

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**



**Tese**

**Silagem de colostro bovino: propriedades e  
potencialidades de usos**

**Mara Helena Saalfeld**

**Pelotas, 2013**

**MARA HELENA SAALFELD**

**Silagem de colostro bovino: propriedades e  
potencialidades de usos**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de conhecimento: Biotecnologia).**

**Orientador: Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite**

**Coorientadoras: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela Isabel Brayer Pereira  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Márcia Arocha Gularte**

**Pelotas, 2013**

**Banca examinadora**

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (UFPel)

Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra (UFPel)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Helenice Gonzalez de Lima (UFPel)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sônia de Avila Botton (UFSM)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniela Brayer Pereira (UFPel)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Márcia Arocha Gularte (UFPel)

Dedico esta tese:  
Ao meu pai Bruno Saalfeld (*in memoriam*)  
À minha mãe Ilga Härter Saalfeld  
Aos meus filhos Filipe e Augusto Saalfeld da Silveira  
Ao Vilnei Roberto Varzim

## **Agradecimentos**

À Instituição EMATER/RS-ASCAR nas pessoas do Dr. Mário Nascimento e Dr. Lino de David pela liberação para a realização deste doutorado;

Ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico da UFPEL, pela oportunidade de desenvolver meus estudos nesta instituição;

Ao meu orientador Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite, colega de graduação, colega de profissão, amigo de todas as horas e para toda a vida, pelo carinho e por ter aceitado este desafio;

À minha coorientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Daniela Brayer Pereira, colega de Mestrado, colega de profissão, amiga e suporte durante todo o curso e principalmente pela convivência diária;

À minha coorientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Márcia Arocha Gularte, grande amiga, pelo apoio e colaboração durante todo o curso.

Ao Prof. Dr. Eliezer Ávila Gandra por me orientar durante um período e disponibilizar todos os equipamentos e materiais necessários às análises do projeto;

Ao Prof. Dr. Odir Dellagostin pelo carinho e por sempre estar disposto a auxiliar;

À Dr.<sup>a</sup> Karina Magalhães-Guedes da Universidade Federal de Lavras MG pelas preciosas informações para o sequenciamento das bactérias e pelo carinho;

Às estagiárias Kathleen, Júlia, Dianine, Mariana, Jessica e ao Dr. Regis Sturbelle pelo auxílio nos experimentos;

Aos meus colegas de laboratório: Beatriz, Bruna, Franciele, Anelise, Luciana, Ana Paula, Ana Viana, Suelen, Daniele, Matheus, Michel, Daiane, Rômulo, Tiago e Alceu, que me ensinaram, me auxiliaram e me apoiaram;

Aos meus colegas da EMATER/RS-ASCAR que apoiaram e entenderam este projeto;

Às colegas Laurice Diniz da EMATER Municipal de Três Passos/RS e Regina Medeiros do Escritório Regional de Pelotas/RS pelo apoio e dedicação a este trabalho;

Ao colega Marcio Caruz Guedes, coordenador do Centro de Formação da EMATER – CETAC e aos funcionários Mario, Udo e Adão pela disponibilidade em participar dos experimentos, fornecerem os animais, realizarem as atividades de campo e não medirem esforços para que os experimentos acontecessem;

Ao Dr. Geolar DÁvila Unidade de Saúde de Três Passos pela visão de futuro, pelo amor aos pacientes e pela credibilidade neste trabalho;

Ao Dr. Paulo Antônio Sá, Filipe Saalfeld da Silveira, Vilnei Varzim e Mara Bierhals pela revisão do documento;

Às Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Helenice Gonzalez de Lima e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Patrícia Nascente, produtoras de Leite da região pelo fornecimento de colostro e apoio no curso;

Ao Médico Veterinário Christiano Fancke Weissheimer e Álcio Azambuja da Embrapa pelo fornecimento de colostro;

A todos os produtores de leite da região de Pelotas e colegas da EMATER da ESReg Pelotas que me auxiliaram no fornecimento de colostro e silagem de colostro;

Às minhas noras Kathleen e Pamela pelo carinho e amizade;

Aos meus irmãos: Milene, Ana Ilca, Márcia, Bruno Jr e Henrique por serem o esteio de minha vida;

Ao Vilnei Roberto Varzim pelo carinho, amor, apoio e presença constante;

Aos meus pais Bruno e Ilga Saalfeld que um dia decidiram que suas filhas e filhos iriam estudar; pela garra, carinho, dedicação e amor;

À minha neta Isabelle que vai ser a luz e a alegria de meus dias;

Ao Filipe Saalfeld da Silveira e Augusto Saalfeld da Silveira por tanto amor, pelo carinho, cumplicidade, companheirismo, por entenderem minha sede de aprender e estarem sempre ao meu lado;

E agradeço a Deus, meu Senhor, que me trouxe até aqui e me ensinou que a resposta vem sempre Dele,

Muito obrigada!

“A utopia está lá no horizonte. Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar”.

