreira (2011), estes valores baixos de pH refletem uma fermentação adequada, em função da transformação da lactose em ácido láctico, que leva à queda do pH e, conseqüentemente, permite boa conservação do material, com redução do crescimento de micro-organismos indesejáveis, já que a maioria das enterobactérias são sensíveis a ambientes com baixo pH.

Os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados em trabalho executado por Saalfeld et al. (2013), que encontraram uma faixa de pH entre 6,5 a 4,0 e concluíram que o colostro fermentado anaerobicamente pode ser uma boa alternativa para a alimentação de bezerras em substituição ao leite integral, com relação aos parâmetros físico químicos da silagem de colostro.

Krüger et al. (2008) avaliaram o tempo de fermentação da silagem de colostro e observaram uma relação direta entre temperatura, luminosidade e tempo de fermentação. Quanto maior o calor e incidência de luminosidade menor é o tempo necessário para cessar a fermentação, ou seja, mais rápido ocorre o consumo da lactose pelas bactérias ácido-lácticas e liberação de ácido láctico e assim a queda do pH no início é intensa e posteriormente ocorre uma estabilização (Figura 5).

Figura 5 – Variação do pH da silagem de colostro bovino em função do tempo de fermentação



Ferreira (2011) que avaliou a dinâmica fermentativa do colostro bovino fermentado sob condições anaeróbicas e armazenado em diferentes temperaturas ambientais, também observou esta relação. O autor concluiu que, embora o pH inicial fosse semelhante, as amostras armazenadas sob temperaturas mais elevadas apresentaram um declínio mais rápido no pH, demonstrando que a temperatura ambiental e, por consequência, a temperatura da silagem tem influência direta sobre o processo de fermentação.

Com relação à densidade, sabe-se que o colostro apresenta normalmente valores bem superiores ao do leite, sendo que a densidade relativa do leite varia de 1,028 a 1,034 g/mL (BRASIL, 2011). Pesquisas mostram que o valor de densidade do colostro logo após o parto pode ser até mais que o dobro do leite aceito pela indústria, sendo que estes valores vão decaindo em função do tempo pós-parto. Salles (2011) afirmou que o colostro possui composição diferente do leite, o que afeta com certeza a densidade, sendo que o colostro possui menor quantidade de lactose (2,7 vs 5,0%), maior porcentagem de gordura (6,7 vs 3,7%), maior porcentagem de minerais e vitaminas e maior porcentagem de proteínas (14 vs 3,1%) e dentre as proteínas chama-se a atenção para as imunoglobulinas ou anticorpos (48 vs 0,6 mg/mL).

Tendo em vista esta composição esperava-se que a densidade do colostro *in natura* (D0) fosse maior e diferisse da densidade do colostro fermentado. No entanto, os resultados obtidos mostraram que, para esta variável, o colostro do dia 0 diferiu de forma significativa dos demais, com exceção do colostro fermentado por 21, 30 e 60 dias e também,

diferentemente do que se esperava o valor de densidade relativa para o colostro *in natura* (1,032 g/mL) foi semelhante ao do leite.

Este fato pode ser explicado devido não ter sido utilizado o colostro da primeira ordenha pós-parto, mas sim o leite de transição colhido entre a 3ª e 5ª ordenha pós-parto; isto porque como se sabe, atribui-se uma densidade superior ao colostro devido à concentração de proteínas (imunoglobulinas) que é bem superior que no leite, porém esta quantidade de imunoglobulinas diminui no leite conforme a vaca vai sendo ordenhada; quanto maior o período pós-parto a tendência é de se ter um teor de imunoglobulinas menor (SALLES, 2011; WATTIAUX, 1997).

No presente trabalho, a maior média de densidade foi mensurada no D0 observando-se queda gradual conforme o período de fermentação, sendo o menor valor numérico obtido aos 360 dias de fermentação, porém não diferiu estatisticamente dos dias 30, 60, 90, 120 e 180 (Tabela 2).

Esperava-se que a porcentagem de sólidos totais (minerais, lactose, gordura e proteínas) também se apresentasse menor conforme o tempo de fermentação e assim, por consequência, a densidade da silagem também reduzisse, porém, a silagem com 360 dias de fermentação apresentou a segunda maior média para %ST, sendo inferior apenas à obtida no colostro *in natura* (dia 0). Pode-se observar que ocorreu um decréscimo da %ST até os 60 dias de fermentação e após este período as médias voltaram a subir até o final do período de fermentação.

