

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

INÊS DE FREITAS GOMIDE

VIABILIDADE DA SILAGEM DE COLOSTRO PARA BEZERROS
LEITEIROS

UBERLÂNDIA

2017

INÊS DE FREITAS GOMIDE

VIABILIDADE DA SILAGEM DE COLOSTRO PARA BEZERROS LEITEIROS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Aparecida Medeiros - Ronchi

UBERLÂNDIA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

G633v 2017 Gomide, Inês de Freitas, 1971
Viabilidade da silagem de colostro para bezerros leiteiros / Inês de Freitas Gomide. - 2017.
87 f. : il.

Orientador: Alessandra Aparecida Medeiros-Ronchi.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.29>
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Bezerro - Alimentação e rações - Teses. 3. Colostro - Teses. 4. Silagem - Teses. I. Medeiros-Ronchi, Alessandra Aparecida. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

VIABILIDADE DA SILAGEM DE COLOSTRO PARA BEZERROS LEITEIROS

Tese aprovada para a obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Universidade Federal de Uberlândia, pela banca examinadora formada por:

Uberlândia, 29 de setembro de 2017.

Prof^a. Dr^a. Alessandra Aparecida Medeiros - Ronchi (Orientadora) – FAMEV/UFU

Prof^a. Dr^a. Daise Aparecida Rossi – FAMEV/UFU

Prof^a. Dr^a. Mara Regina Bueno de Mattos Nascimento – FAMEV/UFU

Prof^a. Dr^a. Susana Elisa Rieck – IFTM/Campus Uberlândia

Prof^a. Dr^a. Fernanda Raghiante – IFTM/Campus Uberlândia

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

INÊS DE FREITAS GOMIDE - Nascida em Uberlândia, Estado de Minas Gerais, em 22 de junho de 1971, filha de Mauro Gomide e Virgínia de Freitas Gomide. Médica Veterinária, graduada em 22 de Julho de 1994 pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. Durante a graduação objetivou sua formação principalmente na área de bovinocultura de corte e leite, realizando estágios nas áreas de manejo geral da bovinocultura e reprodução de bovinos de corte. Em 1996 iniciou o mestrado em Ciência Animal da Universidade Federal de Lavras, área de concentração Nutrição de Ruminantes. Foi bolsista do CNPQ no período de fevereiro de 1996 a fevereiro de 1998. Em 2006 especializou-se em Nutrição e Alimentação de Cães e Gatos pela Universidade Federal de Lavras. Em 2013 iniciou o doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia. Tem experiência nas seguintes áreas: Bioquímica Fisiológica, Fisiologia Animal e Bovinocultura de Corte e Leite.

“Não há diferenças fundamentais entre o homem e os animais nas suas faculdades mentais (...) os animais, como os homens, demonstram sentir prazer, dor, felicidade e sofrimento.”

Charles Darwin

Dedico este trabalho aqueles que sempre foram a
razão do meu caminho profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus queridos e muito amados Heitor, Francisco, Hugo, Mauro, Virgínia, Eduardo, Amanda e Duda pelo amor, dedicação, paciência e presença constante em minha vida!! Amo vocês!!

À minha orientadora Alessandra Ap. Medeiros - Ronchi pela dedicação, profissionalismo, por ser um exemplo na docência com toda a sua determinação, responsabilidade e capacidade intelectual. Além de grande parceira e amiga. Meu muito obrigado!!!

Agradeço à querida professora Daise Rossi!! Sem sua ajuda muito deste trabalho não se realizaria!!

À professora Mara Regina pelos bons papos e direcionamentos relacionados à ambiência! Seu apoio foi fundamental!

Aos meus mais queridos amigos de sempre!! Não poderia me esquecer do agradecimento especial a Susana, Rodrigo, Andrei, Ilka e Simone Raszl... alguns mesmo a grande distância geográfica, sempre estão presentes!!!

Aos colegas do LABIO!!! Todos!!! Meu muito obrigada pela ajuda, pelos bons papos e pelo companheirismo durante o período em que tive o prazer de trabalhar com vocês.

Ao Guilherme Paz!!! O rei da paciência!!! Grande colega!! Meu muito obrigada por sua ajuda!!!

Agradeço em especial à minha ex-aluna e futura colega de profissão Jéssica Peixoto, que sempre demonstrou afinho e muito profissionalismo em tudo o que faz!!! Seu caminho será brilhante!! Muito obrigada por sua ajuda em todos os momentos deste trabalho!!! Foi fantástico contar com seu apoio!!

Aos colaboradores do setor de bovinocultura de leite pelo auxílio na coleta das amostras, à Médica Veterinária Carla, responsável pelo setor de ordenha e, ao Médico Veterinário Leônidas Ferreira, que ainda quando aluno da UFU, muito me auxiliou no setor.

Aos meus queridos colegas de trabalho da fantástica sala 5 do IFTM!! Susana, Fernanda, Cristiane, Adriana, Paulão, Daniel!!! O quer seria desta sala sem vocês!!!

À Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, em especial à secretária Célia Regina, pela oportunidade de realizar o curso de doutorado.

RESUMO

O uso de substituintes do leite na alimentação de bezerros é prática necessária para a redução dos custos de produção e, o uso do colostro fermentado anaerobicamente vem se tornando uma realidade por ser de fácil obtenção e baixo custo. Esta tese foi organizada em quatro capítulos, sendo o primeiro referente às considerações gerais sobre a produção de silagem de colostro. O segundo capítulo objetivou analisar microbiologicamente a silagem de colostro produzida em duas propriedades rurais no Município de Uberlândia quanto a quantificação de coliformes totais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, bactérias mesófilas e enterobacterias. Após 30 dias de fermentação o produto apresentou-se seguro para o uso. Entretanto observou-se 30,7% (23/75) de perda por putrefação, o que propiciou a continuidade deste estudo. No capítulo III objetivou-se avaliar o impacto da temperatura ambiente (TA) e da amplitude térmica (AT) diária no índice de perdas, determinar o impacto da TA na temperatura superficial da embalagem (TSE) e verificar se com a aferição da TSE pode-se determinar quais amostras não apresentarão fermentação adequada. Os colostros de seis vacas leiteiras do rebanho da Universidade Federal de Uberlândia foram utilizados para confeccionar 108 amostras de silagem de colostro que permaneceram em processo fermentativo por 7, 14 e 28 dias. Destas, 46,4% (43/108) apresentaram inadequações por putrefação. Concluiu-se que a média da TA e a AT diária afetam a fermentação e tem efeito significativo sobre a TSE, porém, a medição da TSE não é um método confiável na determinação do índice de perdas. No último capítulo verificou-se a influência do pH, dos coliformes totais, fungos e leveduras, bactérias lácticas e mesófilas na adequação da fermentação e sua relação com o índice de perda das amostras. Concluiu-se que o processo de putrefação ocorreu a partir dos sete primeiros dias de processo fermentativo. A contaminação microbiana no decorrer deste processo foi reduzida pela acidificação e os níveis destas contaminações aos 28 dias podem garantir a segurança na utilização da silagem de colostro na alimentação de bezerros. Porém, o alto índice de perdas por putrefação, provavelmente em decorrência da contaminação por bolores e leveduras, demonstra a necessidade de rígido controle sanitário.

Palavras-chave: Fermentação anaeróbia. Putrefação. Sucedâneo.

ABSTRACT

The use of milk substitute in calf feeding is a necessary practice to reduce production costs. The use of colostrum fermented anaerobically has become a reality for having low cost, but in the Triângulo Mineiro region, presented high loss rates. This thesis is divided into four chapters, the first one referring to the general considerations of the topics covered in the others. The second chapter aimed to analyze the colostrum silages of two rural properties in the city of Uberlândia in terms of quantification of total coliforms, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, mesophilic bacteria and enterobacteria. After 30 days of fermentation the product was safe for use. However, 30.7% (23/75) of putrefaction losses were observed, which allowed the continuity of this study. In chapter III we aimed to evaluate the impact of the ambient temperature (TA) and the daily thermal amplitude (AT) on the loss index. In addition, to determine the impact of TA on the surface temperature of the package (TSE) and to verify if through TSE gauging can determine which samples will not present adequate fermentation. Colostrums were collected from six dairy cows from the Federal University of Uberlândia's batch and 108 samples of colostrum silage were prepared, which remained in the fermentation process for 7, 14 and 28 days. Of these samples, 46.4% (43/108) presented inadequacies due to putrefaction. It was concluded that the mean of TA and daily AT affect the fermentation and has a significant effect on the TSE, however, the TSE measurement is not a reliable method to determine the loss index. In the last chapter, the influence of pH, total coliforms, yeasts and molds, lactic bacteria and mesophilic bacteria on the suitability of the fermentation and its relation with the loss index of the samples were verified. It was concluded that the putrefaction process occurred starting from the seventh day of the fermentation process. Microbial contamination during this process was reduced by acidification of the pH, and the levels of these contaminations at 28 days can guarantee safety in the use of colostrum silage in feeding calves. However, the high index of losses due to putrefaction, probably due to contamination by yeasts and molds, demonstrates the need for strict sanitary control.

Keywords: Colostrum Silage. Putrefaction. Substitute.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Variação na composição percentual do colostro bovino, comparada com a do leite bovino.	18
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Heterotrophic bacteria in mesophilic colostrum silage.	39
Tabela 2. Total coliforms in silage of colostrum.	40

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Médias da temperatura ambiente e dos índices de perda de amostras de silagem de colostro	56
---	----

CAPÍTULO 4

Tabela 1. pH do colostro <i>in natura</i> e após a fermentação por 7, 14 e 28 dias de fermentação.	75
Tabela 2. Contagens médias (Log.UFC.mL ⁻¹) de bactérias bioindicadoras da qualidade do colostro <i>in natura</i> e após fermentação.	76
Tabela 3. pH e contagens médias* (Log.UFC.mL) de bactérias bioindicadoras e BAL em amostras de colostro com fermentação adequada e inadequada.	77
Tabela 4. Contagens médias (Log.UFC.mL ⁻¹) de bolores e leveduras das amostras de colostro com fermentação adequada e inadequada.	78

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Processo fermentativo das bactérias ácido lácticas e seus subprodutos. 22

CAPÍTULO 3

Figura 1. Temperatura superficial externa (TSE) em função da temperatura ambiente (TA). 57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AT: Amplitude Térmica
BAL: Bactérias Ácido Lácticas
BL: Bolores e Leveduras
BT: Bactérias Heterotróficas Mesófilas
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
CNA: Confederação da Agricultura e Pecuária no Brasil
CT: Coliformes Totais
DIC: Delineamento Inteiramente Casualizado
DP: Desvio Padrão
DRBC: Ágar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol
EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LABIO: Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada
MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MRS: Ágar Man, Rogosa and Sharp
mL: mililitro
NRC: National Research Council
PCA: Plate Count Agar
PET: Politereftalato de Etilenotipo
pH: Potencial Hidrogeniônico
PIB: Produto Interno Bruto
TA: Temperatura Ambiente
TSE: Temperatura Superficial da Embalagem
TSEA: Processos Fermentativos Adequados
TSEI: Processos Fermentativos Inadequados
UFC: Unidade Formadora de Colônia
UFU: Universidade Federal de Uberlândia

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Colostro como suscedâneo	17
3.2 Colostro fermentado	19
3.3 Microbiologia da silagem de colostro	21
3.4 Influência da temperatura ambiente na fermentação anaeróbica do colostro	25
REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO 2 – Colostrum silage has microbiological quality to replace milk for calves	34
CAPÍTULO 3 – Efeitos da temperatura ambiente na fermentação anaeróbica do colostro bovino no município de Uberlândia/MG	43
CAPÍTULO 4 – Influência do pH e microbiota indicadora na conservação do colostro por fermentação	58
ANEXOS	79
1 Normas do periódico Ciência Animal Brasileira - Capítulo 2	80
2 Normas do periódico Ciência Rural - Capítulos 3 e 4	82

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

O agronegócio é uma das principais atividades econômicas do Brasil, demonstrando rentabilidade, segurança e tecnificação. A diversidade climática e a extensão territorial agriculturável forneceu condições para que esta atividade tenha sido responsável por 23% do produto interno bruto (PIB) em 2016 (PERFARM, 2017) e com perspectiva de 2% de crescimento em 2017 (BRASIL, 2016a). Segundo a Confederação da Agricultura e Pecuária no Brasil (CNA) o agronegócio representa 48% das exportações totais do País (BRASIL, 2016a) e somente a agropecuária conta com 5 milhões de produtores rurais que geraram mais de 600 bilhões de reais para a economia nacional (PERFARM, 2017).

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) o rebanho bovino brasileiro totalizou 215,2 milhões de cabeças em 2015 (BRASIL, 2016b) sendo o Brasil um dos maiores exportadores de carne do mundo. Com os sistemas de produção cada vez mais exigentes e com a menor margem de lucro faz-se necessário o aumento na eficiência deste sistema de produção e uma das alternativas é destinar os bezerros machos oriundos da pecuária leiteira para a engorda e abate, o que incrementaria a rentabilidade do produtor de leite. No Brasil, estes animais são normalmente descartados ou sacrificados ao nascimento, destino diferente ao observado em diversos outros países nos quais é utilizado para a produção de carne (NEIVA et al., 2015).

A pecuária leiteira brasileira descarta em torno de 10 milhões de bezerros leiteiros machos nascidos anualmente, sendo que estes poderiam ser destinados ao abate, propiciando renda adicional ao produtor rural. Levando-se em consideração a possibilidade do abate aos 10 meses de idade com peso médio de 10 arrobas, pode-se estimar a perda de 100 milhões de arrobas de carcaças de excelente qualidade anualmente (NEIVA e RESTLE, 2013). Porém, no Brasil, a produção de carne a partir de machos oriundos da pecuária leiteira não é muito utilizada devido ao custo de criação destes animais, principalmente nas fases de aleitamento (CALDAS, 2003) e desmame. Este fator é limitante pelo custo dos substituintes do leite e o arraçamento que devem ser destinados à alimentação destes animais. Os animais holandeses e seus mestiços apresentam excelente taxa de crescimento na primeira fase de vida (LUCCI, 1989) e, sendo o leite o principal alimento destes animais,

porém, por ser um produto destinado à comercialização sua utilização é restrita às fêmeas de reposição (SIGNORETTI et al., 1995).

Um dos produtos substituintes do leite e que pode ser utilizado na alimentação dos bezerros destinado ao abate é o excesso de colostro produzido na propriedade, reduzindo desta forma os custos de produção. A utilização de leite ou sucedâneos associados à alimentação sólida pode ser vantajosa a partir da segunda semana de vida, com o intuito de se antecipar o consumo de nutrientes (NRC, 2001). Alguns trabalhos foram desenvolvidos com colostro fermentado objetivando-se estabelecer alternativas de uso de um sucedâneo eficaz, de baixo custo, e que esteja associado a um plano nutricional (MODESTO et al., 2002).

O uso da silagem de colostro, quando bem produzida, pode ser uma alternativa como substituinte do leite nas propriedades leiteiras, garantindo ganho de peso e maior rentabilidade ao diminuir os custos no desenvolvimento destes animais jovens. Saafeld (2006) estudou a administração da silagem de colostro na criação de bezerras da raça Holandesa e obteve ganhos de peso médio diário de 823 gramas no primeiro mês e de 667 gramas durante seis meses. Ainda de acordo com este autor, além dos excelentes resultados de desempenho produtivo dos bezerros, a tecnologia trouxe benefícios econômicos aos produtores, já que 200 litros de leite passaram a ser comercializados ao invés de serem fornecidos aos animais.

Porém, é necessário que o produtor manipule higienicamente o processo de obtenção do colostro e desenvolva condições de fabricação, armazenamento e manejo adequado de oferta deste produto aos seus bezerros. Para Hodge e Jenny (1983) problemas decorrentes do fornecimento de colostro fermentado, como a diarreia por exemplo, podem ser atribuídos principalmente ao excesso de acidez (pH inferior a 4,0).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as características físicas e a biossegurança microbiológica da silagem de colostro produzida em propriedades rurais no município de Uberlândia/MG.