Eduardo Galeano

## Resumo

SAALFELD, Mara Helena. **Silagem de colostro bovino: Propriedades e potencialidades de usos**. 97 f. 2013. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O colostro é considerado essencial para bovinos recém-nascidos como fonte nutricional e transferência de imunidade passiva. A produção de colostro acima da capacidade de ingestão da bezerra permite utilizar o excedente como sucedâneo lácteo. Uma das formas de utilização é através da fermentação anaeróbica popularmente chamada de silagem de colostro. Este alimento garante ao animal ganho de peso adequado, entretanto, não existem dados sobre o resultado da fermentação anaeróbica sobre seus constituintes. Objetivou-se neste estudo avaliar as características físico-químicas, microbiológicas e imunológicas da silagem de colostro e a sua utilização como suplemento nutricional em alimentação animal e o seu uso no desenvolvimento de produtos para consumo humano. A avaliação centesimal demonstrou que o colostro possui nutrientes em quantidades superiores ao leite e que a silagem de colostro manteve os nutrientes presentes no colostro *in natura*, principalmente proteínas (14,24%), matéria seca (17,54%) e gordura (5,55%), com exceção da lactose que, após 30 dias de fermentação, não foi mais detectada. Observou-se que os valores de pH diminuíram ao mesmo tempo que houve aumento das concentrações de ácido láctico. Animais alimentados com a silagem de colostro obtiveram ganho de peso ao desmame de 0,7Kg/dia, superiores ( $p < 0.05$ ) aos animais controle (alimentados com leite) que apresentaram ganhos de peso de 0,6kg/dia. A avaliação microbiológica demonstrou que após 21 dias de fermentação, as bactérias patogênicas testadas não foram mais detectadas, restando viáveis bactérias ácido lácticas que por sequenciamento da região 16S rDNA foram identificadas como *Lactobacillus* (75%) (*L. casei*, *L. brevis*, *L. rennancily*, *L. crustorum*) e *Enterococcus* (25%) (*E. durans*, *E. faecium*, *E. faecalis* e *E. mundyji*). A avaliação das imunoglobulinas na silagem de colostro foi realizada por ELISA, ficando comprovado que após 12 meses de armazenamento a silagem de colostro manteve imunoglobulinas viáveis e estas foram transmitidas aos recém-nascidos na mesma proporção que o colostro *in natura*. Foi possível elaborar alimentos como, bebida láctea e manteiga, a partir da silagem de colostro, com manutenção das características nutricionais e microbiota constituída de bactérias ácido lácticas. A realização da análise sensorial obteve 85% de aprovação, com intenção de compra pelos avaliadores. Assim, pode-se concluir que a silagem de colostro é um alimento de elevado valor nutricional, microbiologicamente inócuo, com potencial imunológico, e que pode ser utilizado na alimentação animal após 21 dias de fermentação, necessitando adequações à legislação para o seu uso na alimentação humana.

Palavras-chave: Colostro. Bezerros. Imunoglobulinas. Silagem. Nutrição. Bactérias ácido lácticas.



## Abstract

SAALFELD, Mara Helena. **Silagem de colostro bovino: Propriedades e potencialidades de usos.** 97 f. 2013. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Colostrum is considered essential for newborns as a nutritional source and transfer for passive immunity. The production of colostrum above the calf intake capacity enables using the surplus as a milk replacer. One way of using it is through the anaerobic fermentation commonly called as colostrum silage. This food provides adequate weight gain to the animals; however, there is no data concerning the result of anaerobic fermentation on its elements. The aim of this study was to assess the physic-chemical, microbiological and immunological characteristics of the colostrum silage and its usage as nutritional supplement in animal feeding and its usage in the production of food for human usage. The centesimal assessment demonstrated that colostrum has nutrients in bigger amounts than the ones found in milk and that the colostrum silage kept the nutrients found in colostrum *in natura*, mainly the proteins (14,24%), dry matter (17,54%) and fat (5,55%), with the exception of lactose which, 30 days after fermentation was not detected anymore. It was noticed that the pH values decreased while there was an increase of lactic acid concentrations. Animals fed with colostrum silage had a weight gain at weaning of 0.7 above ( $p < 0.05$ ) the control animals (food with milk) which presented weight gains of 0.6 kg/day. The microbiological assessment showed that 21 days after fermentation the pathogenic bacteriae tested were not detected anymore, while there were still lactic acid bacteriae identified through sequencing the 16S rDNA as *Lactobacillus* (75%) and *Enterococcus* (25%). Identified as *Lactobacillus* (75%) (*L. casei*, *L. brevis*, *L. rennanqily*, *L. crustorum*) and *Enterococcus* (25%) (*E. durans*, *E. faecium* *E. faecalis* and *E. mundyii*). The immunoglobulins assessment in colostrum silage was carried out through the Immuno enzymatic method (ELISA), in which it was proved that after 12 months of storage, the colostrums silage kept feasible immunoglobulins and these were transmitted to newborns in the same proportion as the colostrum *in natura*. It was possible to elaborate foods such as dairy beverage and butter from the colostrum silage keeping the nutritional characteristics and microbiota containing lactic acid bacteria. The carrying out of sensory analysis reached an acceptance of 85% and purchasing intention from the assessors. Thus, it can be concluded that colostrums silage is a food of high nutritional value, microbiologically innocuous food, with immunological capability, and that it can be used in animal feeding with the need of proper legislation to enable its usability as human food.