Tabela 2 – Valores médios das variáveis densidade e sólidos totais do colostro bovino *in natura* e da silagem de colostro com diferentes dias de fermentação

Variáveis	Dias de Fermentação							
	0	21	30	60	90	120	180	360
Densidade (g/mL)	1,032 ^a	1,029 ^{ab}	1,025 ^{abc}	1,025 ^{abc}	1,024 ^{bc}	1,022 ^{bc}	1,021 ^{bc}	1,020 ^c
Sólidos Totais (%)	13,56 ^a	8,20 ^{cd}	7,39 ^d	7,70 ^{cd}	9,40 ^{bc}	9,50 ^{bc}	10,52 ^b	11,28 ^b

*Letras minúsculas divergentes nas linhas indicam diferença significativa, estimada pela análise de variância (ANOVA). Para as variáveis que apresentaram resposta significativa ($P < 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de significância.

Esses resultados divergem das observações feitas por Moore et al. (2009) em que quanto menor o pH, menor a %ST obtida. Essa correlação também foi notada por Foley e Otterby (1978) que descreveram que conforme o pH do colostro diminuiu (à medida que a acidez aumentou) ocorreu decréscimo dos sólidos totais (proteína, gordura e teor de lactose).

Uma possível explicação para essa discrepância quanto à %ST é a forma de mensuração desta variável, que no presente trabalho foi realizada através de refratômetro manual. Segundo Fox e McSweeney (1998 apud MOORE et al., 2009) independentemente do refratômetro utilizado, o índice de refração de leite é considerado difícil de estimar devido à presença de glóbulos de gordura e micelas de caseína. Moore et al. (2009) afirmaram que se uma camada fina de leite é usada e se o prisma do refratômetro estiver isento de qualquer resíduo de leite restante entre as amostras, a análise pode ser relativamente precisa.

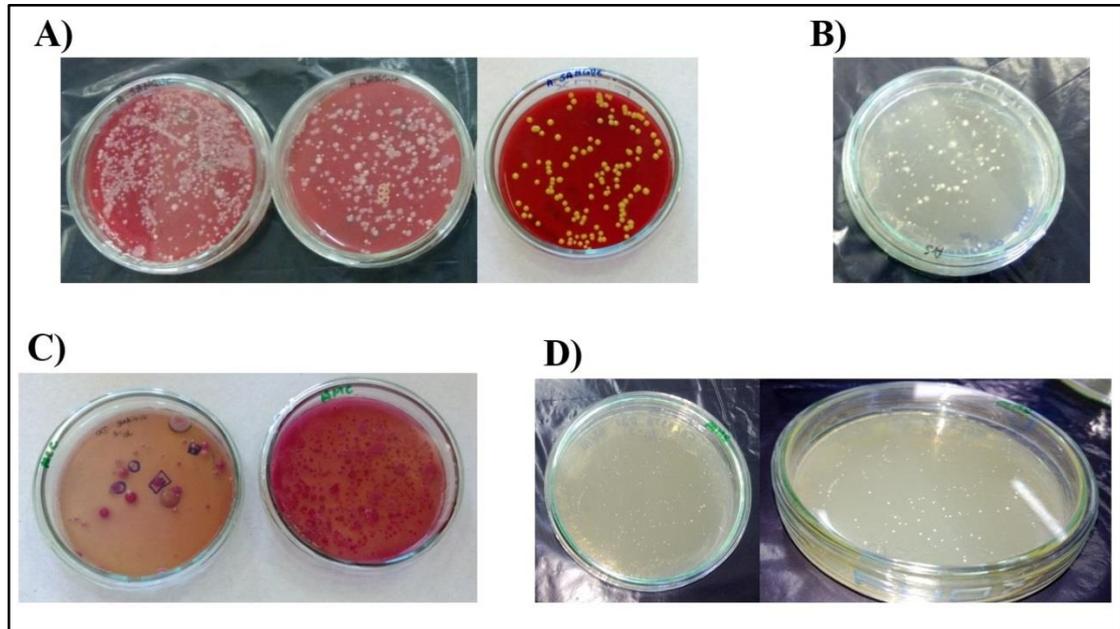
Além disso, há possibilidade de interferência do desenvolvimento dos micro-organismos no teor de sólidos, já que após o período de crescimento exponencial e fase estacionária ocorre a morte gradual dos micro-organismos o que poderia estar contribuindo no acréscimo de sólidos conforme maior o tempo de armazenamento.

Sabe-se que o leite integral apresenta em média 12,5% de sólidos, portanto, uma alternativa para as silagens que apresentarem um baixo teor de ST é ter sua utilização talvez como um complemento na dieta das bezerras e não como um substituto total do leite.