2.2 Objetivos específicos

- Observar o impacto da temperatura ambiente e da amplitude térmica diária no índice de perda de colostro durante o processo fermentativo anaeróbio,
- Determinar o impacto da temperatura ambiente na temperatura superficial da embalagem,
- Observar a dinâmica do pH e crescimento microbiano durante o processo fermentativo anaeróbio do colostro entre amostras que fermentaram adequadamente e que não apresentaram fermentação adequada e determinar se esta dinâmica influenciou no índice de perdas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Colostro como Suscedâneo

A primeira secreção da glândula mamária após o parto é denominada colostro e trata-se de um produto nutricionalmente rico e fonte de imunoglobulinas e outras substâncias importantes para promoção do crescimento e proteção do neonato contra doenças infecciosas (GODDEN, 2009). Ele possui características nutritivas semelhantes ao leite, podendo ser fornecido *in natura* (NRC, 2001) ou fermentado naturalmente (MATOS, 1996; SAAFELD et al., 2005). Sua composição nutricional varia muito durante as primeiras horas pós-parto (Tabela 1), principalmente em relação à concentração de proteínas, gorduras e lactose, sendo posteriormente denominado leite de transição. Devido a esta composição, em particular, o colostro e o leite de transição apresentam valor comercial nulo, não sendo aproveitado pela indústria.

Tabela 1. Variação na composição percentual do colostro bovino, comparada com a do leite bovino.

Componentes (%)	Colostro (tempo pós-parto)		Leite Bovino
	3 horas	72 horas	
Gordura	6,80	3,72	3,50
Proteínas Totais	9,42	4,68	3,20
Proteínas do Soro	8,50	1,60	0,50
Caseínas	0,92	3,18	2,73
Lactose	2,38	4,27	4,60
Cinza	1,02	0,74	0,70
Sólidos totais	19,62	13,41	12,00

Fonte: Heng (1999).

Geralmente o colostro é utilizado de forma inadequada por boa parte dos produtores de leite, não permitindo o consumo na quantidade e frequência adequadas aos bezerros leiteiros. O excedente do colostro geralmente é descartado o que demonstra o desconhecimento por parte dos produtores da utilização de um alimento nutricionalmente rico e de técnicas de conservação e armazenagem (SAALFELD et al., 2005).

O colostro é produzido de forma estéril nos alvéolos da glândula mamária e sua contaminação com micro-organismos inicia-se a partir do momento em que ele é secretado através dos ductos mamários (GARCIA, 1981) e Saafeld et al. (2005) relataram que a incorreta preparação da vaca para a ordenha (higiene), baldes ou mamadeiras não higienizados e excesso de tempo entre a ordenha e a amamentação podem permitir a contaminação do colostro fresco com bactérias.

Em estudo pioneiro sobre a qualidade do colostro *in natura*, Muller et al. (1975) observaram alta contaminação microbiana no material, com valores de $1,7 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹ para mesófilos totais, sendo também verificadas contagens de $6,0 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹ para coliformes e $1,4 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹ para bolores e leveduras. Já Foley e Otterby (1978) reportaram menores contaminações ao avaliarem as contagens de mesófilos totais ($1,6 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹), bolores e leveduras ($1,0 \times 10^2$ UFC.mL⁻¹), bactérias ácido-láticas ($2,5 \times 10^2$ UFC.mL⁻¹) e coliformes ($1,0 \times 10^2$ UFC.mL⁻¹).

Arguello et al. (2003) relataram que um dos procedimentos mais estudados em relação à utilização e preservação do colostro excedente é a confecção de banco de colostro. Este banco possui como propósito garantir a imunização de bezerros a partir do congelamento desta secreção, que deve ser feita após sua qualificação em relação à concentração de imunoglobulinas. Segundo estes autores, geralmente o colostro das 72 primeiras horas após o parto apresenta as melhores concentrações de imunoglobulina G e, portanto, pode ser utilizado para a imunização de neonatos.

O colostro e leite de transição são ótimas opções para o aleitamento e, geralmente, o volume produzido diariamente na propriedade é superior ao necessário para o aleitamento dos bezerros, o que torna a conservação e armazenamento uma ferramenta importante. Além disto, o leite não comercializável (colostro e leite de transição) pode ser utilizado para aleitamento das bezerras e bezerros, sendo importante recurso para redução de custos na bovinocultura de leite. Por ser rico em nutrientes, alternativas para seu armazenamento são continuamente pesquisadas tais como a refrigeração, congelamento ou fermentação (CAMPOS e SILVA et al., 1986; SAAFELD, 2008).

3.2 Colostro Fermentado

A forma de armazenar o colostro e o leite de transição adequadamente nas propriedades rurais é assunto estudado a décadas, sendo a refrigeração ou congelamento considerados ideais (CARLSON e MULLER, 1977; FOLLEY e OTTERBY, 1979). O uso destes métodos tem como entrave para o produtor rural o custo dos equipamentos necessários (geladeira e freezers), e na inexistência ou deficiência de rede elétrica para a zona rural, exigindo que o produtor adquira geradores de energia elétrica para manutenção de seus equipamentos. Portanto, outras formas de armazenamento foram desenvolvidas e podem ser utilizadas com sucesso, sendo importante a manutenção do valor nutricional e da segurança microbiológica, já que o produto será utilizado na alimentação de animais jovens e, portanto, mais susceptíveis aos distúrbios gastrintestinais.

De acordo com Matos (1996) uma técnica de armazenamento do colostro é na forma fermentada com o objetivo de conservar o valor nutricional e armazenar grandes volumes. Segundo Modesto et al. (2002) o processo de fermentação natural

foi desenvolvido como uma forma econômica de armazenamento, para se maximizar o uso e minimizar as perdas do colostro, constituindo-se em potente substituto ao leite.

O processo fermentativo aeróbico do colostro *in natura* foi estudado entre as décadas de 70 e 80 por diversos pesquisadores, e consistia no armazenamento do colostro durante quatro semanas, em recipientes vedados com sacos plásticos, e posteriormente no fornecimento várias vezes durante o dia aos bezerros (SWANNACK, 1974; JENNY et al., 1977; FOLEY e OTTERBY, 1978).

De acordo com Drevjany et al. (1975) o colostro deve ser manuseado de forma higiênica para evitar a contaminação microbiana e, posteriormente, armazenado em recipientes com tampas. Após o envase o material deve ser alojado em ambiente com temperaturas inferiores a 25°C e homogeneizado diariamente para neutralizar a separação de sólidos, e preferencialmente, fornecido aos animais dentro das primeiras semanas após o armazenamento. O colostro com presença de sangue não deve ser utilizado para a fermentação (KAISER, 1977).

Nos estudos de Carlson e Muller (1977); Daniels et al. (1977) e Folley e Otterby (1979), o colostro fermentado demonstrou-se de baixo custo e, embora resultados promissores tenham sido obtidos, a grande variabilidade no produto final foi um dos motivos para que esta técnica de armazenamento não tenha sido utilizada de forma intensificada. Segundo Jenny et al. (1977) maiores temperaturas ambientais podem resultar em melhor colostro fermentado devido às maiores contagens de *Lactobacillus* do que de enterobactérias. No entanto, a maior acidez e sabor alterado deste produto podem reduzir o consumo e a aceitação pelos bezerros.

A presença de patógenos como *Escherichia coli*, causadora de colibacilose em bezerros, e *Salmonella* spp. é um dos principais fatores de risco na utilização do colostro fermentado inadequadamente, uma vez que esses micro-organismos já foram isolados em amostras de colostro armazenado à temperatura ambiente (FOLEY e OTTERBY, 1978). Wray e Callow (1974) isolaram cepas hemolíticas de *E. coli* (08:K85) que sobreviveram após a fermentação por 36 dias a 21°C. Os mesmos autores também estudaram a sobrevivência de *Salmonella* Dublin e *Salmonella* Typhimurium em colostro fermentado e verificaram que somente em pH inferior ou igual a 4,5 essas bactérias foram inativadas. Outros estudos demonstraram que nesta forma de armazenamento, que o consumo pelos bezerros de colostro

fermentado em putrefação e com presença de odores desagradáveis pode ocasionar alopecia e diarreias (CAMPOS e SILVA, 1986; JENNY et al. 1977, RINDSING e BODOSH, 1977). Porém o uso do colostro fermentado naturalmente ainda é preconizado na alimentação de bezerros em países de clima temperado desde que regras de higiene e manejo alimentar sejam rigorosamente seguidos (RODRIGUES, 2011).

Uma alternativa ao processo aeróbico é a fermentação anaeróbica denominada silagem de colostro desenvolvida por Saafeld (2008) e que tem sido adotada por propriedades rurais brasileiras, principalmente na região Sul do Brasil. O procedimento para a produção da silagem de colostro é simples e utiliza material reciclável como garrafas plásticas de politereftalato de etilenotipo (PET). Este autor recomenda a higienização de todos os insumos utilizados na fabricação com água e detergente neutro, além de pré *dipping* dos tetos e utilização de baldes higienizados na coleta do colostro, assim como as mãos do ordenhador. O colostro coletado é disponibilizado nas garrafas pet que, uma vez repletas, devem ser hermeticamente fechadas após suave aperto manual em seu corpo para a retirada de ar. As garrafas devem ser direcionadas para local limpo, seco e escuro onde são armazenadas por 21 dias. Após este período a silagem de colostro já pode ser utilizada na alimentação dos bezerros.

Devido a fermentação, a lactose é uma das frações que mais sofre alterações ao longo do período de armazenamento. As bactérias ácido-láticas, responsáveis pela redução do pH, utilizam a lactose como fonte de energia resultando na produção de ácido láctico. Embora a lactose seja a única fonte de carboidrato presente no colostro e, portanto, essencial para suprir as exigências energéticas dos animais, poucos trabalhos com colostro fermentado apresentam os resultados dessa fração. Saafeld et al. (2012b) observaram baixos percentuais de lactose, de 0% a 1,09%.

3.3 Microbiologia da Silagem de Colostro

O processo fermentativo anaeróbico é realizado pelas bactérias ácido lácticas (BAL) presentes naturalmente no leite e colostro (WOUNTERS et al., 2002). Estas bactérias estão distribuídas em diversos ecossistemas e são reconhecidamente utilizadas em processos para a produção comercial de alimentos fermentados,

bebidas alcoólicas e ensilados (HUERTAS, 2010). As BAL são bastonetes curvos e curtos, Gram positivas, às vezes na forma de cocos ou bacilos, geralmente imóveis, não formadoras de esporos. São estritamente fermentativas, anaeróbicas, porém aerotolerantes e geralmente catalase negativas (KANDLER e WEISS, 1986). No processo de fermentação as bactérias ácido lácticas transformam a lactose em seu principal produto do metabolismo, o ácido láctico (Figura 1), que promove a queda do pH contribuindo para a conservação do colostro pois inibe o crescimento de micro-organismos indesejáveis (COGAN e ACCOLAS, 1990; REDONDO, 2008).

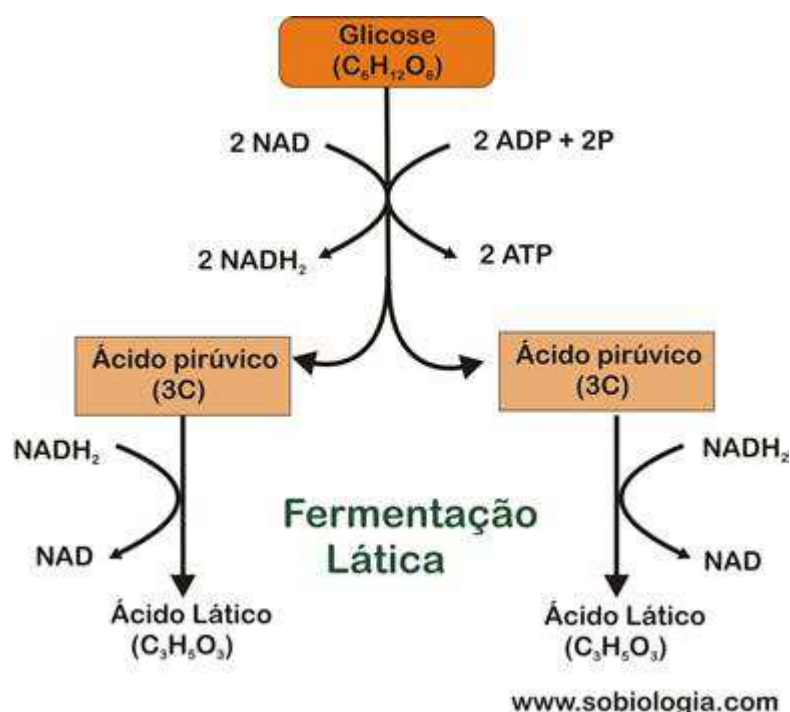


Figura 1. Processo fermentativo das bactérias ácido lácticas e seus subprodutos.

Fonte: http://www.sobiologia.com.br/conteudos/figuras/bioquimica/fermentacao_latica.jpg

Algumas BAL integram o grupo dos probióticos na legislação brasileira (BRASIL, 2002) por apresentarem características que, quando aplicadas na preparação de alimentos, proporcionam a redução do pH através do consumo de carboidratos e produção de ácidos, por isso são consideradas iniciadoras do processo fermentativo de vários alimentos. Além desta característica elas produzem várias substâncias antimicrobianas o que conseqüentemente, aumentam o tempo de conservação, pois inibe a proliferação de micro-organismos deteriorantes e

patogênicos (PFEILER; KLAENHAMMER, 2007) que são normalmente encontrados no leite e no colostro tais como fungos, leveduras e enterobactérias. Dentre as substâncias antimicrobianas produzidas pelas BAL pode-se citar ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas, diacetil e dióxido de carbono.

Segundo Azevedo et al. (2009) a contaminação do colostro e leite de transição por micro-organismos ocorre posteriormente à sua secreção pelos alvéolos da glândula mamária, e depende de vários fatores envolvidos no manejo dos animais, estrutura física e utensílios utilizados na ordenha, armazenamento e processamento dos mesmos. Por isso, deve-se evitar utilizar colostro proveniente de animais com histórico de mastite e promover ordenha em condições higiênicas para a produção da silagem de colostro.

Vários micro-organismos patogênicos podem ser encontrados nestas secreções lácteas decorrentes de contaminações indesejadas, tais como *Listeria monocytogenes* (OLIVER et al., 2005), *Staphylococcus aureus* (CREMONESI et al., 2007; OLIVER et al., 2005) e *Escherichia coli* (KAILEGYAN et al., 2008). A presença destes micro-organismos em desequilíbrio pode ser responsável pela deterioração do produto durante o processo fermentativo e a variação no período de armazenamento além de representarem um risco real para a ocorrência de distúrbios gastrointestinais e aumento da mortalidade de bezerros (FERREIRA et al., 2013).

Saafeld et al. (2013) relataram a presença das bactérias *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Bacillus* spp. e leveduras do gênero *Candida* spp. na silagem de colostro até 14 dias de fermentação. Segundo os autores, à partir de 21 dias de fermentação foram isoladas apenas bactérias do gênero *Lactobacillus* spp.. Saafeld et al. (2012a), demonstraram que após a fermentação anaeróbica o colostro mantém características nutricionais e apresenta inativação de bactérias patogênicas, mantendo o *Lactobacillus* spp. viável.

O pH ideal para a silagem de colostro varia de 3,55 a 4,39 pois nessa faixa, ocorre fermentação adequada do material armazenado, em função da transformação da lactose em ácido láctico que leva a queda do pH e, consequentemente, permite boa conservação do material com redução do crescimento de micro-organismos indesejáveis (SAALFELD, 2008). O colostro fermentado apresenta declínio do pH de valores iniciais entre 5,6 a 6,8 para valores próximos de 4,5 em poucos dias de fermentação, chegando a valores abaixo de 4,0 quando armazenado por períodos

prolongados (FERREIRA et al., 2013). Azevedo et al. (2009), avaliaram a curva de pH e as características microbiológicas do colostro fermentado em laboratório a 25°C, durante 34 dias. Concluíram que o colostro obtido no primeiro dia após o parto não sofre processo adequado de fermentação, possivelmente devido aos maiores teores de tampão bicarbonato.

Geraseev et al. (2011) ao avaliarem microbiologicamente a silagem de colostro verificaram que o material com características de boa fermentação, apresentou ausência de crescimento de representantes dos grupos das Enterobacteriaceae, *Staphylococcus* spp. e fungos. O cultivo microbiano indicou presença de bactérias com características morfológicas compatíveis com *Lactobacillus* spp. para todas as amostras avaliadas com boas características de fermentação.

Em estudo na mesorregião norte de Minas Gerais, Brasil, Azevedo et al. (2009) avaliaram a curva de pH e as características microbiológicas da silagem de colostro durante 34 dias. Verificou-se que o pH não apresentou redução adequada, atingindo média de 5,41, o que não favoreceu o crescimento de *Lactobacillus* spp.. Segundo Claesson et al. (2007), essas bactérias possuem crescimento ótimo em pH que varia entre 4 a 5. A silagem de colostro com média de pH superior a 5 favoreceu o crescimento de micro-organismos potencialmente patogênicos como Enterobacteriaceae e *Staphylococcus* spp. em contagens superiores a 1×10^7 UFC mL⁻¹ em 42,9% e 37,5% das amostras, respectivamente.