**Keywords:** Colostrum. Calves. Immunoglobulins. Silage. Nutritious. Lactic acid Bacteria.

## Lista de figuras

ARTIGO 2 Evaluation of Immunoglobulin transfer of from colostrum silage to newborn calves

Figure 1 Optical density values observed in blood serum samples, colostrum and colostrum silage from the first and third milking after 12 months storage..... 49

ARTIGO 4 Sequenciamento da região 16S rDNA de bactérias ácido lácticas isoladas da silagem de colostro bovino

Figura 1 Morfologia de BAL presentes na silagem de colostro..... 73

Figura 2 Fotos dos géis após extração DNA de bactérias ácido lácticas..... 74

## Lista de tabelas

ARTIGO 1	Anaerobically fermented colostrum: an alternative for feeding calves	
Table 1	Microorganisms isolated from colostrum .....	32
Table 2	Physical-chemical evaluation of colostrum and milk hours <i>post partum</i> .....	33
Table 3	Physical-chemical evaluation of anaerobically fermented colostrum.....	34
Table 4	Average daily and cumulative weight gain (kg/day) of animals fed milk and colostrum silage .....	35
ARTIGO 2	Evaluation of the transfer of immunoglobulin from colostrum silage to newborn calves	
Table 1	Antibodies levels (OD) detected in the colostrum <i>in natura</i> , colostrum silage, animals serum and immunoglobulin transfer rate in animals in the control group and colostrums silage group.....	50
ARTIGO 3	Efeito da fermentação anaeróbica em colostro contaminado experimentalmente com bactérias patogênicas	
Tabela 1	Contagem de bactérias em silagem de colostro inoculada experimentalmente por 30 dias de fermentação.....	67
ARTIGO 5	Colostro: a redescoberta de um alimento saudável, nutritivo e com potencial probiótico.	
Tabela1	Avaliação centesimal do colostro conforme horas pós-parto .....	85

### Lista de abreviações

ANOVA	Análise de Variância
ASCAR	Associação Sulina de Crédito e Assistência Rural
BAL	Bactérias Ácido Láticas
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BHI	“Brain heart infusion”
CDTEC	Centro de Desenvolvimento Tecnológico
CenBiot	Centro de Biotecnologia
CETAC	Centro de Treinamento de Agricultores de Canguçu
°D	Graus Dórníc
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMATER	Associação Riograndense de Empreendimentos da Assistência Técnica e Extensão Rural
ELISA	“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”
EMJH	“Ellinghausen, McCullough, Johnson, and Harris Polysorbate”
IgG	Imunoglobulina G
MRS	Man, Rogosa and Sharpe
NCBI	National Center for Biotechnology information
PCR	“ <u>Polymerase Chain Reaction</u> ”
PET	“Polyethylene terephthalate” garrafas
pH	Potencial hidrogeniônico
SISPEL	Sistema de Produção Leiteira da EMBRAPA CLIMA TEMPERADO
UFC	Unidade formadora de colônias
VP	Voges-Proskauer
PFGE	“Pulsed field gel electrophoresis”
RNA	Ácido ribonucleico

## Sumário

1 Introdução .....	14
2 Objetivos.....	18
3 Artigo 1 .....	19
Abstract.....	20
Resumo .....	21
Introduction .....	22
Material and methods .....	23
Results.....	25
Discussion .....	26
Conclusion .....	28
References.....	28
4 Artigo 2.....	36
Abstract.....	37
Introduction .....	38
Material and methods .....	39
Results.....	42
Discussion .....	43
Conclusion .....	45
References.....	45
5 Artigo 3.....	51
Resumo .....	52
Abstract.....	53
Introdução.....	54
Material e métodos .....	56

Resultados .....	57
Discussão .....	58
Conclusão .....	60
Referências .....	60
6 Artigo 4 .....	68
Resumo .....	69
Abstract.....	69
Introdução .....	70
Material e métodos .....	72
Resultado.....	73
Discussão .....	74
Conclusão .....	76
Agradecimentos .....	76
Referências.....	76
7 Artigo 5 .....	79
Resumo .....	80
Abstract.....	81
Introdução .....	81
Material e métodos .....	83
Resultados e discussão .....	84
Conclusão .....	88
Referências.....	88
8 Conclusão .....	91
Referências .....	92
Anexo .....	95
Anexo Depósito de Patente .....	96

## 1. INTRODUÇÃO

O colostro bovino é constituído de produtos sintetizados pela glândula mamária e de elementos oriundos da corrente sanguínea, principalmente as imunoglobulinas (FOLEY; OTTERBY, 1978; MORRIL et al., 2012). Uma das mais importantes funções do colostro é fornecer proteção imunológica e nutrição adequada para o recém-nascido (EHRLICH, 1892; HOWE, 1921; SMITH; LITTLE, 1922; GODDEN, 2009). Comparado ao leite, o colostro do dia do parto apresenta mais nutrientes e é rico em proteínas, imunoglobulinas, minerais, vitaminas e substâncias bioativas (FOLEY; OTTERBY, 1978; GEORGIEV, 2005; KEHOE et al., 2007; GODDEN, 2009).