Pode-se observar que o tempo de fermentação afetou de forma intensa as características físico-químicas do colostro. Desta maneira a realização de análises bromatológicas seria interessante para estudar de forma mais detalhada a %ST e assim compreender qual o motivo ou qual componente dos sólidos do leite está se elevando conforme o tempo de fermentação é prolongado.

As principais colônias microbianas isoladas segundo o meio de cultura utilizado, cujos aspectos morfológicos se repetiram durante todo o experimento, estão representadas na Figura 6.

Figura 6 – Padrão de crescimento microbiológico observado no colostro *in natura* e colostro fermentado para os diferentes meios de cultura utilizados. A) ágar sangue; B) ágar Sabouraud; C) ágar MacConkey e D) ágar MRS



No meio de cultura ágar sangue observou-se o crescimento de colônias circulares, de borda lisa, elevação convexa, pequenas, sem a formação de hemólise e com coloração variando do branco ao amarelo, sugerindo assim a possibilidade do crescimento de micro-organismos do gênero *Staphylococcus* spp. Já no meio de cultura Sabouraud notou-se o crescimento de colônias brancas, de borda lisa, com tamanhos variados podendo se tratar então de colônias de leveduras. No ágar MacConkey não foi observado um padrão de crescimento microbiológico demonstrando, portanto, o crescimento de micro-organismos de inúmeros gêneros. Por ser um meio seletivo e devido também ao padrão de crescimento e características das colônias, no meio MRS observou-se o desenvolvimento apenas de bactérias do gênero *Lactobacillus* spp.

Quanto ao nível de desenvolvimento dos micro-organismos segundo o tempo, foi observada apenas diferença ($P < 0,05$) no meio ágar MacConkey. Para os demais meios o crescimento de UFC do colostro *in natura* não diferiu significativamente para qualquer tempo de fermentação (Tabela 3).

Tabela 3 – Média de UFC/mL obtidas para os meios de cultura comerciais: ágar Sangue, Sabouraud, MacConkey e MRS do colostro bovino *in natura* e fermentado por diferentes períodos

Dias de Fermentação	Unidades Formadoras de Colônia/mL			
	Ágar Sangue	Ágar Sabouraud	Ágar MacConkey	Ágar MRS
D0	809000 a	18900 a	1360 a	712000 a
D21	977000 a	1090000 a	0 b	911000 a
D30	134000 a	1140000 a	7,00 b	206000 a
D60	902000 a	1080000 a	0 b	2250000 a
D90	1,15 a	191 a	0 b	620000 a
D120	900000 a	4000000 a	80 b	4330 a
D180	0 a	40 a	0 b	9180 a
D360	108 a	4000000 a	0 b	130000 a

*Letras minúsculas divergentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$)

Ferreira (2011) observou em seu trabalho que o desenvolvimento de bactérias ácido-lácticas, enterobactérias e leveduras foi influenciado pelo tempo de armazenamento, gerando impacto direto no processo fermentativo.

Em avaliação das características microbiológicas do colostro fermentado Saalfeld et al. (2013) observaram tanto para a silagem de colostro quanto para o colostro fresco a presença das bactérias *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Bacillus* spp. e leveduras do gênero *Candida* spp. Este padrão de crescimento foi observado no colostro e silagem para até 14 dias de fermentação, já a partir de 21 dias de fermentação foram isoladas somente bactérias do gênero *Lactobacillus* spp.

Borchardt et al. (2012) também obtiveram resultados semelhantes, sendo que a partir de amostras retiradas da silagem de colostro após 21 dias de fermentação e plaqueadas em meio MacConkey, Chapman, e BDA não foram identificadas UFC, entretanto houve crescimento bacteriano nas amostras plaqueadas em meio MRS. As colônias foram identificadas como pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, através de coloração por técnica de Gram, microscopia e testes bioquímicos.

Deste modo pode-se afirmar que a fermentação do colostro ocorreu de maneira adequada até os 360 dias de armazenamento, com presença de micro-organismos do gênero *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus* spp., além de leveduras e com a eliminação de micro-organismos patogênicos como por exemplo, enterobactérias. A manutenção do crescimento de

micro-organismos do gênero *Lactobacillus* spp. é de extrema importância para um processo fermentativo eficiente e para se ter a garantia da conservação da silagem de colostro. Por consequência da ação destes micro-organismos há um aumento de acidez o que favorece a eliminação de bactérias patogênicas dentre elas as causadoras de diarreias e outras doenças em bezerros.