Alterações indesejáveis foram observadas na silagem de colostro que apresentou inadequação durante seu processo fermentativo caracterizadas por dilatação da garrafa, alta produção de gases e odor pútrido. Os cultivos indicaram positividade para Enterobacteriaceae, *Staphylococcus* spp. e fungos, além de concentrações inferiores de *Lactobacillus* spp. (GERASEEV et al., 2011).

No trabalho de Viegas et al. (2009) não foi possível determinar a causa da putrefação do colostro fermentado, uma vez que a população de enterobactérias e de estafilococos foram encontrados em níveis aceitáveis e *Lactobacillus* spp. esteve presente em quase todas as amostras. A prevalência da população de fungos e leveduras pode ser um dos fatores responsáveis pelo aspecto pútrido e pelo odor das amostras, e sua dominância pode estar relacionada à elevada temperatura, em média 29,4°C, sob a qual as garrafas ficaram armazenadas. Em outro trabalho, a silagem de colostro armazenada em temperatura mais elevada

(32,5°C), apresentou contagens de bactérias ácido lácticas e enterobactérias mais baixas e contagens maiores de leveduras quando comparado ao material fermentado em temperaturas inferiores (22,5°C) (AZEVEDO e DUARTE, 2013). Segundo Meinershagen (1993) em temperaturas mais altas ocorre, rapidamente, a formação de mofo no material. Porém, segundo Ferreira et al. (2013), devido à fermentação do colostro estritamente anaeróbica, o pH é reduzido de maneira eficiente pela fermentação de bactérias ácido-lácticas e até mesmo pelas enterobactérias presentes nos primeiros dias, o que inibe o desenvolvimento de leveduras e bolores quando o pH atinge valores menores que 4,0 (ORNELAS et al., 2014). De acordo com Azevedo e Duarte (2013) o odor, a consistência e o pH são parâmetros que devem ser observados com atenção pois podem refletir as características físicas e microbiológicas da silagem de colostro.

A alteração de compostos nitrogenados apresenta bastante controvérsia em diversos experimentos, e geralmente, dependem das condições ambientais nas quais o colostro foi fermentado. A proteína bruta diminuiu ao longo da fermentação do colostro de acordo com Ferreira et al. (2013), passando de 18,5% do colostro *in natura*, para 11,99% no final de um período de 56 dias de fermentação.

Saafeld et al. (2012b), observaram valores de matéria seca (17,91 a 23,32%), proteína (6,36 a 14,45%) e gordura (2,7 a 4,9%), e constataram que após o processo de fermentação os nutrientes iniciais foram mantidos. Segundo Mbuthia et al. (1997), durante o armazenamento, as imunoglobulinas presentes no colostro parecem pouco alteradas, embora seu efeito imunológico ou como fonte proteica para nutrição de bezerros em aleitamento tenham sido pouco estudados.

A gordura parece ser a fração que menos sofre alterações durante o processo fermentativo. Segundo Robinson e Tamine (1999) a degradação de gorduras presente no leite é menos frequente devido à baixa concentração de lipases produzidas pelos micro-organismos. Ferreira et al. (2013) verificou pequeno efeito do tempo de armazenamento nas concentrações de gordura.

3.4 Influência da Temperatura Ambiente na Fermentação Anaeróbica do Colostro

Durante o processo de fermentação do colostro, podem ocorrer perdas em função da metodologia de coleta e armazenamento, fazendo-se necessária a

caracterização física e microbiológica do material fermentado (VIEGAS et al., 2009). Um dos fatores envolvidos no aumento da perda na produção da silagem de colostro é a alta temperatura média ambiental que afeta negativamente o processo fermentativo.

A produção da silagem de colostro quando realizada em regiões quentes produzem índices altos de putrefação do produto, sendo recomendável o armazenamento em ambiente fresco e com temperaturas abaixo de 25°C (FOLEY e OTTERBY, 1978). Segundo Meinershagen (1993) a temperatura ideal de armazenamento está entre 5 e 27°C, e em temperaturas mais altas pode ocorrer a decomposição de proteínas e alta taxa de acidez aceleradamente.

Segundo Jenny et al. (1977) quando a fermentação ocorre adequadamente em temperaturas médias de 25 a 27°C, raramente ocorre desenvolvimento de odores indesejáveis. No entanto, temperaturas superiores durante o armazenamento podem favorecer a putrefação do material. Estudos indicam que a fermentação no intervalo entre 32 a 39°C ocasionou a formação de odores pútridos após sete a 16 dias de armazenamento (MULLER e SYHRE, 1975; RINDSIG e BODOSH, 1977).

Segundo Ferreira et al. (2013), mesmo que a fermentação anaeróbia do colostro seja boa alternativa para o armazenamento do excedente de colostro, a temperatura com que o mesmo é armazenado durante o processo de fermentação influencia diretamente a velocidade e intensidade da degradação dos principais nutrientes, tais como a caseína e a lactose. Além disto, pode ocorrer o crescimento de micro-organismos indesejáveis, tornando seu uso inadequado como substituto do leite para bezerros leiteiros, particularmente quando a fermentação é realizada em climas quentes (AZEVEDO et al., 2014).

REFERÊNCIAS

ARGÜELLO, A. et al. Effects of refrigeration, freezing-thawing and pasteurization on IgG goat colostrums preservation. **Small Ruminant Research**, v. 48, p. 135–139, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(02\)00277-8](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(02)00277-8)

AZEVEDO, R. A.; DUARTE, E. R. Aspectos microbiológicos do colostro bovino em diferentes técnicas de conservação e armazenamento: uma revisão. **Revista Eletrônica de Pesquisa Animal**, v. 01, n. 02, p. 84-98, 2013. Disponível em:

<<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060614/061402.pdf>>. Acesso em: 01 dez. 2016.

AZEVEDO, R. A. et al. Silagem de Colostro: riscos microbiológicos e caracterização do pH em função do dia de coleta. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 36, n. 03, p. 271-276, 2014.

AZEVEDO, R. A. et al. Curva de pH e caracterização microbiológica de colostro bovino fermentado. In: ZOOTECA, Águas de Lindóia, 18, 2009. **Anais...**, Águas de Lindóia: 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 2, de 7 de janeiro de 2002**. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos 415 Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. Diário Oficial da União, Poder Executivo, de 9 de janeiro de 2002.

BRASIL. **Agronegócio deve ter crescimento de 2% em 2017**. 2016a. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2016/12/agronegocio-deve-ter-crescimento-de-2-em-2017>>. Acesso em: 10 jul 2017.

BRASIL. **Rebanho bovino alcança 215,2 milhões de cabeças em 2015**. 2016b. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2016/09/rebanho-bovino-alcanca-215-2-milhoes-de-cabecas-em-2015>>. Acesso em: 10 jul 2017.

CALDAS, F. Vitelo: opção de ganho na exploração leiteira. **Balde Branco**, n. 461, p. 36-40, 2003.

CAMPOS, O. F.; SILVA, A. G. Fontes alternativas de proteínas no sucedâneo de leite para bezerros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 10, n. 21, p. 1089-1099, 1986.

CARLSON, S. M. A.; MULLER, L. D. Compositional and metabolic evaluation of colostrum preserved by four methods during warm ambiente temperatures. **Journal**

of **Dairy Science**, v. 60, p. 566, 1977.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(77\)83903-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(77)83903-9)

CLAEISSON, M. J.; VAN SINDEREN, D.; O'TOOLE, P. W. The genus *Lactobacillus* a genomic basis for understanding its diversity. **FEMS Microbiology Letter**, v. 269, p. 22–28, 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6968.2006.00596.x/full>>. Acesso em: 08 nov. 2016.

COGAN, T. M.; ACCOLAS, J. P. Starter Cultures: Types, Metabolism and Bacteriophage. IN: ROBINSON, R. K. **Dairy Microbiology**. The Microbiology of Milk. 2 ed. USA: Elsevier Science Publishing, p.77-114, 1990.

CREMONESI, P. et al. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheeses. **Letter in Applied Microbiology**, v. 45, p. 586-591, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02231.x>

DANIELS, L. B., et al. Feeding naturally fermented, cultured, and direct acidified colostrum to dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 60, p. 992, 1977. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(77\)83976-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(77)83976-3)

DREVJANY, L. A.; IRVINE, O. R.; HOOPER, G. S. Attempt to improve storage life, palatability, uniformity and nutritive value of fermented colostrum and its utilization in raising replacement calves. Paper presented at the Annual Meeting of the Eastern Branch of the Can. Soc. Anita Science, pp.25–27, 1975.

FERREIRA, L. S., et al. Desempenho e parâmetros sanguíneos de bezerros leiteiros que receberam sucedâneo lácteo ou silagem de colostro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p. 1357-1366, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352013000500013>

FOLEY, J. A.; OTTERBY, D. E. Availability, storage, treatment, composition, and feeding value of surplus colostrum: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 63, p. 973–977, 1978. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(78\)83686-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(78)83686-8)

FOLEY, J. A.; OTTERBY, D. E. Performance of calves feed colostrum stored by freezing, fermentation or treatment with lactic or adipic acid. **Journal of Dairy Science**, v.62, p.459–467,1979. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(79\)83267-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(79)83267-1)

GARCIA, F., et al. Preservacion de calostro, I. Efecto de aditivos orgânicos. **Ciência e Investigação Agrária**, v. 8, n. 2. 1981.

GERASEEV, L. C., et al. O pH da silagem de colostro bovino em função do dia de coleta. In: XXII Reunião Latinoamericana de Produção Animal, Montevideo, 24 a 26 de Outubro de 2011. **Anais...**, Montevideo - Uruguai.

GODDEN, S. Microbial risks associated with feeding colostrum to calves. **Annu. Mtg. Southwest Nutrition and Management Conference**, Tempe, AZ., p. 26-27, 2009.

HENG, G. B. Chemical composition of bovine colostrum. Food for Health in the Pacific Rim. Trumball (Conn): **Food and Nutrition Press**, p.405, 1999.

HODGE, S.E.; JENNY, B.F. Performance of calves fed preserved colostrum with sodium bicarbonate added at feeding. **Journal of Dairy Science**, v.66 (supl. 1), p.256, 1983.

HUERTAS, R. A. P. Bacterias acido lácticas: papel funcional en los alimentos. **Facultad de Ciencias Agropecuarias**, v. 8, n. 1, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12.pdf>>. Acesso em: 16 fev 2017.

JENNY, B. F., et al. Microbial and acidity changes in colostrum fermented by natural flora at low and high ambient temperatures. **Journal of Dairy Science**. v. 60, n. 3, p. 453-457, 1977. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(77\)83887-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(77)83887-3)>. Acesso em: 31 mai. 2017.

KAISER, A. G. The use of colostrum preserved with formalin for rearing calves. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, p.17– 21, 1977. <https://doi.org/10.1071/EA9770221>

KANDLER, O.; WEISS, N. Genus *Lactobacillus*. IN: Regular, Nonsporing Gram Positive Rods. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: William & Wilkins. USA. v.2, cap. 14, p. 1208-1260. 1986

KAYLEGIAN, K. E., et al. Raw milk consumption beliefs and practices among new York state dairy producers. **Food Protection Trends**, v. 28, n. 3, p.184-191, 2008.

LUCCI, C.L. **Bovinos leiteiros jovens**. São Paulo: Ed Nobel, 371p., 1989.

MATOS, L.L. Saiba como aproveitar o excesso de colostro. **Balde Branco**, n.367, p.29-30, 1996.

MBUTHIA, E. W., et al. Effect of treatment with formaldehyde and formic acid on immunoglobulin content of stored bovine colostrum. **Animal Feed Science and Technology**, v. 67, n. 4, p. 291-298, 1997. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(97\)00013-8](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(97)00013-8)>. Acesso em: 16 mai. 2017.

MEINERSHAGEN, F. Raising Calves on Stored Colostrum. 1993. Disponível em: <http://extension.missouri.edu/p/G3555>. Acesso em: 21 fev. 2017.

MODESTO, E. C., et al. Desempenho produtivo de bezerros desmamados precocemente alimentados com diferentes dietas líquidas com utilização de promotor de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 1, p. 429-435, 2002. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982002000200018>

MULLER, L. D.; BEARDSLEY, G. L.; LUDENS, F. C. Amounts of sour colostrum for growth and health of calves. **Journal of Dairy Science**, v. 58, p. 1360, 1975. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(75\)84718-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(75)84718-7)

MULLER, L. D.; SYHRE, D. R. Influence of chemicals and bacterial cultures on preservation of colostrum. **Journal of Dairy Science**. v. 58, n. 6, p. 957-961, 1975. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(75\)84663-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(75)84663-7)>. Acesso em: 31 mai. 2017.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.ed. Washington, D.C.: Academic Press, 2001. 381p.

NEIVA, J. N. M., et al. Aproveitamento de machos de origem leiteira para produção de carne. V simpósio nacional de bovinocultura de leite, 2015. **Anais...** Disponível em: <<http://www.simleite.com/arquivosAnais/arquivo144>>. Acesso em: 10 jul 2017.

NEIVA, J. N. M.; RESTLE, J. Aproveitamento de machos de origem leiteira para produção de carne: Porque o Brasil não usa esta tecnologia com eficiência? **Revista Milk Point**, 2013. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/sistemas-de-producao/aproveitamento-de-machos-de-origem-leiteira-para-producao-de-carne-por-que-o-brasil-nao-usa-essa-tecnologia-com-eficiencia-85894n.aspx>>. Acesso em: 16 mai. 2017.

OLIVER, S. P.; JAYARAO, B. M.; ALMEIDA, R. A. Foodborne pathogens in milk and tue dairy farm environment: food safety and public health implications. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 2, n. 2, 115-119, 2005. <https://doi.org/10.1089/fpd.2005.2.115>

ORNELAS, L. T. C. et al. Dinâmica fermentativa e microbiológica da silagem de colostro e do leite de transição bovino em diferentes dias de coleta. XXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, Universidade Federal do Espírito Santo Vitória ES, **Anais...** 12 a 14 de maio de 2014.

PFEILER, E. A.; KLAENHAMMER, T. R. The genomics of lactic acid bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 15, p. 546-553, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.09.010>

PERFARM. **A importância do Agronegócio para o Brasil**. 2017. Disponível em: <<http://blog.perfarm.com/agronegocio-no-brasil/>>. Acesso em: 10 jul 2017.

REDONDO, M. C. **Avaliação in vitro de características probióticas do Enterococcus faecium CRL183 e do Lactobacillus helveticus ssp. jugurti** 416. 71p. Araraquara. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de

Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho. Araraquara, 2008.

RINDSIG, R. B.; BODOSH, G. W. Growth of calves fed colostrum naturally fermented, or preserved with propionic acid or formaldehyde. **Journal of Dairy Science**, v. 60, p. 185-191, 1977.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(77\)83831-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(77)83831-9)

ROBINSON, R. K; TAMINE, A. Y. Microbiology of fermented milks. In: ROBINSON, R.K. **Dairy microbiology**. Amsterdam: Elsevier, 199, p. 291-343.
<https://doi.org/10.1002/0471723959.ch8>

RODRIGUES, A. M. Colostro fermentado naturalmente, um alimento alternativo no aleitamento de vitelos. **ESACB**, p. 16-18, 2011.

SAALFELD, M. H.; GARCIA, J. P.; MACIEL, R. G. **Apostila do Curso de Gado Leiteiro do CETAC- EMATER-RS**, 150p, 2005.

SAALFELD, M. H. Uso da silagem de colostro como substituto do leite na alimentação de terneiras leiteiras. **A hora veterinária**, n. 162, p. 59-62, 2008.

SAALFELD, M. H., et al. Avaliação nutricional do colostro bovino e sua potencialidade como alimento de uso humano. IN: 4º SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR, 2012a. Gramado. **Anais...**, Gramado: FAURGs, 2012.

SAALFELD, M. H., et al. Silagem de colostro: alternativa sustentável para minimizar a fome no mundo. IN: 4º SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR, 2012b. Gramado. **Anais...**, Gramado: FAURGs, 2012.

SAALFELD, M. H., et al. Anaerobically fermented colostrum: an alternative for feeding calves. **Ciência Rural**, v. 43, p. 1636-1641, 2013.
<https://doi.org/10.1590/S0103-84782013000900016>

SIGNORETTI, R. D., et al. Utilização de farelo de gérmen de milho no concentrado inicial de bezerros de raças leiteiras em sistemas de desaleitamento precoce. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 24, n. 5, p. 841-851, 1995.