A composição, a concentração de imunoglobulinas e a variação físico-química do colostro bovino são influenciadas por uma série de fatores, incluindo: individualidade, raça, número de parição, ração pré-parto, duração do período seco e tempo pós-parto (KEHOE et al., 2007). As imunoglobulinas, que são transferidas da vaca para os bezerros pela ingestão de colostro e leite, podem formar um elo importante entre a experiência imunológica da mãe e a capacidade imunológica do recém-nascido (HURLEY; THEIL, 2011).

Segundo McGuirk e Collins (2004) e Kuralkar e Kuralkar (2010) o colostro constitui-se na única fonte de transferência de anticorpos nos bovinos, pois nestes não ocorre transferência pela placenta. A absorção das imunoglobulinas do colostro ocorre no epitélio intestinal do bezerro por um processo ativo em que as imunoglobulinas são transportadas pelos enterócitos até alcançarem a membrana basal (QUIGLEY, 2004). Segundo este autor, estas imunoglobulinas são absorvidas intactas, passando sem alterações estruturais durante as primeiras horas de vida para a corrente circulatória dos bezerros.

No bezerro a imunoglobulina alcança um pico de concentração sérica entre 12 e 48 horas de vida, sendo que após esse período a concentração média das imunoglobulinas tende a decrescer em decorrência do catabolismo (PAULETTI, 1999). O nível sérico de imunoglobulinas encontrado nos bezerros, após receberem o colostro, pode ser afetado pelo tempo decorrido do nascimento até a primeira

ingesta e pela concentração de imunoglobulinas ingeridas (MORIN et al., 1997; PRIESTLEY et al., 2013).

O manejo do colostro é o fator mais importante de gestão na determinação da saúde e sobrevivência dos bezerros. Segundo Garcia (1981) o colostro é estéril quando é excretado dos alvéolos mamários, porém à medida que passa pelos condutos do úbere sofre progressivas contaminações podendo ser uma fonte de exposição a micro-organismos patogênicos para o bezerro recém-nascido. A contaminação do colostro pode ter diferentes origens, como: glândula mamária; manejo da ordenha, condições de armazenamento ou equipamentos utilizados para a alimentação dos bezerros (MCGUIRK and COLLINS, 2004; STEWART et al., 2005; GODDEN, 2009). Uma estratégia de manejo do colostro é a pasteurização. Donahue (2012) demonstrou que o tratamento térmico do colostro a 60°C durante 60 minutos diminuiu as contagens microbianas do colostro, mantendo as concentrações de imunoglobulina G (IgG).

Para garantir a administração de quantidades suficientes de imunoglobulinas e alimentação livre de contaminantes, pesquisadores têm recomendado o uso de substitutos comerciais de colostro (FIDLER et al., 2011; GODDEN et al., 2012; PRIESTLEY et al., 2013). Entretanto, nem sempre estes produtos são eficientes na transmissão de anticorpos aos bezerros (PRIESTLEY et al., 2013) e representam despesas adicionais na atividade.

O sistema proteolítico de bovinos é imaturo do nascimento até três semanas, não conseguindo digerir proteínas que não sejam do leite (NRC, 2001). A impossibilidade de reduzir a idade de consumo do leite anterior às três semanas determina um alto custo da criação correta de bezerros. Assim sendo, uma das práticas utilizadas em propriedades leiteiras é o uso de sucedâneos. Na maioria das vezes, substitui-se o leite por sucedâneos de qualidade questionável constituídos por quantidades insuficientes de proteína láctea (DRACKLEY, 1999). A escolha do tipo de alimento tem um impacto significativo no crescimento, saúde e produtividade do bezerro. Com isso, há necessidade do desenvolvimento de substitutos do leite adequados para a correta alimentação dos animais (DRACKLEY, 1999). Uma das alternativas de substitutos do leite é o excedente de colostro. O colostro tem boa disponibilidade, fácil armazenamento e baixo valor comercial.



Quando há alta concentração de partos o volume de colostro acumulado é muito grande, sendo impossível utilizá-lo imediatamente (LANUZA, 1990), com médias de produção variando de 39 a 52 kg de colostro durante os primeiros quatro dias pós-parto (FOLEY e OTTERBY, 1978).

Portanto, desde 1940 são estudadas formas de sua conservação e aproveitamento na alimentação dos bezerros. Uma das possibilidades é o congelamento (ALLEN, 1944; KLOBASA et al., 1998; RAMÍREZ-SANTANA, 2012), no entanto, necessita de equipamentos para seu armazenamento (FOLEY e OTTERBY, 1978). A acidificação natural com e sem a adição de conservantes mantém viável o colostro por apenas 28 dias (LANUZA et al., 1978; CAMPOS et al., 1986; FOLEY e OTTERBY, 1978; GONZALES, 1978; CASTRO et al., 2004), necessitando maiores estudos para aumentar o tempo de armazenamento do colostro.

Contribuindo para aumentar a qualidade e o período de armazenamento do colostro, pesquisas de Saalfeld (2008) utilizaram a fermentação anaeróbica na conservação do colostro (silagem de colostro). Essa forma de conservação possibilitou manter o colostro armazenado por períodos superiores a 24 meses. A utilização da silagem de colostro proporciona ao produtor de leite uma economia de 208 litros de leite por bezerra alimentada no período de 60 dias, equivalente ao lucro da comercialização de 1220 litros de leite (SAALFELD, 2008).