O armazenamento do colostro bovino através de fermentação ou tratamento químico resulta em alterações nas características físicas, inevitáveis perdas de nutrientes e, ocasionalmente, problema de aceitabilidade pelas bezerras, mas é um método conveniente e econômico (FOLEY; OTTERBY, 1978).

4. CONCLUSÃO

Conclui-se, com a presente pesquisa, que a fermentação do colostro resulta em queda do pH, sendo eficaz em inibir o crescimento de bactérias patogênicas e favorecer a sobrevivência de *Lactobacillus* spp. A %ST até os 360 dias de fermentação permanece dentro do intervalo de valores indicado na literatura. No entanto, considera-se necessário realizar análises bromatológicas para se identificar qual sólido está prevalecendo, principalmente após os 120 dias de fermentação.

Pesquisas estão sendo realizadas comparando o fornecimento da silagem de colostro e do leite comercial para bezerras leiteiras. Assim, tem-se condições de avaliar *in vivo*, o emprego da silagem de colostro como fonte nutricional, nas mesmas condições de preparo e estocagem que as amostras avaliadas no presente estudo.

5. REFERÊNCIAS

ANDRADE, E. A.; ANSELMINI, R. e MENDES, C. Q. Silagem de colostro: alternativa sustentável para a bovinocultura leiteira. **SB Rural**. 2010.

AZEVEDO, R. A. de. e DUARTE, E. R. Aspectos microbiológicos do colostro bovino em diferentes técnicas de conservação e armazenamento: uma revisão. **REDVET Rev. Electrón. vet.**, Montes Claros, v. 15, n. 6, 2014.

AZEVEDO, R. A. de. et al. Desempenho de bezerros alimentados com silagem de leite de transição. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 48, n. 5, p. 545-552, maio. 2013.

BORCHARDT, J. L. et al. Avaliação microbiológica da silagem de colostro de bovinos usada na produção de bebida láctea. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA 4ª MOSTRA CIENTÍFICA. 21. 2012, Pelotas. **Resumo...** Pelotas: UFPel, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**, Brasília, v. 9, 2013. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/Y0M>>. Acesso em: 30 dez. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº62, de 29 de dezembro de 2011**. Disponível em: <<http://central3.to.gov.br/arquivo/174314/>>. Acesso em: 30 jan. 2016.

COSTA, A. L. P da. et al. Avaliação de modificações no meio MRS (seletivo para *Lactobacillus* spp) por diferentes sais de amônia e Tween 20 em substituição ao citrato de amônio e Tween 80. **Ciência Equatorial**, v. 1, n. 2, 2011.

FERREIRA, L. S. **Silagem de Colostro**: caracterização do perfil de fermentação anaeróbica e desempenho de bezerras leiteiras. 2011. 161 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2011.

FOLEY, J. A. e OTTERBY, D. E. Availability, Storage, Treatment, Composition, and Feeding Value of Surplus Colostrum: A Review. **J Dairy Sci.**, Minnesota, v. 61, p. 1033-1060, 1978.

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

KRÜGER, K. R. et al. Avaliação do tempo de fermentação da silagem de colostro para aleitamento de ternsiras leiteiras. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTIFICA E ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO. 17. e 10., 2008, Pelotas. **Resumos...** Pelotas: UFPel, 2008.

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: 14 jan. 2016.

LUIZ, D. J. et al. Avaliação físico-química e microbiológica do leite UHT comercializado em três países do Mercosul (Brasil, Argentina e Paraguai). **Arch Latinoam Nutr.**, v. 60, n. 3, 2010.

MOORE et al. Quality assessments of waste milk at a calf ranch. **J. Dairy Sci.**, v. 92, p. 3503-3509, 2009.

OLIVEIRA, E. N. A. de. et al. Composição físico-química de leites em diferentes fases de lactação. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.**, Curitiba, v. 8, n. 4, p. 409-415, out./dez. 2010.

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

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

SALLES, M. S. V. A importância do colostro na criação de bezerras leiteiras. **Pesquisa & Tecnologia**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 66, out. 2011.

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.

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.

VASCONCELOS, C. A. N. **Avaliação do ganho de peso de bezerros alimentados com três dietas líquidas distintas**. 2012. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Centro Universitário de Formiga, Formiga, 2012.

WATTIAUX, M. A. Heifer raising - birth to weaning. Importance of colostrum feeding. In: WATTIAUX, M. A. **Dairy Essentials**. Madison: Instituto Babcock, University of Wisconsin, 1997. p. 109-112.

ZANOTTI, J. **Desenvolvimento de fêmeas leiteiras mediante o uso de leite cru ou sucedâneo**. 2013. 42 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2013.