SWANNACK, K. **The feeding of stored colostrum to calves**. C. S. G. Grunsell and F. W. G. Hill, ed. Pages 10-12, In: The veterinary annual. 15th issue. Wright and Sons, Ltd., Bristol, United Kingdom. 1974.

VIEGAS, C. R., et al. Avaliação das perdas da silagem de colostro. In: ZOOTECA, Águas de Lindóia, 18, 2009. **Anais...**, Águas de Lindóia: 2009.

WOUNTERS, J. T. M., et al. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 91-109, 2002.
[https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00151-0](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00151-0)

WRAY, C.; CALLOW, R. J. Studies on the survival of Salmonella Dublin, S. Typhimurium and E. coli in stored bovine colostrum. **Veterinary Research**, v. 94, p. 407, 1974.
<https://doi.org/10.1136/vr.94.18.407>

CAPÍTULO 2

Colostrum silage has microbiological quality to replace milk for calves

Artigo a ser publicado no periódico

Ciência Animal Brasileira

COLOSTRUM SILAGE HAS MICROBIOLOGICAL QUALITY TO REPLACE MILK FOR CALVES.

Inês de Freitas GOMIDE¹, Renata de Freitas Ferreira MOHALLEM², Daise Aparecida ROSSI³, Arinaldo de OLIVEIRA⁴.

1. Professora do IFTM – Campus Uberlândia, Doutoranda em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia – UFU. Uberlândia – MG. inesgomide@iftm.edu.br

2. Doutoranda em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia – UFU. Uberlândia – MG.

3. Professora, Doutora, LABIO- FAMEV – UFU.

4. Professor do IFTM – Campus Uberlândia, Mestre em Matemática – Probabilidade e Estatística.

ABSTRACT: This study aimed to verify the microbiological suitability of silage produced colostrum for feeding calves from the second week of life. For the production of silage, colostrum obtained from 1 to 5 days postpartum was used on a farm in the city of Uberlândia/MG. Colostrum was immediately stored in plastic bottles with 237 ml capacity, previously sanitized. After 30 days of fermentation at room temperature and shaded area, 75 samples of silages were harvested for quantitation of total coliforms, heterotrophic mesophilic bacteria, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and enterobacteria. For data analysis we used the nonparametric Kruskal- Wallis and later the comparison average posts test, with 95% of significance level. From the produced silages, 23/75 (30.7%) did not properly fermented for they presented putrid odor, reddish or brown color and gas production. It was observed only one difference ($p < 0.05$) in silages produced from fresh colostrum collected on different postpartum days, to the counts of mesophilic bacteria and total coliforms. The scores of all micro- organisms were within acceptable scores for consumption of calves , except for total coliform numbers in which 07/75 (9.3%) were above the recommended count (up to $1,0 \times 10^4$ CFU.ml⁻¹). The collection day of colostrum did not alter the microbiological quality of silage, which showed appropriate parameters for your offer as milk replacer for calves.

KEY - WORDS: Coliforms, milk replacer, *Escherichia coli*, fermentation, storage, mesophilic bacteria.

SILAGEM DE COLOSTRO POSSUI QUALIDADE MICROBIOLÓGICA PARA SUBSTITUIR O LEITE PARA BEZERROS

RESUMO: Objetivou-se verificar a adequação microbiológica de silagem de colostro produzida para alimentação de bezerros a partir da segunda semana de vida. Para a produção da silagem, foi utilizado o colostro obtido de 1 a 5 dias pós-parto em uma propriedade rural no Município de Uberlândia/MG. O colostro foi imediatamente armazenado em garrafas *pet* com capacidade de 237 mL, previamente higienizadas. Após 30 dias de fermentação em temperatura ambiente e local protegido da luz, amostras de 75 silagens foram colhidas para quantificação de coliformes totais, bactérias heterotróficas mesófilas, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e enterobactérias. Para análise dos dados utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e posteriormente, teste de comparação de postos médios, com significância de 95%. Das silagens produzidas, 23/75 (30,7%) não fermentaram

adequadamente por apresentaram odor pútrido, coloração avermelhada ou marrom e produção de gás. Só foi observada diferença ($p < 0,05$) entre silagens produzidas a partir do colostro fresco coletado em diferentes dias de pós-parto, para as contagens de bactérias mesófilas e coliformes totais. As contagens de todos os micro-organismos encontravam-se dentro dos aceitáveis para o consumo de bezerros, com exceção dos números de coliformes totais, em que 07/75 (9,3%) apresentaram contagem acima do recomendado (até $1,0 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹). O dia de coleta do colostro não alterou a qualidade microbiológica da silagem, que apresentou parâmetros adequados para sua oferta como sucedâneo do leite para bezerros.

PALAVRAS – CHAVE: Coliformes, sucedâneo do leite, *Escherichia coli*, fermentação, armazenamento, bactérias mesófilas.

INTRODUCTION

According to Neiva and Restle ⁽¹⁾ in 2011, 23.5 million cows were milked in Brazil. Considering that 50 % of the calves of these cows are male, with 90% survival rate, it is estimated that approximately 10 million dairy calves would be available for the production of meat during the year, providing additional income to farmers. However, it is known that part of the flock is disposed, which is driven by the cost of these animals to the milk producer. The use of milk replacers and feeding for maintenance of these calves increase the costs of the production system and therefore are preferably intended for creation of female calves, future dairy cows of the property. However, according to Thaler Neto ⁽²⁾ the crossbred calves have some advantage in health terms in its initial development and growth similar to the pure Holsteins, and, unlike what happens in Brazil, in developed countries 100% of dairy calves are intended for meat production and not to discard ⁽¹⁾. Thus, it is feasible to consider using the excess of colostrums produced in the property as milk substituent in the feeding of dairy calves from the second week of life, reducing production costs and making this system an additional source of income for the milk producer.

Colostrum is used improperly by most of dairy farmers, not being allowed its use in adequate quantity and frequency to calves. Its surplus is usually discarded demonstrating ignorance by producers in the use of a nutritionally rich food, subject to conservation and storage. One of the techniques developed for the storage of the feed is anaerobic fermentation of silage called colostrum silage, which aims to store large volumes preserving their nutritional value ⁽³⁾.

On the other hand, according to Godden ⁽⁴⁾, colostrum's may represent one of the first opportunities for exposure of calves to infectious agents. The time between milking and the offer of this replacer to calves can allow the multiplication of spoilage and present

pathogens, preventing their use in feed for calves ⁽⁵⁾. The aim of this study was to analyze microbiologically silage of colostrum produced in rural property in the Municipality of Uberlândia/MG and verify its microbiological biosafety for the consumption of calves from the second week of life.

MATERIAL AND METHODS

Colostrum was obtained from the manual milking of 20 crossbred dairy cows in a farm located in the Municipality of Uberlândia/MG. In clinical evaluation, the females used in the project were in satisfactory health and reproductive conditions and were kept in semi-confinement regime, supplemented with corn silage, soybean meal, soybean peel, mineral salt and commercial feed. Females had access to grazing *Brachiaria decumbens*, water and mineral salt *ad libitum*. Milking was performed on an environment provided with thermal comfort, respecting animal welfare standards.

Before the trial, those responsible for milking the property were trained to carry out the collection, packaging and storage of colostrum for the purpose of production of silage. Therefore, the surplus colostrum of the first milking of the day, between the 1st and 5th day after delivery, was collected in containers cleaned with detergent and boiling water, according to the methodology proposed by Saalfeld ⁽⁶⁾ and placed in pet bottles of 237 mL. At the time of packaging, colostrum was made available to the edge of the plastic bottle, and, after light pressure to remove the oxygen, was sealed. The bottles were labeled with the date of collection and number of days after birth and stored in the dark at room temperature for 30 days. There was no control of temperature and humidity.

Seventy five (75) silages colostrum were analyzed, where 13 were obtained from the colostrum produced in the 1st day after delivery (T1), 15 Day 2 (T2), 18 day 3 (T3), 16 Day 4 (T4) and 13 silages from colostrum from the 5th day after delivery (T5). The analyses were performed on Applied Biotechnology Animal Laboratory at the Faculty of Veterinary Medicine of the Federal University of Uberlândia., total coliforms were quantified, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, heterotrophic mesophilic bacteria and enterobacteria.

For the counting of mesophilic aerobic bacteria, enterobacteria and *Staphylococcus aureus*, chromogenic media were used disposed in AC Petrifilm, Petrifilm STX and EB Petrifilm (3M) dewatered boards, respectively. For determination of total coliforms and *Escherichia coli*, was adopted the Compact Dry EC technique (Dupont Qualicon). The

procedures were performed according to the manufacturer. The methods have their use authorized by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply - MAPA ⁽⁷⁾.

The design for the analysis of the data was completely randomized (DIC), using the evaluation, the nonparametric Kruskal- Wallis, and later, the comparison test medium posts. The significance level was 95 %.

This study was submitted for review by the Ethics Committee on Animal Use - CEUA the Federal University of Uberlândia, protocol 071/15.

RESULTS AND DISCUSSION

Similar to that observed by Viegas et al. ⁽⁸⁾, which found 40 % of losses in silage of colostrum, in this study, 23/75 (30.7%) samples were considered inadequate for presented brown or reddish color, putrid odor and gas production. These characteristics are undesirable and result in rejection of food by animals. Both, in our samples as in Viegas et al. ⁽⁸⁾ we could not determine the cause of poor fermentation because the assessed microbial populations were at acceptable levels.

In the fermentation process there is transformation of lactose into lactic acid, promoting the decrease in pH, contributing to the conservation of colostrum inhibiting the growth of undesirable microorganisms. These bacteria are divided into two groups, the mesophilic that have great growth between 20°C to 30°C, and thermophilic between 30°C to 45°C ⁽⁹⁾, the latter being the likely bacteria responsible for fermentation of colostrum in the Brazilian conditions.

According to Ferreira ⁽¹⁰⁾ the group of microorganisms that has the highest development in the early days of ensiling is the colostrum of lactic acid bacteria (LAB), which are responsible for fermentation and considered desirable to the preservation process. However, other factors may interfere with the presence and multiplication of LAB, resulting in inadequate fermentation and loss of quality. Sanitary conditions in getting colostrum and storage are, according to Viegas et al. ⁽⁸⁾, situations, which may interfere with future fermentation.

Only counts of mesophilic bacteria and total coliforms (Tables 1 and 2) obtained from 75 silages showed differences ($p < 0.05$) when compared to colostrum obtained from one to five days after delivery. McGuirk and Collins ⁽¹¹⁾ recommend that fresh colostrum should have mesophilic bacteria counts lower than 1.0×10^{-5} CFU.mL⁻¹.

TABLE 1. Heterotrophic bacteria in mesophilic colostrum silage.

Mesophilic bacteria CFU.mL ⁻¹	T1 n=13	T2 n=15	T3 n=18	T4 n=16	T5 n=13
< 100	01	03	05	03	04
100-2.000	03	07	06	07	05
2.001-5.000	02	02	01	03	02
5.001-7.000	-	-	01	01	-
7.001-10.000	01	01	01	02	02
10.000-20.000	06	02	04	-	-
Overall average	8,7 x 10 ^{3a}	3,3 x 10 ^{3ab}	4,2 x 10 ^{3ab}	2,8 x 10 ^{3ab}	1,9 x 10 ^{3b}

T1 to T5 = silage of colostrum produced from post partum colostrum of day 1 to day 5, respectively. Different letters in the same row were statistically different ($P \leq 0.05$).

Colostrum is sterile when excreted in the alveoli of the mammary gland, but after passing the milk ducts suffers contamination and can be a source of pathogens for the calf⁽¹²⁾. During and after milking, hygiene factors such as the mammary gland, milking management, improper storage or equipment used for feeding the calves are the main sources of contamination^(4,11,12).

It is likely that most mesophilic bacteria counts observed in colostrum obtained on the first postnatal day and lower on the fifth day ($p < 0.05$) is due to the fact that cows remain semi-confined only after delivery and the period before in grazing, which favors a greater microbial contamination of the udder. Despite the significant difference, the higher average mesophilic count observed on the first day postpartum is probably not sufficient to cause gastrointestinal disturbances in calves, since most of the samples were within the acceptable standards for fresh colostrum which is 1.0×10^5 CFU.mL⁻¹ ⁽¹¹⁾.

To ensure the microbiological safety of consumption for calves, milk should have total coliform count less than 1.0×10^4 CFU.mL⁻¹ ⁽¹¹⁾. Among the 75 analyzed colostrum silages, 68/75 (90.7 %) had scores in this group of suitable microorganisms.

TABLE 2. Total coliforms in silage of colostrum.

Total Coliforms CFU.mL ⁻¹	T1 n=13	T2 n=15	T3 n=18	T4 n=16	T5 n=13
< 100	01	06	06	10	08
100-2.000	07	05	08	03	04
2.001-5.000	02	02	02	02	-
5.001-7.000	-	-	-	-	01
7.001-10.000	-	-	01	-	-
10.000-20.000	03	02	01	01	-
Overall average	4,5 x 10 ^{-3a}	2,9 x 10 ^{-3ab}	1,8 x 10 ^{-3ab}	1,5 x 10 ^{-3b}	5,2 x 10 ^{-2b}

T1 to T5 = silage of colostrum produced from post partum colostrum of day 1 to day 5, respectively. Different letters in the same row were statistically different ($P \leq 0.05$).

The average total coliform counts in the silage from cow colostrum on the first day postpartum was higher ($p < 0.05$) than those of other periods. Nevertheless, the majority of the counts of the samples 90.7 % (68/75) were within the standard recommended by McGuirk and Collins ⁽¹¹⁾, likely due to growth inhibition by acidic pH ⁽¹³⁾. In addition, lactic acid bacteria have the ability to produce antimicrobial compounds known as bacteriocins and other inhibitory substances such as hydrogen peroxide, diacetyl, oxygen metabolites, among others, which may have aided in the growth control of coliform bacteria ⁽¹⁴⁾.

Among the 75 analyzed samples, 7/75 (9.3%) had total coliform count exceeding the recommended by McGuirk and Collins ⁽¹¹⁾, a maximum of 1.0×10^4 CFU.mL⁻¹.

The microflora present in colostrum and other dairy products is variable and depends on the pre and post milking care ⁽¹⁰⁾. Thus, while the colostrum naturally presents a number of microorganisms, care with hygiene is essential to avoid problems during fermentation. According to Stewart et al. ⁽¹²⁾ the bacteria present in colostrum may be responsible for most cases of sepsis or diarrhea in calves during the first weeks of life. This reinforces the importance of fermentation to ensure the safety of colostrum given to calves.

There was no difference between the *Escherichia coli* counts, *Staphylococcus aureus* and enterobacteria ($p > 0.05$) in silages colostrum from cows milked after 1-5 days

postpartum. Of the total samples analyzed 65/75 (87 %) had counts less than 1.0×10^2 CFU.mL⁻¹ of *E. coli*; 53/75 (70.7%) counts less than 1.0×10^3 CFU.mL⁻¹ of *Staphylococcus aureus*. About enterobacteria, 49/75 (65.3%) lower counts than 1.0×10^2 CFU.mL⁻¹, which are below the limit of 1.0×10^6 CFU.mL⁻¹ of bacterial contamination recommended by Godden ⁽¹⁵⁾. According to Peres ⁽¹⁶⁾, the *E. coli* contamination present in fresh colostrum is around 2×10^4 CFU/mL⁻¹, and this count doubled every 20 minutes in warm colostrum, at room temperature for two hours, the count of the bacteria may reach 1.2 million bacteria.

Saalfeld ⁽¹⁷⁾ evaluated the silage of colostrum and noted the presence of microorganisms such as *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus* spp. , *E. coli*, *Klebsiella* spp. and *Bacillus* spp. in samples fermented for 14 days, however, after 21 days of fermentation, it was identified only bacteria of the genus *Lactobacillus* spp. The same was demonstrated in the work of Ferreira ⁽¹⁰⁾, which noted strong growth of microorganisms in the first 14 days of anaerobic fermentation of colostrum but after 21 days of storage it wasn't found the presence of enterobacteria. Similar results confirm the reported above as the Enterobacteriaceae, especially *Escherichia coli*, which does not survive in an environment with a pH below 4.0, causing the count to negligible values ⁽¹⁸⁾.

CONCLUSION

Microbiological analyzes in colostrum silages fermented for 30 days demonstrated that this food has microbiological characteristics that allow security in its use as a milk replacer for calves after the second week of life.