A silagem de colostro não necessita de refrigeração, congelamento ou aditivos, o que contribui para o seu baixo custo de elaboração. Os animais alimentados com silagem de colostro obtiveram ganho de peso significativo superior aos observados em animais alimentados com leite, constituindo-se assim, num alimento viável para a utilização como sucedâneo do leite (SAALFELD, 2008).

Além da utilização na alimentação animal o colostro bovino *in natura* ou liofilizado está sendo utilizado em vários países como suplemento nutricional para uso humano devido a sua constituição nutricional e presença de componentes bioativos como imunoglobulinas, peptídeos antimicrobianos (por exemplo, a lactoferrina e a lactoperoxidase) e fatores de crescimento (IGF I e II e EGF) (PLAYFORD et al., 1999).

Na alimentação humana o colostro bovino é usado nos países escandinavos (OLIVEIRA, 2012), na Turquia (KALAFAT, 2011), Finlândia (GODWIN, 2011), na produção de queijos, pudim e waffles. Imigrantes alemães descrevem o uso de queijo de colostro denominado *Crost*, feito com colostro fresco, sal, açúcar e canela, assado em forno aquecido (comunicação pessoal).

As imunoglobulinas no colostro e leite bovino também oferecem oportunidades para aproveitar a sua função imunológica para o benefício de outros animais, incluindo seres humanos. A capacidade de manipular o estado imunológico dos animais por meio de vacinação contra doenças que afetam os seres humanos e a oportunidade de obtenção destas imunoglobulinas através do colostro ou leite tem sido reconhecida e continua a ser tema de interesse tanto em medicina veterinária como medicina humana (HURLEY e THEIL, 2011).

Ademais, pesquisadores têm demonstrado que as proteínas e peptídeos presentes no colostro constituem-se em suplementos alimentícios valiosos, tendo valor na indústria alimentar humana e farmacêutica (ARANDA et al., 1991; MERO, 1997; BALLONE e MOURA; 2002, THAPA, 2005; EWERS et al., 2008).

Levando em consideração volumes de colostro em média de 25 litros (primíparas) a 50 litros (multíparas) (observações pessoais) que é desprezado nas propriedades rurais e as possibilidades de uso deste alimento, objetivou-se neste estudo: avaliar as propriedades físico-químicas da silagem de colostro, estudar a microbiota presente no colostro e na silagem de colostro e o sequenciamento da região 16S rDNA destas bactérias, identificar a presença de imunoglobulinas na silagem de colostro, bem como a sua transmissão aos bezerros recém-nascidos, avaliar o desempenho de animais alimentados com silagem de colostro comparativamente, ao leite e identificar possibilidades do uso da silagem de colostro no desenvolvimento de produtos para consumo humano.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos gerais**

Avaliar as características físico-químicas, microbiológicas e imunológicas da silagem de colostro, sua utilização como suplemento nutricional em alimentação animal e também o seu potencial de uso no desenvolvimento de produtos para consumo humano.

### **2.2 Objetivos específicos**

2.2.1 Avaliar as características físico-químicas da silagem de colostro;

2.2.2 Estudar a microbiota presente na silagem de colostro;

2.2.3 Identificar a presença de imunoglobulinas presentes na silagem de colostro a avaliar a transferência para o bezerro;

2.2.4 Avaliar a silagem de colostro como possível alimento animal;

2.2.5 Identificar possibilidades de uso da silagem de colostro no desenvolvimento de produtos para consumo humano.

**3. ARTIGO 1**

**Anaerobically fermented colostrum: an alternative for feeding calves**

**Colostro fermentado anaerobicamente: uma alternativa para  
alimentação de bezerras**

**Aceito para publicação na Revista Ciência Rural**

## Anaerobically fermented colostrum: an alternative for feeding calves

### Colostro fermentado anaerobicamente: uma alternativa para alimentação de bezerras

Mara Helena Saalfeld<sup>I</sup> Daniela Isabel Brayer Pereira<sup>II</sup> Kathleen Rodrigues Krüger  
Silveira<sup>III</sup> Renata Schramm<sup>II</sup> Júlia de Souza Silveira Valente<sup>II</sup> Jéssica Lopes Borchardt<sup>II</sup>  
Márcia Arocha Gularte<sup>II</sup> Fábio Pereira Leivas Leite<sup>II\*</sup>

#### ABSTRACT

Milk or commercial milk replacer blends are the most expensive components in final costs of calves breeding. Colostrum is available and it is the appropriate sources for calves' nutrition, being an excellent option as milk substitute. Besides having both nutritional and immunological characteristics that are superior to milk, colostrum represents no costs to the producer. However, difficulties in preservation of colostrum generate controversy results. The aim of this study was to evaluate the anaerobically fermented colostrum (colostrum silage) as liquid diet for dairy calves. We evaluated the microbiological and physicochemical properties of silage, and performance of 31 animals up to 60 days age. From 21 days until 360 days of fermentation we isolated only bacteria of the genus *Lactobacillus* spp. The physicochemical evaluation of colostrum silage revealed a tendency to maintain the protein, dry matter and fat values during the evaluation period. The average weight gain of calves fed with milk was 0.6kg day<sup>-1</sup> for female and 0.6g day<sup>-1</sup> for males while those fed with colostrum silage was

---

<sup>I</sup>Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil; Emater/ASCAR- RS, Brasil.

<sup>II</sup>Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.\*Corresponding Author: Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Núcleo Biotecnologia, Campus Capão do Leão, CEP: 96010-900, Pelotas, RS, Brasil. E- mail: [fabio@leivasleite.com.br](mailto:fabio@leivasleite.com.br).

<sup>III</sup>Universidade de Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.

significantly higher ( $P < 0.05$ ) with a mean of  $0.7 \text{ kg day}^{-1}$  for female and  $0.7 \text{ kg day}^{-1}$  for males. The results of this study demonstrated that colostrum silage keeps the properties necessary for the development of the calves and is a suitable replacement for calves' milk.

**Key words:** colostrum silage, *Lactobacillus spp.*, calves nutrition.

## RESUMO

O leite ou substitutos comerciais do leite são os componentes mais caros do custo final da criação de bezerras. O colostro é uma fonte adequada de nutrientes, sendo uma excelente opção como substituto do leite. Além de ter características nutricionais e imunológicas superiores ao leite, o colostro não representa maiores custos para o produtor. No entanto, as dificuldades de preservação do colostro têm gerado resultados controversos. O objetivo deste estudo foi avaliar o colostro fermentado anaerobicamente (silagem de colostro) como dieta líquida para bezerras leiteiras. Foram avaliadas as propriedades microbiológicas e físico-químicas da silagem de colostro e o desempenho de 31 animais até 60 dias de idade. A partir de 21 dias até 360 dias de fermentação, foram isoladas apenas bactérias do género *Lactobacillus spp.* A avaliação físico-química da silagem de colostro revelou uma tendência para manter os valores de proteína, gordura e matéria seca durante o período de avaliação. O ganho médio de peso dos bezerros alimentados com leite foi de  $0,6 \text{ kg dia}^{-1}$  para as fêmeas e de  $0,6 \text{ kg dia}^{-1}$  para os machos, enquanto que o ganho médio de peso para os animais alimentados com silagem colostro foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ), com média de  $0,7 \text{ kg dia}^{-1}$  para as fêmeas e  $0,7 \text{ kg dia}^{-1}$  para os machos. Os resultados deste estudo mostram que a silagem de colostro mantém as propriedades necessárias para o desenvolvimento dos animais, sendo um substituto adequado para o leite.

**Palavras-chave:** silagem de colostro, *Lactobacillus spp.*, nutrição, bezerros.

## INTRODUCTION

Colostrum is considered fundamental to calf development, not only as food but also transmitting passive immunity (GEORGIEV, 2008; GODDEN, 2009). In the management of dairy cattle, calves receive colostrum during the first four days of life, and then colostrum is replaced by milk (LUCCI, 1989). However, milk is the farmers' product, thus feeding calves with milk has an economic impact in his income. In most cases, milk substitutes have questionable quality, since in general have insufficient milk protein in its formulation (DRACKLEY, 1999). The proteolytic system in cattle remains immature from birth until three weeks of age and they are unable to digest proteins other than from milk (NRC, 2001). Choice of feed administered has a significant impact on the growth, health, and profitability of the calves, and underlines the need to develop adequate milk substitutes for proper animal nutrition (DRACKLEY, 1999). Colostrum has nutritional characteristics superior to milk, and can be used as a substitute in animal feed (KEHOE et al., 2007). ALLEN in 1944 stored frozen colostrum for the calves for more than a year, with favorable results. Another alternative emerged with the use of naturally acidified colostrum (FOLEY & OTTERBY, 1978) or colostrum acidified with propionic acid (LANUZA et al., 1980). Although the colostrum can be acidified and retain its food quality, problems have been reported such as alopecia, diarrhea, and acceptability (CAMPOS et al., 1986). Aerobically fermented colostrum has been used in many countries since the 1970s, but has fallen into subsequent disuse (NAHMS, 1993). The anaerobic fermentation was introduced as alternative to colostrum conservation by SAALFELD (2008).

Given this, our study aimed to develop and evaluate anaerobically fermented colostrum (colostrum silage) as milk substitute.

## MATERIAL AND METHODS

### *Colostrum*

Colostrum was collected by milking multiparous Holstein cows from properties in Rio Grande do Sul state, Brazil. First and second day *post partum* colostrum was collected in 100, 226 and 200 mL polyethylene terephthalate bottles sterile (PET); filled, sealed and stored for at least 21 days at room temperature for anaerobic fermentation, resulting in a product that was designated "colostrum silage".

### *Microbiological evaluation of colostrum and colostrum silage*

Colostrum from 20 dairy cows was collected and fractionated into 20 samples of 226mL each for microbiological evaluation (n=480). The fresh colostrum was analyzed immediately, and the colostrum silage was analyzed every 7 days up to 30 days, and thereafter at 60, 90, 120, 180 and 360 days of fermentation. A 10 fold dilution series ( $10^1$ - $10^8$ ) of colostrum and colostrum silage was prepared in 1% sterile peptone water. Aliquots of 100 $\mu$ L were seeded in MacConkey, Chapman and blood (8% sheep) agar base (Difco, USA), culture media: incubated aerobically at 37°C for 24 hours, and in Man, Rogosa and Sharpe (MRS-Biobras, Brazil) medium: incubated microaerophilic at 37°C for 48 hours. The bacteria were characterized by Gram staining and biochemically to identify the genus (Catalase test, maltose fermentation, Voges Proskauer and nitrate).