REFERENCES

1. NEIVA, J.N.M.; RESTLE, J. Aproveitamento de macho de origem leiteira para produção de carne: Porque o Brasil não usa esta tecnologia com eficiência? 2013 Oct 8 [cited 2016 April 11]. Available from: <http://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/sistemas-de-producao/aproveitamento-de-machos-de-origem-leiteira-para-producao-de-carne-por-que-o-brasil-nao-usa-essa-tecnologia-com-eficiencia-85894n.aspx>. Portuguese.
2. THALER NETO, A. Cruzamento entre Holandes e Jersey – III – Desenvolvimento de bezerras e novilhas. 2013 March 1 [cited 2016 April 11]. Available from: http://www.milkpoint.com.br/mypoint/213816/p_cruzamento_entre_holandes_e_jersey_iii_de_senvolvimento_de_bezerras_e_novilhas_cruzamento_holandes_jersey_desenvolvimento_5057.aspx. Portuguese.
3. MATOS, L.L. Saiba como aproveitar o excesso de colostro. Balde Branco, 1996; (367):29-30. Portuguese.
4. GODDEN, S. Microbial risks associated with feeding colostrum to calves. Annu. Mtg. Southwest Nutrition and Management Conference, Tempe, AZ. 2009; 26-27.

5. SAALFELD, M.H.; GARCIA, J.P. MACIEL, R.G. Apostila do Curso de Gado Leiteiro do CETAC- EMATER-RS. 2005. 150p. Portuguese.
6. SAALFELD, M.H. Uso da silagem de colostro como substituto do leite na alimentação de terneiras leiteiras. A hora veterinária. 2008; (162): 59-62. Portuguese.
7. BRASIL. Instrução Normativa 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 14 dez. 2006, p. 08, Seção 1. Portuguese.
8. VIEGAS, C. R.; AZEVEDO, R. A., ALMEIDA, P.N.M.; DUARTE, R.D.; GERASEEV, L.C.; RIBEIRO JR, C.S. Avaliação das perdas da silagem de colostro. In: ZOOTECA, Águas de Lindóia, 18, 2009. Anais..., Águas de Lindóia: 2009 [cited 2016 April 11]. Available from: <http://www.abz.org.br/publicacoes-tecnicas/anais-zootec/artigos-cientificos/tecnologia-produtos-origem-animal/19511-Avaliao-das-perdas-silagem-colostro.html>. Portuguese.
9. WOUTERS, J.T.M.; AYAD, E.H.E; HUGENHOLTZ, J.; SMIT, G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. International Dairy Journal. 2002; (12): 91-109.
10. FERREIRA, L. S. Silagem de Colostro: caracterização do perfil de fermentação anaeróbia e desempenho de bezerros leiteiros. 2011.116 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) – Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2011. Portuguese.
11. MCGUIRK, S.M.; COLLINS, M. Managing the production, storage and delivery of colostrum. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. 2004; 20(3):593-603.
12. STEWART, S; GODDEN, S.; BEY, R.; RAPNICKI, P.; FETROW, J.; FARNSWORTH, R.; SCANLON, M.; ARNOLD, Y.; CLOW, L. MULLER, K; FERROUILLET, C. Preventing bacterial contamination and proliferation during the harvest, storage, and feeding of fresh bovine colostrum. Journal of Dairy Science. 2005; (88): 2571-2578.
13. BURITI, F. C. A.; SAAD, S.M.I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 2007 [cited 2016 April 11], (57): 373-380. Available from: <http://www.scielo.org.ve/pdf/alan/v57n4/art10.pdf>. Portuguese.
14. COSTA, G.N.; SUGUIMOTO, H.H.; MIGLIORANZA, L.H.S.; GÓMEZ, R.J.H.C. Atividade Antimicrobiana de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* frente a micro-organismos patogênicos “in vitro”. Semina: Ciências Agrárias. 2012, 33(5): 1839-1846. Portuguese.
15. GODDEN, S. Colostrum management for dairy calves. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. 2008; 24(1): 19-39.
16. PERES, J.P. Seu colostro é um soro de saúde ou uma sopa de bactérias? 2013 March 21 [cited 2016 April 11]. Available from: <http://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/medicina-da-producao/seu-colostro-e-um-soro-de-saude-ou-uma-sopa-de-bacterias-16717n.aspx> . Portuguese.
17. SAALFELD, M.H. Silagem de colostro bovino: propriedades e potencialidades de usos. 2013. 97 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013. Portuguese.
18. FOLEY, J.A.; OTTERBY, D.E. Availability, storage, treatment, composition, and feeding value of surplus colostrum: a review. Journal of Dairy Science. 1978; 61: 1033-1060.

CAPÍTULO 3

Efeitos da temperatura ambiente na fermentação anaeróbica do colostro bovino no município de Uberlândia/MG

Artigo a ser publicado no periódico
Ciência Rural

**Efeitos da temperatura ambiente na fermentação anaeróbica do colostro bovino no
município de Uberlândia /MG**

**Effects of environmental temperature on anaerobic fermentation of bovine colostrum in
Uberlândia /MG**

**Inês de Freitas Gomide^{I*}, Jéssica Laura Miranda Peixoto^{II}, Arinaldo de Oliveira^I,
Alessandra Aparecida Medeiros – Ronchi^{II}, Mara Regina Bueno de Mattos
Nascimento^{II}.**

I Instituto Federal do Triângulo Mineiro (IFTM) – Campus Uberlândia. Fazenda Sobradinho
s/nº - Cx. Postal: 1020 - Bairro: Zona Rural - CEP: 38400-970 - Uberlândia/MG, Brasil. E-
mail: inesgomide@iftm.edu.br. *Autor correspondente.

II Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV), Universidade Federal de Uberlândia,
Uberlândia/MG.

RESUMO: Determinou-se a influência da temperatura ambiente (TA) no índice de perda de colostro durante processo fermentativo anaeróbio, o impacto da TA na temperatura superficial da embalagem (TSE), o efeito da amplitude térmica diária no processo fermentativo e se apresentam TSE diferentes. O colostro foi obtido de seis vacas leiteiras mestiças em três períodos experimentais. Cada coleta foi fracionada em nove amostras acondicionadas em garrafas pet durante 7, 14 e 28 dias de fermentação. Diariamente a TA no local de armazenamento das garrafas pet foi registrada, assim como a TSE de cada garrafa individualmente. Observou-se que para cada 1°C de aumento na TA, ocorreu em média um aumento de 0,56°C na TSE. Não houve diferença entre as TA dos períodos experimentais e 46,4% (43/108) das amostras se enquadraram em fermentação inadequada. O maior índice de putrefação (67,3%) foi no último período experimental que não apresentou a maior média de

TA. A amplitude térmica diária afetou negativamente o processo fermentativo durante o terceiro período experimental, no qual houve o maior número de amostras com putrefação. Não foi observado diferenças significativas na temperatura superficial da embalagem quando comparados os processos fermentativos adequados e inadequados. Conclui-se que a TA afetou o processo fermentativo da silagem de colostro, pois períodos com temperatura ambiente média mais elevada, provocaram maiores índices de putrefação de amostras. A aferição da TSE não demonstrou ser um parâmetro confiável para evidenciar antecipadamente processos fermentativos inadequados.

Palavras-Chave: sucedâneo, anaerobiose, efeito climático, leite de transição.

ABSTRACT: The objective of this study was to determine the impact of ambient temperature (TA) on the loss of colostrum during anaerobic fermentation process, the impact of TA on the external temperature of the colostrum (TSE), and verify if the TSE is different between appropriate fermentation processes and inadequate processes. Colostrum was obtained from 6 crossbred dairy cows from April 2 to August 3, 2016, divided into three experimental periods. Each collection was fractionated in nine (9) samples conditioned in pet bottles that were evaluated after 7, 14 and 28 days of fermentation. The ambient temperature affected the fermentative process of colostrum silage, demonstrating that for each 1°C of increase in TA, an increase of 0.56 °C in the TSE occurs on average. There was no difference between the TA of the experimental periods and 46.4% (43/108) of the samples were included in inadequate fermentation. The highest putrefaction index (67.3%) was in the last experimental period, which did not present the highest mean of TA. No significant differences were observed in the external temperature of the colostrum in a suitable fermentation process when compared with samples that presented inadequacies.

Key words: Substitute, anaerobic, climatic effect, transition milk

INTRODUÇÃO

O colostro e leite de transição são ótimas opções para substituir o leite na alimentação de bezerros e, geralmente, o volume produzido diariamente na propriedade é superior ao necessário. Isso torna a conservação e armazenamento deste alimento uma ferramenta importante para sua utilização por períodos prolongados. Além disto, o leite não comercializável (colostro e leite de transição) quando utilizados para aleitamento das bezerras, é um importante recurso para redução de custos na bovinocultura de leite.

Os meios de conservação ideais, refrigeração ou congelamento, nem sempre estão disponíveis na propriedade pela indisponibilidade do equipamento, custo e instabilidade da rede elétrica na zona rural. Neste sentido a fermentação do colostro e leite de transição excedente tem despertado interesse, pois constitui uma forma mais econômica de armazenamento de grandes volumes (MODESTO et al., 2002, SAALFELD, 2008), que além do baixo custo e viabilidade, também possui boas características nutricionais.

Um estudo sobre o desempenho de bezerros alimentados com colostro fermentado demonstrou que estes apresentaram taxa de crescimento constante e semelhante aos do que consomem exclusivamente leite integral (MÂNCIO et al., 2005). O trabalho de AZEVEDO et al. (2014) demonstrou que a silagem de leite de transição misturada com leite proporcionou resultados semelhantes ao dos que consumiram apenas leite integral quando compararam o tamanho absoluto e relativo dos órgãos internos. CASTRO et al. (2004) trabalhando com a silagem de colostro associado com zeranol e óleo de soja no desenvolvimento de bezerros machos concluíram que o colostro fermentado obteve melhores resultados comparado ao uso do leite integral e semelhantes ao do zeranol em relação ao peso corporal, ganho de peso e ingestão de matéria seca.

O método de fermentação anaeróbica é simples e não exige investimentos em equipamentos, porém resulta em um produto nutricionalmente variável, que no colostro e leite

de transição *in natura* variam de acordo com a raça do animal, alimentação e condições de pré e pós-parto (FOLEY e OTTERBY, 1978).

A higiene no momento da coleta e condições de armazenamento do produto durante o processo de fermentação anaeróbia também são fatores importantes na qualidade da silagem de colostro (SAALFELD, 2013). Vários fatores podem ser responsáveis pela perda na produção da silagem de colostro, dentre eles a alta temperatura ambiente (FERREIRA et al., 2013), característica de várias regiões brasileiras, dentre elas o Triângulo Mineiro, onde está situado o município de Uberlândia.

Considerando que o baixo custo de produção e a facilidade de confecção da silagem de colostro o torna uma opção viável para incremento da nutrição de bezerros para os pequenos produtores rurais os objetivos neste estudo foram observar o impacto da temperatura ambiente (TA) e da amplitude térmica (AT) diária no índice de perda de colostro durante processo fermentativo anaeróbio. Outros propósitos deste estudo foram determinar o impacto da temperatura ambiente na temperatura superficial da embalagem (TSE) durante o processo fermentativo e verificar se através da medição da TSE pode-se determinar quais amostras de colostro não apresentarão fermentação adequada.

MATERIAL E MÉTODOS

O colostro utilizado para a produção da silagem foi obtido de 6 vacas leiteiras mestiças, híginas ao exame clínico e sem histórico de mastite, pertencentes ao rebanho do setor de Bovinocultura Leiteira da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). O grau de sangue dos animais utilizados é variável sendo que a vaca 3016 é $\frac{1}{2}$ sangue holandês (HO) x pardo suíço (SUI), 1026 e 1076 são $\frac{1}{2}$ HO x Jersey (JER), 3023 é $\frac{7}{8}$ HO x gir leiteiro, 2013 $\frac{1}{2}$ JER x SUI e 1106 $\frac{1}{2}$ HO x SUI. Quanto ao manejo nutricional o rebanho no período chuvoso foi mantido em pastagem de *Brachiaria decumbens* cv. Basilik com suplementação

de contrado na quantidade de 2,5 kg/animal/dia. Na estação seca do ano foram confinados em piquetes e receberam silagem de milho acrescido de suplementação concentrada de 2,5 kg/animal/dia na forma de dieta total.

As coletas de colostro foram realizadas de abril a agosto de 2016, divididos em três períodos experimentais: 02/04 a 05/05 (1º. Período), 01 a 29/06 (2º. Período) e 04/07 a 03/08 (3º. Período). Foram coletados 5 litros/dia/vaca de colostro, no terceiro e quarto dias pós-parto. A obtenção do colostro foi realizada por ordenha manual, após *pré-dipping*, e este envasado em vasilhame plástico higienizado com detergente neutro e água quente.

Após a coleta o colostro foi transportado até o Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada (LABIO) da UFU em temperatura ambiente, fracionado em nove amostras acondicionadas em garrafas pet de 237 mL (SAALFELD, 2008), que foram submetidas à fermentação anaeróbica em triplicata. As amostras foram armazenadas em uma sala, sem controle de temperatura e umidade relativa do ar e protegidos da luz. A temperatura ambiente do local de armazenamento das amostras foi determinada a cada hora utilizando-se equipamento Temperature and Humidity 404A Data Logger Homis®. A temperatura superficial da embalagem (TSE) em fermentação anaeróbica foi mensurada diariamente, às 11:00 com termômetro de infravermelho UT300A da marca Contemp® a uma distância de 10 cm de cada garrafa pet.

Após 7, 14 e 28 dias de armazenamento as amostras foram avaliadas visualmente, no momento da aferição diária da temperatura externa de fermentação. Neste trabalho assim como no de VIEGAS et al. (2009) algumas amostras apresentaram as características de acúmulo de gás com tensão na parede da garrafa pet, tonalidade escura do colostro e ausência da separação entre sólidos (gordura e proteína) e líquido (soro), diferente do padrão proposto por SAALFELD (2008), e, portanto, foram consideradas inadequadas quanto ao processo de fermentação.

Para avaliar a influência da TA sobre TSE, a influência da amplitude térmica diária no índice de perdas de colostro em processo fermentativo anaeróbico, normalidade TA e TSE e normalidade TSEA e TSEI foram utilizados os testes de Anderson – Darling, Kolmogorov – Smirnov, Shapiro – Wilk e Ryan – Joiner. Na avaliação da influência TA sobre TSE utilizou-se modelo de regressão linear simples e na avaliação da normalidade TA e TSE modelo de regressão linear simples para TSE em função da TA. Para avaliação da AT foi utilizado o teste t de Student para amostras independentes com 95% de confiabilidade.

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Uso Animal - CEUA, da Universidade Federal de Uberlândia, protocolo 071/15.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando todo o período experimental, 46,4% (43/108) das amostras de silagem colostro não apresentaram características de bom processo fermentativo, por apresentarem acúmulo de gás e tonalidade escura, e foram consideradas inadequadas por não se enquadrarem no padrão proposto por SAALFELD (2008). Resultado semelhante foi obtido por VIEGAS et al. (2009) que verificaram 40,1% de perda.

A média da temperatura ambiente não diferiu ($p > 0,05$) entre os períodos experimentais (Tabela 1) e as maiores perdas foram observadas no 3º período experimental (67,3%).

A produção da silagem de colostro quando realizada em regiões quentes produzem índices altos de putrefação do produto, sendo recomendável o armazenamento em ambiente fresco e com temperaturas abaixo de 25°C (FOLEY & OTTERBY, 1978). Segundo MEINERSHAGEN (1993), a temperatura ideal de armazenamento está entre 5 e 27°C, e em temperaturas mais altas pode ocorrer a decomposição de proteínas e alta taxa de acidez

aceleradamente. Porém, no presente estudo, com temperaturas médias abaixo de 23,32°C houve perda de 67,3% de perda das amostras em um dos períodos analisados.

Segundo JENNY et al. (1977), quando a fermentação ocorre adequadamente em temperaturas médias de 25 a 27 °C, raramente ocorre desenvolvimento de odores indesejáveis. No entanto, temperaturas superiores durante o armazenamento podem favorecer a putrefação do material. Estudos indicam que a fermentação 32 a 39°C ocasionou a formação de odores pútridos após sete a 16 dias de armazenamento (MULLER e SYHRE, 1975; RINDISIG e BODOSH, 1977).

Neste trabalho 46,4% das amostras se enquadraram em fermentação inadequada e o maior índice de putrefação (67,3%) foi no último período experimental que não apresentou a maior média de TA. Estes resultados demonstram que a TA não é o único fator que promove a inadequação do processo fermentativo, deve-se pesquisar, portanto, outros fatores que podem interferir na fermentação, tais como as condições sanitárias do animal que fornece o colostro, a higiene no momento da obtenção, manuseio e envase da matéria prima e a caracterização microbiológica de todo o processo.