### *Physicochemical evaluation of fresh colostrum and colostrum silage*

The colostrum samples (n=10 individual cows) were collected and analyzed *in natura* at calf birth, and every 12 hours up to 60 hours. After seven days milk was collected and analyzed (n=10 individual cows). The colostrum silage (n=20 individual cows) was evaluated every 7 days up to 30 days, and later at 60 days of fermentation. The physicochemical assessments were performed in duplicate according to the methodology described by the Analytical Standards INSTITUTE ADOLFO LUTZ (1985). The parameters evaluated were:



pH (measured by digital potentiometer - DM 20), acidity in Dornic degrees, lactic acid, protein (Kjeldahl digestion, factor 6.5), dry matter (oven drying method at 105°C), ash (incineration in a muffle furnace at 550°C), fat (Gerber method), and lactose (Fehling's method with minor modifications, equation 1). The modifications were as follows: we used 5mL for Fehling solutions A and B, to titrate colostrum silage filtrate was used in place of glucose at 1%. Being a sample with high protein content we added 5mL of potassium ferrocyanide at 6%, and 5ml of zinc acetate at 12%, added to the samples tested, and centrifuged for 5 minutes at (6g). The resulting contents were filtered with dry filter paper and used for titration.

Equation 1: % Lactose = (Final solution volume x 1.39x Fehling factor / spent burette volume x grams of sample in solution) x 100.

#### *Evaluation of colostrum silage as animal feed replacement*

For evaluation of colostrum silage as feed replacement, we used 31 Holstein calves of both sexes, with five days of life from the same farm. In the first five days of age the animals were fed with 4.5 liters of colostrum. Group 1 (n=17; 7 female and 10 males) was fed a diet based on whole milk; Group 2 (n=14; 9 female and 5 males) was fed a diet of silage based colostrums *in nature*, divided into twice daily. The experiment was performed from September to March (2010 and 2011). The animals were housed in mobile cabins randomly divided into two groups. The diet based in the silage was prepared as follow: After 21 days of fermentation the bottles were opened, and mixed with equal volumes of water, then were used as milk replacer for feeding the calves. The silage colostrum or milk, were given quantity of 4.5L day<sup>-1</sup> divided twice daily until 14 days, after the fifteenth day to weaning animals received 3.5L day<sup>-1</sup>, once per day. The supply of water was *ad libitum*.

After seven days, the animals received a diet supplemented with 50g day<sup>-1</sup> of pelleted commercial calve feed (Danby®). The commercial feed ingredients consisting of 16% crude

protein with the following composition: corn grain, sorghum grain, wheat bran, soybean meal, limestone, di-calcium phosphate, sodium chloride, and Premix. The commercial feed was doubled every five days until they receive 800g day<sup>-1</sup>, and this amount was maintained until weaning. The animals were weighed at birth, and at weaning (60 days) using tape weighing (HEINRICHS, 1987). The daily weight gain was calculated as the difference between final and initial weight (at day of birth) divided by the number of days contained in the period between the two weightings.

#### *Statistical analyses*

The variance analysis (ANOVA) was used for statistical analysis, and the averages were compared according to the test T at 5% significance, the program used was Statistics for Windows v. 6.0.

## **RESULTS**

The microbiological evaluation of both fresh colostrum and colostrum silage is presented in Table 1. The presence of the bacteria *Lactobacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Escherichia spp.*, *Klebsiella spp.*, *Bacillus spp.* and yeast of the genus *Candida spp.* was observed in colostrum and the silage for up to 14 days. From 21 days of fermentation we isolated only bacteria of the genus *Lactobacillus spp.* Besides microbiological analyses, we carried out physicochemical analyses from fresh colostrum up to 60 hours *post partum*. These analyses showed that there were variations in the levels of protein and dry matter during the period analyze, the other constituents remained constant (Table 2). Already the physicochemical evaluation of colostrum silage revealed a tendency to maintain the values of protein, dry matter and fat during the evaluation period. However, there was a decrease in the lactose percentage. It was observed that the pH values fell after seven days of fermentation, accompanied by the percentage increase in lactic acid (Table 3).

Evaluation of weight gain the calves receiving colostrum silage showed a significant ( $P < 0.05$ ) higher gain weight (daily and cumulative) as compared to control group (Table 4).

## DISCUSSION

Colostrum has potential for use as calf feed during the suckling period, having been recommended since the early 1950's (APPLEMAN & OWEN, 1975). Colostrum differs from milk mainly by its higher concentrations of proteins, minerals, vitamins, fats, total solids, and ash (KEHOE et al., 2007). In the present study, the chemical composition of the colostrum samples (Table 2) was in agreement to describe by KEHOE et al., (2007). It was evident that until the sixth day *post partum*, colostrum has higher protein levels than those found in milk. Although the natural composition and physicochemical characteristics of colostrum are related to various aspects inherent to the animal, including race, parity, pre-partum conditions, dry duration time, *post partum* time and feed used (FOLEY & OTTERBY, 1978), colostrum is nutritionally rich, and can be used in animal feed. However, the availability of colostrum, as well as its storage, and preservation are factors that hinder its use. Many studies have been conducted on the use of bovine colostrums (FOLEY & OTTERBY, 1978), but it has fallen into disuse since the 1980's because of difficulties involving preservation (NAHMS, 1993). LANUZA et al., (1980) demonstrated the impossibility of preserving the acidified colostrum in temperatures above 30°C. Nevertheless, we observed that maintenance of colostrum silage in temperatures above 30°C show no changes in its properties (data not shown). STEWART et al., (2005) reported that pathogenic bacteria such as *Mycobacterium avium*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* can be transmitted by the colostrum. In this work we found that colostrum samples that had been initially detected with bacteria (Table 1), was not isolated after anaerobic fermentation. We observed that the microorganisms which remained viable up to 360 days were bacteria of the genus