De acordo com RAIMONDO et al. (2009), as características celulares e microbiológicas da glândula mamária durante a fase colostrar podem influenciar na contaminação microbiana do material. É importante ressaltar que a presença desses micro-organismos poderia ser justificada também por possíveis contaminações durante o procedimento de coleta ou por contaminação da própria glândula mamária. Por isso, deve-se evitar utilizar colostro proveniente de animais com histórico de mastite e promover ordenha em condições higiênicas para a produção da silagem (AZEVEDO et al., 2014).

Com a intenção de verificar o impacto da TA neste processo, comparou-se a TA aferida às 11:00 am com a TSE no mesmo horário, pela avaliação individual das amostras

(Figura 1). A matriz de correlação de Pearson indicou uma forte correlação positiva ($r=0,7039$), demonstrando que quando a TA aumenta ocorre um aumento da TSE.

Este modelo demonstrou que para cada 1°C de aumento na TA, ocorre em média um aumento de 0,56°C na TSE, o que significa que 49,54% da variação na TSE é explicada pela variação da TA. Neste trabalho a TA esteve entre 3 e 5°C superior a TSE. Resultado semelhante foi observado por FERREIRA et al. (2013) com armazenamento de colostro em ambiente controlado e aferição da temperatura do colostro no momento da abertura da garrafa. Sua pesquisa demonstrou que a TA tem maior impacto sobre a temperatura do colostro quando comparado ao próprio processo fermentativo.

A fermentação em temperatura mais elevada favorece a putrefação do material, sendo indicado o uso de preservantes como os ácidos acético, propiônico e fórmico ou ainda o formaldeído (MEINERSHAGEN, 1993). Outra forma possível de contornar este problema é elevar o número de bactérias lácticas no início do armazenamento. Esses micro-organismos promovem rápida produção de ácido láctico e a acidificação, competem por nutrientes, além de retardarem o crescimento de micro-organismos indesejáveis nos primeiros dias da fermentação, podendo assim reduzir drasticamente o crescimento de bactérias proteolíticas (PALMER e MUDD, 1972).

Em relação à amplitude térmica (AT) não houve diferença entre o primeiro e segundo períodos experimentais, mas ao compará-la com o terceiro período experimental diferenças foram observadas ($p\text{-valor} < 0,05$). Ao correlacionar estes resultados com o índice de perda da silagem de colostro, observou-se que este foi maior no terceiro período experimental, sugerindo que estas amostras de colostro em processo fermentativo sofreram os maiores efeitos da amplitude térmica diária.

Uma vez verificado o impacto da TA na TSE procurou-se determinar se existe diferença entre a TSE de amostras que apresentaram fermentação adequada e daquelas que

apresentaram inadequação no processo fermentativo e se esta aferição auxilia na determinação antecipada de amostras que com fermentação inadequada. Para tanto a temperatura superficial da embalagem de amostras adequadas (TSEA) foi comparada com a de amostras que apresentaram inadequação no processo fermentativo (TSEI). Os resultados demonstraram que TSEA e TSEI são estatisticamente iguais ($p\text{-valor} = 0,0593$), e, portanto, sua aferição não pode ser utilizada como parâmetro para identificar alterações no processo fermentativo.

CONCLUSÃO

A média da temperatura ambiente e a amplitude térmica diária prejudicaram o processo de fermentação da silagem de colostro nas condições apresentadas neste trabalho e tem efeito significativo sobre a temperatura superficial da embalagem. A aferição da temperatura superficial da embalagem não é um método confiável na determinação do índice de perdas do processo fermentativo anaeróbica do colostro.

REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, R.A. et al. Desenvolvimento de bezerros leiteiros alimentados com silagem de leite de transição. II - Órgãos internos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, p.505-509, 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v66n2/26.pdf>> Acesso em: 31 mai. 2008. doi: 10.1590/1678-41626624
- CASTRO, A.L.M. et al. Desempenho e rendimento de carcaça de bezerros alimentados com colostro fermentado, associado ao óleo de soja e zeranol. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p.193-201, 2004. Disponível em:

<<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v56n2/20329.pdf>> Acesso em: 31 mai. 2017. doi: 10.1590/S0102-09352004000200009

FERREIRA, L.S. et al. Colostrum silage: fermentative, microbiological and nutritional dynamics of colostrum fermented under anaerobic conditions at different temperatures. **Acta Scientiarum Animal Science**, v.35, p.395-401, 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/asas/v35n4/08.pdf>> Acesso em: 31 mai. 2017. doi: 10.4025/actascianimsci.v35i4.19870

FOLEY, J.A.; OTTERBY, D.E. Availability, storage, treatment, composition, and feeding value of surplus colostrum: a review. **Journal of Dairy Science**. v.61, p.1033-1060, 1978. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(78\)83686-8](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(78)83686-8)> Acesso: 31 mai.2017.

JENNY, B.F.et al. Microbial and acidity changes in colostrum fermented by natural flora at low and high ambient temperatures. **Journal of Dairy Science**. v.60, p.453-457, 1977. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(77\)83887-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(77)83887-3)> Acesso: 31 mai. 2017.

MÂNCIO, A.B. et al. Colostro fermentado, associado ao óleo de soja e promotor de crescimento, em substituição ao leite, na alimentação de bezerros mestiços leiteiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, p.1314-1319, 2005. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Rafael_Henrique_Buschinelli_De_Goes/publication/237972668_Colostro_fermentado_associado_ao_oleo_de_soja_e_promotor_de_crescimento_em_substituicao_ao_leite_na_alimentacao_de_bezeros_mesticos_leiteiros/links/0deec53b30f50547d2000000/Colostro-fermentado-associado-ao-oleo-de-soja-e-promotor-de-crescimento-em-substituicao-ao-leite-na-alimentacao-de-bezerros-mesticos-leiteiros.pdf> Acesso: 31 mai. 2017. doi: 10.1590/S1516-35982005000400028

MEINERSHAGEN, F. **Raising Calves on Stored Colostrum**. Missouri: Department of Animal Sciences, University of Missouri Extension, 1993. Disponível em: <<http://extension.missouri.edu/p/G3555>> Acesso: 31 mai. 2017

MODESTO E.C. et al. Desempenho produtivo de bezerros desmamados precocemente alimentados com diferentes dietas líquidas com utilização de promotor de crescimento.

Revista Brasileira de Zootecnia, v.31, p.429-435, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbz/v31n1s0/10324.pdf>> Acesso: 31 mai. 2017. doi:10.1590/S1516-35982002000200018

MULLER, L.D.; SYHRE, D.R. Influence of chemicals and bacterial cultures on preservation of colostrum. **Journal of Dairy Science**. v.58, p.957-961, 1975. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(75\)84663-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(75)84663-7)> Acesso: 31 mai. 2017.

PALMER, G.H., MUDD, A.J. A note on the growth of some microorganisms in stored bovine colostrum. **Journal of Dairy Research**, v.39, p.227-230, 1972. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S0022029900014059>> Acesso: 31 mai. 2017.

RAIMONDO, R.F.S. et al. Avaliação do pH e da eletrocondutividade do leite e bovinos da raça Jersey durante o primeiro mês de lactação. **Semina: Ciências Agrárias**, v.30, p.447-456, 2009. Disponível em:

<http://www.producao.usp.br/bitstream/handle/BDPI/1789/art.BIRGEL_avaliacao_do_ph_da_eletrocondutividade.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Acesso: 31 mai. 2017.

RINDSIG, R.B.; BODOSH, G.W. Growth of calves fed colostrum naturally formented, or preserved with propionic acid or formaldehyde. **Journal of Dairy Science**, v.60, p.185-191, 1977. Disponível em: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(77\)83831-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(77)83831-9)> Acesso: 31 mai. 2017.

SAALFELD M.H. Uso da Silagem de colostro como substituto do leite na alimentação de ternsiras leiteiras. **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, p. 1636-1641, 2013.

VIEGAS, C. R. et al. Avaliação das perdas da silagem de colostro. Águas de Lindóia, SP, 2009. In: ZOOTSE, Águas de Lindóia, 18, 2009. **Anais...**, Águas de Lindóia : 2009. Disponível em: <<http://www.abz.org.br/publicacoes-tecnicas/anais-zootec/artigos-cientificos/tecnologia-produtos-origem-animal/19511-Avaliao-das-perdas-silagem-colostro.html>> Acesso: 31 mai. 2017.

Tabela 1. Temperaturas mínima, máxima e médias da temperatura ambiente e índices de perda de amostras de silagem de colostro em três períodos experimentais.

Período experimental	T° Mín	T° Máx	T° Ambiente (°C)	Perda (%)
1 °. Período	15,6	36,0	26,56	32,7
2 °. Período	11,8	30,5	22,20	00
3 °. Período	11,7	31,5	23,32	67,3

T° Mín: temperatura ambiente mínima para o período experimental; T° Máx: temperatura ambiente máxima para o período experimental.

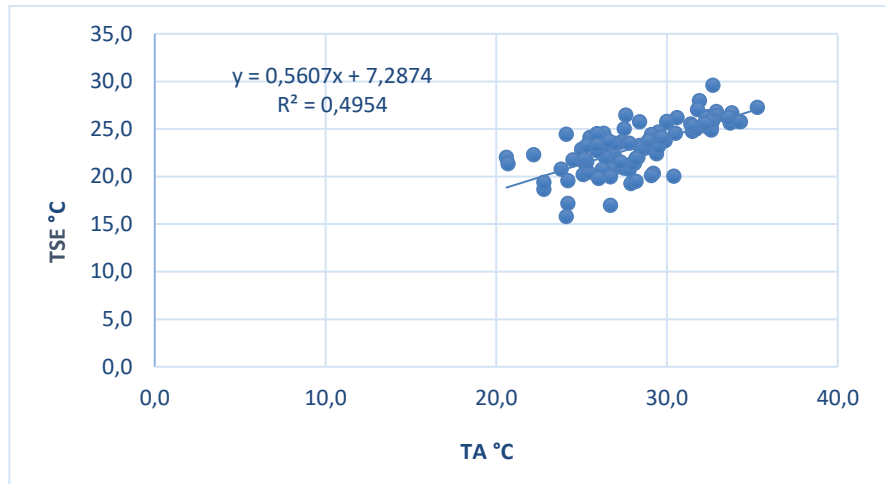


Figura 1. Temperatura superficial externa (TSE) em função da temperatura ambiente (TA).

CAPÍTULO 4

Influência do pH e microbiota indicadora na conservação do colostro por fermentação

Artigo a ser publicado no periódico

Ciência Rural

Microbiota indicadora e pH na conservação do colostro por fermentação

Microbiota indicator and pH in the conservation of colostrum by fermentation

**Inês de Freitas Gomide^{I*}, Daise Aparecida Rossi^{II}, Jéssica Laura Miranda Peixoto^{II},
Arinaldo de Oliveira^I, Alessandra Aparecida Medeiros – Ronchi^{II}.**

I Instituto Federal do Triângulo Mineiro (IFTM) – Campus Uberlândia. Fazenda Sobradinho s/nº - Cx. Postal: 1020 - Bairro: Zona Rural - CEP: 38400-970 - Uberlândia/MG, Brasil. E-mail: inesgomide@iftm.edu.br. *Corresponding author.

II Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG.

RESUMO

Considerando a importância do uso de sucedâneos de baixo custo, fácil obtenção e segurança microbiológica de produtos para o consumo de bezerros em pequenas propriedades rurais, objetivou-se verificar a influência do pH, contagens de coliformes totais, fungos e leveduras, bactérias lácticas e bactérias heterotróficas mesófilas na fermentação do colostro e sua relação com o índice de perda das amostras. Foram analisadas 12 amostras de colostro *in natura* (T1) e 108 amostras fermentadas por 7 (T2), 14 (T3) e 28 (T4) dias. Durante os 28 dias de fermentação houve redução do pH, com diferença estatística entre T1 e os demais tratamentos. Aos 28 dias de fermentação a contagem dos micro-organismos, exceto para bolores e leveduras, mativeram-se dentro dos padrões exigidos. Do total de amostras ensiladas 46,6% (43/108) apresentaram fermentação inadequada e seus resultados foram comparados com 53,4% (65/108) de processos adequados. Não foram encontradas diferenças estatísticas quanto aos valores pH, bactérias ácido lácticas, bactérias mesófilas, coliformes

totais e *E. coli*. Em todas as amostras, independente da adequação ou não do processo fermentativo, os valores médios para bolores e leveduras apresentaram-se acima do limite desejável de 10^2 UFC.mL⁻¹. Conclui-se que aos 28 dias de fermentação, com a acidificação do pH, os níveis de contaminação garantem a segurança no uso da silagem de colostro para bezerros. O alto índice de putrefação, observado à partir do 7º dia de fermentação, ocorreu provavelmente, em decorrência da contaminação por bolores e leveduras, evidenciando a necessidade de rígida higiene no processo de fabricação deste produto.

Palavras-chave: bolores e leveduras, silagem, bactérias lácticas, putrefação

ABSTRACT

Considering the importance of the use of low-cost, easy-to-obtain and microbiological safety for the consumption of calves in small farms, the objective was to verify the influence of pH, total coliform, fungi and yeast counts, lactic bacteria and mesophilic bacteria in the Adequacy of colostrum fermentation and its relationship with the loss index of the samples. Twelve samples of colostrum in natura (T1) and 108 samples fermented by 7 (T2), 14 (T3) and 28 (T4) days were analyzed. There was acidification of the pH during the fermentation with a statistical difference between T1 and the other treatments, which provided expected results regarding the microorganism counts, evidencing an increase in T2 count and reduction (T3) and stabilization (T4) in the counts, Remaining at 28 days of fermentation, except for fungi and yeasts, within the required standards. From the total ensiled samples 46.6% (43/108) presented inadequate fermentation and their results were compared with 53.4% (65/108) of suitable processes. No statistical differences were found regarding pH, lactic acid bacteria, mesophilic bacteria, total coliforms and *E. coli*. In all samples, regardless of the suitability or not of the fermentation process, the mean values for molds and yeasts were above the desirable limit of 10^2 CFU.mL⁻¹. It is concluded that at 28 days of fermentation, with pH

acidification, contamination levels guarantee safety in the use of colostrum silage for calves. The high putrefaction index, observed from the 7th day of fermentation, probably occurred due to contamination by molds and yeasts, evidencing the need for rigid hygiene in the production process of this product.

Key words: Yeasts and molds, silage, lactic acid bacteria, putrefaction

INTRODUÇÃO

Na pecuária leiteira a alimentação dos bezerros durante a fase de aleitamento é um fator importante no planejamento do custo de produção. O produtor pode optar por utilizar o leite excedente da propriedade ou o uso de sucedâneos, porém, independente da escolha esta é uma condição que reflete nas relações de custo/benefício. A pesquisa e o desenvolvimento de sucedâneos direcionados a pequenos produtores rurais, de fácil obtenção, baixo custo e de qualidade nutricional e microbiológica foi essencial para a introdução da fermentação anaeróbia do colostro, também conhecida por silagem de colostro.

A silagem de colostro foi desenvolvida por SAALFELD (2008) com a finalidade de aproveitar o leite não comercializável (colostro e leite de transição) na elaboração de um alimento nutricionalmente rico e capaz de refletir em taxas de crescimento dos bezerros compatíveis com aqueles alimentados com leite integral (CASTRO et al, 2004; MÂNCIO et al., 2005; AZEVEDO et al., 2014). A fabricação da silagem de colostro é fácil e de baixo custo, porém durante o processo, perdas decorrentes de sua putrefação podem atingir valores acima de 40% (VIEGAS et al., 2009), demonstrando a existência de fatores intrínsecos ou extrínsecos que atuam de forma desfavorável à fermentação anaeróbia.

Há necessidade de estudos que otimizem o uso de sucedâneos de baixo custo, de fácil obtenção e com segurança microbiológica para os pequenos produtores rurais, na tentativa de

se reduzir os altos índices de perda no processo fermentativo da silagem de colostro. Assim, objetivou-se verificar a influência do pH, contagens de coliformes totais, fungos e leveduras, bactérias lácticas e bactérias mesófilas na adequação da fermentação do colostro e sua relação com o índice de perda das amostras.

MATERIAL E MÉTODOS

O colostro utilizado para a produção de silagem foi obtido de seis vacas leiteiras mestiças, híginas e sem histórico de mastite, pertencentes ao rebanho do setor de Bovinocultura Leiteira da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). O grau de sangue dos animais utilizados é variável sendo que a vaca 3016 é $\frac{1}{2}$ sangue holandês (HO) x pardo suíço (SUI), 1026 e 1076 são $\frac{1}{2}$ HO x Jersey (JER), 3023 é $\frac{7}{8}$ HO x gir leiteiro, 2013 $\frac{1}{2}$ JER x SUI e 1106 $\frac{1}{2}$ HO x SUI. Quanto ao manejo nutricional o rebanho no período chuvoso foi mantido em pastagem de *Brachiaria decumbens* cv. Basilik com suplementação de contrado na quantidade de 2,5 kg/animal/dia. Na estação seca do ano foram confinados em piquetes e receberam silagem de milho acrescido de suplementação concentrada de 2,5 kg/animal/dia na forma de dieta total.

A coleta do colostro foi realizada no período de 02 de abril a 03 de agosto de 2016, divididos em três períodos experimentais: 02/04 a 05/05 (1º. Período), 01 a 29/06 (2º. Período) e 04/07 a 03/08 (3º. Período). Foram coletados 5 litros/dia/vaca de colostro, no terceiro e quarto dias pós-parto durante todo o período experimental. A obtenção do colostro foi realizada por ordenha manual, após *pré-dipping*, e este envasado para o transporte em latão de 5L plástico (Milkan®), previamente higienizado com detergente neutro e água quente.

Após a coleta o colostro foi transportado até o Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada (LABIO) da UFU em temperatura ambiente, fracionado em nove amostras em

garrafas de polietileno tereftalato (PET) de 237 mL (SAALFELD, 2008), que foram submetidas à fermentação anaeróbica natural em triplicada. As amostras foram armazenadas em uma sala, sem controle de temperatura e umidade relativa do ar e, protegidos da luz.

No total foram 120 amostras analisadas laboratorialmente, incluindo o colostro *in natura* de cada animal utilizado no experimento e as que permaneceram em processo fermentativo durante 7, 14 e 28 dias. As leituras do pH de todas as amostras foram realizadas utilizando o medidor de pH modelo NI PHM (Nova Instruments®).

Os procedimentos microbiológicos para determinação de bactérias heterotróficas mesófilas, bactérias ácido lácticas e fungos e leveduras foram realizados conforme recomendações de SILVA et al. (2010). Para as análises, as amostras de colostro foram homogeneizadas e alíquotas de 25mL foram previamente diluídas em 225 mL de solução de citrato de sódio 2% (Synth®). Em seguida, foram submetidas a diluições decimais seriadas em 9mL de água peptonada 0,1% (Difco™) para subsequente inoculação em duplicata.

A quantificação de bactérias heterotróficas mesófilas foi realizada pelo método *pour plate*, com o uso de *Plate Count Agar* (PCA) - (Difco™), com incubação a 36°C por 48h. Para a quantificação de bactérias lácticas viáveis (BAL) foi utilizado Ágar Man, Rogosa and Sharp (MRS) em profundidade, com dupla camada e incubação a 30°C em anaerobiose por 48h.

Para a contagem de bolores e leveduras utilizou-se a técnica *spread plate*, na superfície de placas de Petri contendo Ágar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol (DRBC), seguido de incubação a 25°C por 3-5 dias.

Para a contagem de *E. coli* e coliformes totais foram utilizados meios cromogênicos dispostos nas placas 3M™ Petrifilm™. Os procedimentos foram realizados de acordo com o fabricante e este método têm seu uso autorizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 2006).

Em todos os casos as colônias foram contadas e o resultado multiplicado pela recíproca da diluição utilizada. O resultado final foi obtido utilizando as recomendações de SILVA et al (2010).

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) e para testar a normalidade da contagem microbiológica foram utilizados os testes de Anderson – Darling, Kolmogorov – Smirnov, Shapiro – Wilk e Ryan – Joiner. No caso de dados não normais foi utilizado o teste de Wilcoxon para compará-las e posteriormente o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação das médias (p -valor $< 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o Software Action Stat (Estatcamp, Campinas).

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Uso Animal - CEUA, da Universidade Federal de Uberlândia, protocolo 071/15.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da determinação do pH demonstraram queda gradual durante a fermentação do colostro, com diferença estatística entre o colostro *in natura* (T1) comparado com T2, T3 e T4. Não houve diferença entre a média do pH dos tratamentos T2, T3 e T4 (Tabela 1).

AZEVEDO et al. (2014) avaliaram a silagem de colostro armazenada durante 18 meses e obtiveram resultados semelhantes ao deste estudo. Determinaram que o pH médio foi de 4,49 para o colostro *in natura*. Já SAAFELD (2008) encontrou valores em torno de 3,55 a 4,39, com aferições realizadas após o período final de armazenamento (21 dias) da silagem de colostro, afirmando que nesta faixa de pH já ocorreu a fermentação adequada do colostro o que permite sua conservação.

O colostro produzido pela glândula mamária é estéril e sua contaminação por micro-organismos é decorrente da passagem desta secreção através dos ductos mamários, o que pode

ser uma fonte de patógenos para os bezerros (STEWART et al., 2005). Portanto, a avaliação da contaminação microbiana do colostro é importante para garantir a segurança alimentar dos bezerros, principalmente quando a ingestão é proveniente da secreção obtida de várias fêmeas. A avaliação microbiológica de bactérias indicadoras no colostro *in natura* e após fermentação estão apresentados na Tabela 2.

Os resultados para BAL apresentaram-se dentro do esperado, pois aos sete dias de fermentação (T2) observa-se contagens superiores a 10^7 UFC.mL⁻¹. Posteriormente, aos 14 (T3) e 28 (T4) dias houve redução ou estabilização em sua contagem, provavelmente por esgotamento ou diminuição do carboidrato fermentescível, a lactose (AXELSSON, 2004). De acordo com a legislação vigente, para derivados lácteos, tais como iogurte, coalhada e leite fermentado, o número mínimo de UFC exigido para BAL é de 10^6 a 10^7 UFC/mL. No decorrer do processo fermentativo valores superiores ao padrão mínimo preconizado foram observados, o que também ocorreu no trabalho de RODRIGUES, ORTOLANI E NERO (2010) que relataram contagens médias acima de 10^7 UFC.mL⁻¹ de BAL em amostras de iogurtes.

Altas contagens para BAL são importantes, já que uma microbiota composta por bactérias desejáveis aliado a um pH próximo de 4,0, pode impedir o desenvolvimento de bactérias indesejáveis ou patogênicas. A acidificação permite que o tempo de conservação dos produtos fermentados seja maior que a dos produtos não submetidos a este processo. Outra função das BAL é desenvolver propriedades organolépticas características dos produtos fermentados (REIS et al., 2014). Segundo FERREIRA et al. (2013) o grupo de micro-organismos que apresentam maior desenvolvimento nos primeiros dias de fermentação do colostro são as BAL. Estas bactérias são desejáveis por serem consideradas responsáveis pelo processo fermentativo, decorrente da transformação da lactose em ácido láctico em ambiente

de anaerobiose acompanhado pela redução do pH, promovendo assim, a melhor conservação da silagem de colostro.

Segundo McGUIRK & COLLINS (2004), no colostro *in natura* a contaminação para bactérias mesófilas deve ser inferior a $1,0 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹ e, menor que $1,0 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹ para coliformes totais, resultados observados neste estudo nas amostras de colostro *in natura* ($6,3 \times 10^3$ e $4,3 \times 10^1$ UFC.mL⁻¹, respectivamente). Pode-se observar que os valores médios para de bactérias mesófilas encontrados no colostro *in natura* estão dentro dos padrões exigidos para leite cru pela Instrução Normativa nº 62 que estabelece limites de $3,0 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹ até 30/06/2016 e a partir de 01/07/2017 limites de $1,0 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹ (BRASIL, 2011). Já nos resultados obtidos para bactérias mesófilas nas amostras fermentadas (T2, T3 e T4) verificou-se crescimento acima do limite preconizado (BRASIL, 2011), porém, este não é um bioindicador adequado para prever qualidade de produtos fermentados, pois o método não é capaz de diferenciar bactérias desejáveis como as BAL da microbiota contaminante usual.

As contagens de coliformes totais aumentaram aos sete dias de fermentação (T2) e depois diminuíram aos 14 (T3) e 28 (T4) dias de fermentação, onde apresentou valor abaixo do limite máximo ($1,0 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹) preconizado por McGUIRK & COLLINS (2004). Estes bioindicadores são consequência da falta de higiene na obtenção do leite (BRITO et al., 2002), porém, possuem menor associação com patógenos que outros bioindicadores como *E. coli* (REIS et al., 2014). Apesar de um aumento inicial das contagens, a tendência de redução durante o armazenamento do leite é esperada, já que há esgotamento da lactose, que é o principal substrato das espécies que compõem o grupo (AXELSSON, 2004).

As contagens de *E. coli* (Tabela 2) evidenciam que a contaminação do colostro *in natura* estava dentro do recomendado por PERES (2013), que é de no máximo $2,0 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹. Apesar de ter sido observada contagens acima da preconizadas aos 14 dias de

fermentação, aos 28 dias, que é o período adequado para o fornecimento ao bezerro, o padrão foi novamente alcançado, o que também foi observado por FERREIRA et al. (2013).

Apesar de a maioria das cepas de *E. coli* não ser patogênica por ingestão (FRANCO et al., 2010), estes micro-organismos são importantes patógenos de bezerros, causando diarreia, desidratação e outras complicações (VARGAS JÚNIOR et al., 2017). Estes autores comentam que a *E. coli* é o bioindicador de contaminação fecal mais frequentemente utilizado e com a maior associação com outros patógenos entéricos, e assim, deve ser constantemente monitorado em alimentos oferecidos aos animais. Considerando que as contagens deste micro-organismo estavam adequadas no colostro que deu origem à silagem, provavelmente, a inadequação observada aos 14 dias somente reflete a multiplicação do agente na presença de substrato e temperaturas favoráveis, sendo as contagens no colostro *in natura*, a que mais influência na qualidade microbiológica final da silagem. PERES (2013) relata que este micro-organismo pode dobrar seu número em período de aproximadamente 20 minutos em condições adequadas, porém, os outros patógenos entéricos aos quais podem estar associados, são inibidos em condições de baixo pH obtidos na fermentação ou só se multiplicam de forma intracelular no hospedeiro.

De acordo com REIS et al. (2014) e CITADIN et al. (2009) não existe um padrão microbiológico para a contaminação de bolores e leveduras (BL) em derivados lácteos, mas estes autores consideraram que contagens superiores a $1,0 \times 10^2$ UFC.mL⁻¹ indicam condições de higiene insatisfatórias e contaminação durante o processo de ordenha. Neste estudo (Tabela 2) as contagens médias foram superiores às recomendadas por estes autores, o que também foi observado por SABOIS et al. (1991), MUTUKUMIRA et al. (1996) e DESMASURES et al. (1997) em leite cru.

Do total de silagens do colostro *in natura*, 46,4% (43/108) apresentaram fermentação inadequada a partir dos sete primeiros dias de processo fermentativo. Foram consideradas

inadequadas quanto ao processo de fermentação anaeróbica, as amostras que apresentaram odor fétido, presença de gás e ausência de separação entre gordura, proteína e soro. Características semelhantes foram observadas por VIEGAS et al. (2009) que descartaram 40,1% de amostras de silagem de colostro armazenadas por 21 dias.

Os dados referentes ao pH e análises microbiológicas das amostras inadequadas (46,4% - 43/108) foram paralelamente comparados às amostras com fermentação adequada (53,6% - 65/108) para verificar sua influência nas perdas. Não foram encontradas diferenças ($p < 0,05$) entre as amostras de colostro com fermentação adequada e inadequada quanto ao pH, bactérias do ácido láctico, bactérias mesófilas, coliformes totais e *E. coli* (Tabela 3).

Aos sete e 14 dias de fermentação (T2 e T3) todas as amostras, adequadas ou inadequadas, apresentaram contagens médias acima do padrão recomendado para as bactérias pesquisadas. Exceções foram observadas nas BAL, para as quais só existe padrão mínimo (BRASIL, 2007), e para *E. coli* que segundo PERES (2013) não deve exceder $2,0 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹. Para MCGUIRK & COLLINS (2004) o máximo desejável para coliformes totais é de $1,0 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹, e para bactérias mesófilas no colostro *in natura*, deve ser inferior a $1,0 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹.

Aos 28 dias de fermentação, as contagens médias de bactérias mesófilas permaneceram acima dos limites desejados nas amostras com fermentação adequada e inadequada e o número de BAL permaneceram estáveis. AZEVEDO et al. (2014) trabalhando com silagem de colostro armazenada por 18 meses, encontraram $1,4 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹ de *Lactobacillus* spp., ausência de fungos e enterobactérias em amostras de silagem de colostro com fermentação adequada. Nas silagens com fermentação inadequada obtiveram menor concentração de *Lactobacillus* spp. ($1,0 \times 10^2$ UFC.mL⁻¹) e a presença de fungos em 86,7% das amostras. VIEGAS et al. (2009) relataram que não foi possível determinar as causas da putrefação das amostras de silagem de colostro fermentadas por 21 dias, já que micro-

organismos considerados indesejáveis como da família Enterobacteriaceae e de estafilococcus estavam em níveis aceitáveis, além de apresentarem a presença de bactérias ácido lácticas ($> 1,0 \times 10^2$ UFC.mL⁻¹) em quase todas as amostras.

No presente estudo e nos realizados por AZEVEDO et al. (2014) e VIEGAS et al. (2009) não foram analisados a presença de inibidores químicos ou de antibióticos nas amostras de colostro *in natura* que deram origem à silagem. Assim, apesar de não terem sido observadas diferenças significativas entre as contagens dos micro-organismos estudados, influência em outros pode ter interferido na adequação ou inadequação, ou ainda, ter interferido somente no desenvolvimento dos micro-organismos nos primeiros dias da fermentação (período não avaliado). Porém, são inferências que devem ser avaliadas em estudos posteriores, tais como a adição de cultivos de BAL no momento da preparação do colostro *in natura* para a fabricação da silagem de colostro, técnica já utilizada na fabricação de derivados lácteos fermentados.

Houve diferença em T3 entre a contagem média para bolores e leveduras, sendo maior para as amostras inadequadas quanto à fermentação do colostro. Não foram observadas diferenças em T2 e T4 (Tabela 4).

Em todas as amostras, independente da adequação do processo fermentativo, encontrou-se valores médios para bolores e leveduras acima do limite desejável de $1,0 \times 10^2$ UFC.mL⁻¹ (CITADIN et al., 2009; REIS et al., 2014). REIS et al. (2014) encontraram contagem elevada destes micro-organismos na coalhada e comentaram que isto provavelmente, deveu-se ao excesso de ácido láctico, o que inibiu a multiplicação de BAL e, associado ao pH ácido, favoreceu o desenvolvimento de bolores e leveduras. Não houve diferença significativa nas contagens de BAL entre amostras adequadas e putrefatas neste estudo, e assim, outras causas devem ter interferido na adequação/inadequação das amostras.

As leveduras exigem maior umidade quando comparadas aos bolores e, menor quando comparada às bactérias. Sua multiplicação é favorecida em ambiente anaeróbico, pH ácido e a temperatura ideal para sua multiplicação situa-se entre 25°C a 30°C (GARDA et al. 2016).

De acordo com REIS (2008) a presença de bolores e leveduras é indesejável, pois promovem a deterioração da silagem por provocar fermentação excessiva e produção de gás resultando em sabores estranhos e de baixa aceitação. Estas alterações reduzem o prazo de prateleira e promovem depreciação do produto final. Este mesmo autor comenta que com o pH entre 4,3 e 4,5 e com a presença de ácido láctico, os bolores e leveduras encontram condições ótimas de crescimento em bebidas lácteas. Em pH ácido, inferior a 4,0, são favorecidas a presença de bactérias lácticas, bactérias acéticas, bolores e leveduras.

CONCLUSÃO

A contaminação microbiana diminuiu no decorrer do processo fermentativo devido à redução do pH, e os níveis destas contaminações aos 28 dias podem garantir a segurança na utilização da silagem de colostro na alimentação de bezerros. Porém, o alto índice de perdas por putrefação demonstra a necessidade de novas investigações para determinar sua causa.

REFERÊNCIAS

- AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S. et al. (Eds.). **Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects**. New York: Marcel Dekker, 2004, p.1-66. <https://doi.org/10.1201/9780824752033.ch1>
- AZEVEDO R.A. et al. Silagem de colostro: riscos microbiológicos e caracterização do pH em função do dia de coleta. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 36, n. 3, p.271-276, 2014.

BRASIL. **Instrução Normativa 68, de 12 de dezembro de 2006.** Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 14 dez. 2006, p. 08, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007.** Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 24 out. 2007. Seção 1, p. 4-7.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – Gabinete do Ministro. **Instrução Normativa Nº 62, de 29 de dezembro de 2011.** Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, Seção 1, p. 6.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO J.R.F.; PORTUGAL J.A.B. Identificação de contaminantes bacterianos no leite cru de tanques de refrigeração. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.57, p.47-52, 2002.

CASTRO, A.L.M. et al. Desempenho e rendimento de carcaça de bezerros alimentados com colostro fermentado, associado ao óleo de soja e zeranol. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p.193-201, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v56n2/20329.pdf>> Acesso em: 31 mai. 2017. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352004000200009>

CITADIN, A.S. et al. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e fatores associados. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, n. 1, p. 52-59, 2009.

DESMASURES, N. et al. *Lactococcus* spp., yeasts and *Pseudomonas* spp. on teats and udders of milking cows as potential sources of milk contamination. **International Dairy Journal**, v.7, p.643-646, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(97\)00042-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(97)00042-3)

FERREIRA L.S. et al. Colostrum silage: fermentative, microbiological and nutritional dynamics of colostrum fermented under anaerobic conditions at different temperatures. **Acta Scientiarum Animal Science**, v.35, p.395-401, 2013.

FOLEY, J.A.; OTTERBY, D.E. Availability, storage, treatment, composition, and feeding value of surplus colostrum: a review. **Journal of Dairy Science**, v.61, p.1033-1060, 1978. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(78\)83686-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(78)83686-8)

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2002.

FRANCO, R. M. et al. Viabilidade de *Escherichia coli* patogênica em linguiça frescal suína. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v.8, p.319-325, 2010.

GARDA. K. et al. Análises microbiológicas de amostras de leite de indústrias do norte do Rio Grande do Sul. **Anais...** Mostra de Iniciação Científica e Mostra de Criação e Inovação. Getúlio Vargas – RS, 2016. Disponível em: <http://www.ideau.com.br/getulio/mic/anais> Acesso 14 nov. 2017.

MÂNCIO, A.B. et al. Colostro fermentado, associado ao óleo de soja e promotor de crescimento, em substituição ao leite, na alimentação de bezerros mestiços leiteiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, p.1314-1319, 2005. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Rafael_Henrique_Buschinelli_De_Goes/publication/237972668_Colostro_fermentado_associado_ao_oleo_de_soja_e_promotor_de_crescimento_em_substituicao_ao_leite_na_alimentacao_de_bezerros_mesticos_leiteiros/links/0deec53b30f50547d2000000/Colostro-fermentado-associado-ao-oleo-de-soja-e-promotor-de-crescimento-em-substituicao-ao-leite-na-alimentacao-de-bezerros-mesticos-leiteiros.pdf> Acesso: 31 mai. 2017. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982005000400028>

McGUIRK, S.M.; COLLINS, M. Managing the production, storage and delivery of colostrum. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.20, p.593-603, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2004.06.005>

MUTUKUMIRA, A.N. et al. Chemical and microbiological quality of raw milk produced by smallholder farmers in Zimbabwe. **Journal of Food Protection**, v.59, p.984-987, 1996. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.9.984>

PERES, J.P. Seu colostro é um soro de saúde ou uma sopa de bactérias? 2013. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/medicina-da-producao/seu-colostro-e-um-soro-de-saude-ou-uma-sopa-de-bacterias-16717n.aspx>> Acesso: 31 mai. 2017.

PERES, M.R. et al. Pesquisa de fungos no leite de tanques de refrigeração de propriedades de exploração leiteira. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71, p.663-665, 2004.

REIS, D. L. dos, et al. Qualidade e segurança microbiológica de derivados lácteos fermentados de origem bovina produzidos no Distrito Federal, Brasil. **Ciências Agrárias**, v.35, p.3161-3171, 2014. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/pdf/4457/445744145024.pdf>> Acesso em: 22/07/2017.

RODRIGUES, L.A.; ORTOLANI, M.B.T.; NERO, A. Microbiological quality of yoghurt commercialized in Viçosa, Minas Gerais, Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 3, p. 210-213, 2010.

SAALFELD M.H. Uso da Silagem de colostro como substituto do leite na alimentação de terneiras leiteiras. **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, p. 1636-1641, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782013000900016>

SABOIS, A. et al. Microbiological quality of raw milk: incidence of aerobic and anaerobic spore-forming bacteria, yeasts and fungi. **Revista Argentina de Lactologia**, v.3, p.79-90, 1991.

SILVA, N. et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 4^a edição. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

STEWART, S; GODDEN, S.; BEY, R.; RAPNICKI, P.; FETROW, J.; FARNSWORTH, R.; SCANLON, M.; ARNOLD, Y.; CLOW, L. MULLER, K; FERROUILLET, C. Preventing bacterial contamination and proliferation during the harvest, storage, and feeding of fresh bovine colostrum. **Journal of Dairy Science**. 2005; (88): 2571-2578. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72933-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72933-7)

VARGAS JÚNIOR, S.R. et al. Identificação de fatores de virulência de isolados de *Escherichia coli* oriundos de fezes de bezerros na região Sul do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.45:1467, 2017.

VIEGAS, C. R. et al. Avaliação das perdas da silagem de colostro. Águas de Lindóia, SP, 2009. In: ZOOTSE, Águas de Lindóia, 18, 2009. **Anais...**, Águas de Lindóia : 2009. Disponível em: <<http://www.abz.org.br/publicacoes-tecnicas/anais-zootec/artigos-cientificos/tecnologia-produtos-origem-animal/19511-Avaliao-das-perdas-silagem-colostro.html>> Acesso: 31 mai. 2017.

WOUTERS, J.T.M. et al. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v.12, p.91-109, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00151-0](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00151-0)

Tabela 1. pH do colostro *in natura* e após a fermentação por 7, 14 e 28 dias de fermentação.

Tratamentos	pH¹	DP
T1= colostro <i>in natura</i>	6,36 ^a	0,03
T2= 7 dias de fermentação	4,61 ^b	0,03
T3= 14 dias de fermentação	4,55 ^b	0,05
T4= 28 dias de fermentação	4,59 ^b	0,08

¹ pH médio de 120 amostras. DP = desvio padrão das médias. Letras diferentes na mesma coluna são estatisticamente diferentes ($P \leq 0,5$) pelo teste de Kruskal - Wallis

Tabela 2. Contagens médias (Log.UFC.mL⁻¹) de bactérias bioindicadoras da qualidade do colostro *in natura* e após fermentação.

	BAL		BT		CT		<i>E. coli</i>		B.L.	
	X	DP	X	DP	X	DP	X	DP	X	DP
T1	1,9 x 10 ^{1 c}	0,69	6,3 x 10 ^{3 d}	1,06	4,3 x 10 ^{1 d}	0,75	1,7 x 10 ^{1 d}	0,69	1,4 x 10 ^{2 d}	0,17
T2	7,9 x 10 ^{9 a}	1,30	1,2 x 10 ^{10 a}	0,71	5,4 x 10 ^{9 a}	0,89	8,2 x 10 ^{3 a}	1,01	3,9 x 10 ^{8 a}	0,85
T3	2,5 x 10 ^{7 b}	1,62	2,4 x 10 ^{9 b}	1,33	4,4 x 10 ^{4 b}	1,16	4,2 x 10 ^{4 b}	1,23	3,3 x 10 ^{5 b}	1,09
T4	3,2 x 10 ^{7 b}	1,59	5,2 x 10 ^{7 c}	1,46	4,2 x 10 ^{3 c}	1,20	2,9 x 10 ^{3 c}	1,15	2,1 x 10 ^{4 c}	0,86

BAL= bactérias ácido lácticas, BT= bactérias heterotróficas mesófilas, CT = coliformes totais, B.L. = bolores e leveduras; DP= desvio padrão da média; T1= colostro *in natura*, T2= 7 dias de fermentação, T3= 14 dias de fermentação e T4= 28 dias de fermentação. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças ($P \leq 0,5$) pelo teste de Kurskal -Wallis.

Tabela 3. Contagens médias* (Log.UFC.mL⁻¹) de bactérias bioindicadoras e BAL em amostras de colostro com fermentação adequada e inadequada.

Adequadas					Inadequadas			
	<i>E. coli</i>	CT	BT	BAL	<i>E. coli</i>	CT	BT	BAL
T2	7,6 x 10 ^{9a}	7,6 x 10 ^{9a}	1,9 x 10 ^{10a}	1,2 x 10 ^{10a}	4,6 x 10 ^{9a}	1,3 x 10 ^{10a}	2,0 x 10 ^{10a}	1,1 x 10 ^{10a}
T3	3,4 x 10 ^{4a}	3,6 x 10 ^{4a}	2,6 x 10 ^{9a}	2,2 x 10 ^{8a}	6,1 x 10 ^{3a}	7,3 x 10 ^{3a}	6,8 x 10 ^{9a}	1,7 x 10 ^{9a}
T4	3,8 x 10 ^{3a}	5,6 x 10 ^{3a}	3,0 x 10 ^{7a}	1,4 x 10 ^{7a}	2,4 x 10 ^{3a}	3,3 x 10 ^{3a}	1,4 x 10 ^{8a}	9,8 x 10 ^{7a}

*Média de 108 amostras; BAL= bactérias ácido lácticas, BT= bactérias heterotróficas mesófilas, CT = coliformes totais, BOL e LEV = bolores e leveduras; DP= desvio padrão da média; T2= 7 dias de fermentação, T3= 14 dias de fermentação e T4= 28 dias de fermentação. Letras diferentes na mesma linha são estatisticamente diferentes ($P \leq 0,5$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 4. Contagens médias (Log.UFC.mL⁻¹) de bolores e leveduras das amostras de colostro com fermentação adequada e inadequada.

	BL amostra adequada	BL amostra inadequada
	(Log.UFC.mL ⁻¹)	(Log.UFC.mL ⁻¹)
T2	4,8 x 10 ^{-9 a}	8,5 x 10 ^{-9 a}
T3	2,9 x 10 ^{-5 b}	6,0 x 10 ^{-5 c}
T4	1,9 x 10 ^{-4 d}	1,2 x 10 ^{-4 d}

T2= 7 dias de fermentação, T3= 14 dias de fermentação e T4= 28 dias de fermentação. Letras diferentes na mesma linha são estatisticamente diferentes ($P \leq 0,5$) pelo teste de Kruskal – Wallis.

ANEXOS

1 Normas do periódico Ciência Animal Brasileira - Capítulo 2

Normas para publicação - Ciência Animal Brasileira

Para submissões em português:

Título em português: Fonte Times New Roman 14, caixa alta, centrado, negrito;

Resumo: Fonte Times New Roman 12, espaço 1, justificado, com um máximo de 200 palavras;

Palavras-chave: idem, e no máximo 5 palavras chave;

Título em inglês (obrigatório): Fonte Times New Roman 12, caixa alta, centrado;

Abstract (obrigatório): Fonte Times New Roman 12, espaço 1, justificado;

Keywords: idem

Introdução: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Material e Métodos: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Resultados: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Discussão: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5 (Os tópicos Resultados e Discussão podem ser apresentados juntos dependendo das especificidades da área);

Conclusões: Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Agradecimentos: (opcional) Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

Referências (e não bibliografia): Usar fonte Times New Roman 11, espaço 1 entre linhas e colocar espaço 6 pontos acima e abaixo do parágrafo. As referências devem ser numeradas na ordem em que aparecem no texto. A lista completa de referências, no final do artigo, devem estar de acordo com o estilo Vancouver (norma completa <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>; norma resumida http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Para as submissões em língua inglesa, a tipografia e espaçamentos são os mesmos, na seguinte sequência:

Título em inglês (Title);

Abstract;

Keywords;

Título em português (obrigatório);

Resumo em português (obrigatório);

Palavras-chave;

Introduction;

Material and Methods;

Results and Discussion;

Conclusions;

Acknowledgments (opcional),

References

2 Normas do periódico Ciência Rural - Capítulos 3 e 4

Normas para publicação – Ciência Rural

1. CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

2. Os artigos científicos, revisões e notas devem ser encaminhados via eletrônica e editados **preferencialmente em idioma Inglês**. Os encaminhados em Português poderão ser traduzidos após a 1ª rodada de avaliação para que ainda sejam revisados pelos consultores ad hoc e editor associado em rodada subsequente. Entretanto, caso **não traduzidos** nesta etapa e se **aprovados** para publicação, terão que ser **obrigatoriamente traduzidos para o Inglês** por empresas credenciadas pela Ciência Rural e obrigatoriamente terão que apresentar o certificado de tradução pelas mesmas para seguir tramitação na CR.

Empresas credenciadas:

- American Journal Express (<http://www.journalexperts.com/>)
- Bioedit Scientific Editing (<http://www.bioedit.co.uk/>)
- BioMed Proofreading (<http://www.biomedproofreading.com>)
- Edanz (<http://www.edanzediting.com>)
- Editage (<http://www.editage.com.br/>) 10% discount for CR clients. Please inform Crural10 code.
- Enago (<http://www.enago.com.br/forjournal/>) Please inform CIRURAL for special rates.
- GlobalEdico (<http://www.globaledico.com/>)
- JournalPrep (<http://www.journalprep.com>)
- Paulo Boschcov (paulo@bridgetextos.com.br, bridge.textecn@gmail.com)
- Proof-Reading-Service.com (<http://www.proof-reading-service.com/pt/>)

As despesas de tradução serão por conta dos autores. Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. O máximo de páginas será **15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras**. Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que não poderão ultrapassar as margens e **nem estar com apresentação paisagem**.

3. O artigo científico (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) **deverá conter os seguintes**

tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências; Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das

referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

4. A revisão bibliográfica (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

5. A nota (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

6. O preenchimento do campo "**cover letter**" deve apresentar, obrigatoriamente, as seguintes informações em inglês, **exceto** para artigos **submetidos em português** (lembrando que preferencialmente os artigos devem ser submetidos em inglês).

- a) What is the major scientific accomplishment of your study?
- b) The question your research answers?
- c) Your major experimental results and overall findings?
- d) The most important conclusions that can be drawn from your research?
- e) Any other details that will encourage the editor to send your manuscript for review?

Para maiores informações acesse o seguinte [tutorial](#).

7. Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista www.scielo.br/cr.

8. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

9. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

10. Nesse [link](#) é disponibilizado o **arquivo de estilo** para uso com o software **EndNote** (o EndNote é um software de gerenciamento de referências, usado para gerenciar bibliografias ao escrever ensaios e artigos).

11. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

11.1. Citação de livro:

JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

11.2. Capítulo de livro com autoria:

GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

11.3. Capítulo de livro sem autoria:

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.

TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

11.4. Artigo completo:

O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICH, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests **Tribolium confusum** (Coleoptera: Tenebrionidae), **Tenebrio molitor** (Coleoptera: Tenebrionidae), **Sitophilus granarius** (Coleoptera: Curculionidae) and **Plodia interpunctella** (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Available from: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Accessed: Mar. 18, 2002. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Response of **Sitophilus oryzae** (L.), **Cryptolestes ferrugineus** (Stephens) and **Oryzaephilus surinamensis** (L.) to different concentrations of diatomaceous earth in bulk stored wheat. **Ciência Rural**, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso>. Accessed: Mar. 18, 2009. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

SENA, D. A. et al. Vigor tests to evaluate the physiological quality of corn seeds cv. 'Sertanejo'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 47, n. 3, e20150705, 2017. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782017000300151&lng=pt&nrm=iso>. Accessed: Mar. 18, 2017. Epub 15-Dez-2016. doi: 10.1590/0103-8478cr20150705 (**Artigo publicado eletronicamente**).

11.5. Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236. (**OBS.: tentar evitar esse tipo de citação**).

11.6. Tese, dissertação:

COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria. (**OBS.: tentar evitar esse tipo de citação**).

11.7. Boletim:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20). (**OBS.: tentar evitar esse tipo de citação**).

11.8. Informação verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

11.9. Documentos eletrônicos:

MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD. (**OBS.: tentar evitar esse tipo de citação**).

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Online. Available from: <<http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>>. Accessed: Mar. 18, 2005 (**OBS.: tentar evitar esse tipo de citação**).

UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Online. Available from: <<http://www.zh.com.br/especial/index.htm>>. Accessed: Mar. 18, 2001 (**OBS.: tentar evitar esse tipo de citação**).

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Online. Available from: <<http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>>. Accessed: Mar. 18, 2007.

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC. (OBS.: **tentar evitar esse tipo de citação**).

12. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

13. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

14. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

15. Lista de verificação (Checklist [.doc](#), [.pdf](#)).

16. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

17. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

18. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.

19. Todos os artigos encaminhados devem pagar a [taxa de tramitação](#). Artigos reencaminhados (**com decisão de Reject and Resubmit**) deverão pagar a taxa de tramitação novamente. Artigos arquivados por **decurso de prazo** não terão a taxa de tramitação reembolsada.

20. Todos os artigos submetidos passarão por um processo de verificação de plágio usando o programa "Cross Check".