*Lactobacillus spp.*, suggesting that this is the microorganism responsible for fermentation. Bacteria of this genus make up the important group of lactic acid bacteria which are used as probiotics in foods for both humans and animals. The majority of pathogenic bacteria do not survive in acidic conditions (HIRSH, 2003). We can suggest that one of the factors that might contribute with the growth control of the microbial during the silage was the decrease of pH. Also, the presence of *Lactobacillus spp.* in fermented products acts by suppressing both the growth of spoilage microorganisms, as well as potentially pathogenic bacteria (BURITI & SAAD, 2007). The physicochemical analyses showed that the colostrum silage retained the characteristics necessary to meet the nutritional needs of the developing animal. The results of this study showed that even after 60 days of fermentation, colostrum tends to maintain the initial values of protein, dry matter, fat, minerals and a pH drop to 4.0. The elevation of lactic acid probably occurred due to *Lactobacillus spp.* metabolism of lactose, which after 60 days of fermentation was no longer detected. Although HAGA et al. (2008) have reported that lactose is the main energy source for pre-ruminants, in this work we infer that the fat and lactic acid present in the silage are sufficient to provide energy for animal growth. This was evident in the weight gain of the animals fed with colostrum silage which was higher than the recommended by NRC (2001). The average weight gain of calves fed with milk was 0.6kg day<sup>-1</sup> for female and 0.6kg day<sup>-1</sup> for males while those fed with colostrum silage was significantly higher (P<0.05) with a mean of 0.7kg day<sup>-1</sup> for female and 0.7kg day<sup>-1</sup> for males. One can suggest that the performance of colostrum silage fed animals is due to the higher percentage of nutrients retained in this feed. Also it is noteworthy to mention that they accepted the milk substitute (colostrum silage) with less restriction.

## CONCLUSION

The results of this study show that colostrum silage is a suitable replacement for calves' milk. It is inexpensive, and easy to produce, store, and use, as well as it requires no additives or special equipment for its preparation. Thus, anaerobically fermented colostrum is a promising milk substitutes.

## ETHICS COMMITTEE AND BIOSAFETY

The project was approved by the University Ethics Committee 23110.009613/2011-21 CEEA 9613

## ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks to dairy farmers in Southern Brazil, Center Training Farmers Canguçu RS - CETAC EMATER / RS and EMBRAPA station Lowland who collected silage colostrum and CETAC / EMATER / RS for the cession of the experimental animals.

## REFERENCES

- ALLEN, N. N. The use of stored colostrum to replace marketable milk for calf feeding. **J Dairy Sci**, v.27, p.652-653, 1944. Available from: <http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/0022-0302/PIIS0022030244926391.pdf>>. Accessed: Sept. 23, 2011.
- APPLEMAN, R. D.; OWEN, F. G. Breeding, housing, and feeding management. **J Dairy Sci**, v.58, p.447-464, 1975. Available from: [http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/0022-0302/PIIS0022030275845887.pdf?refuid=S0022-0302\(78\)83719-9&refissn=0022-0302&mis=.pdf](http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/0022-0302/PIIS0022030275845887.pdf?refuid=S0022-0302(78)83719-9&refissn=0022-0302&mis=.pdf)>. Accessed: Dec. 14, 2012. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(75)84588-7.
- 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. **Arch Latinoam Nutr**, v.57, p.373-380, 2007. Available from: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222007000400010&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222007000400010&lng=es&nrm=iso). Accessed: Dec. 14, 2012.

CAMPOS, O. F. et al. Colostro fermentado a temperatura ambiente, sem aditivos para bezerros leiteiros. **Rev Soc Bras Zoot.** v.15, p.338-349, 1986.

DRACKLEY, J.K. Critical evaluation of feeding options for replacement calves. **Adv Dairy Tech**, v.11, p.152, 1999. Available from: <http://www.wcds.ca/proc/1999/Manuscripts/Chapt%2012%20-%20Drackley.pdf>. Accessed: May, 12, 2009.

FOLEY, J.A.; OTTERBY, D.E.J. Availability, storage, treatment, composition, and feeding value of surplus colostrum: a review. **J Dairy Sci**, v.61, p.1033-1060, 1978. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030278836868>). Accessed: May, 12, 2010. doi: 10.3168/jds.S0022-0302 (78) 83686-8.

GEORGIEV, I.P. Alterations in chemical composition of colostrum in relationship to *post partum* time. **Bulg J Vet Med.**, v.8, n.1, p.35-39, 2008. Available from: <http://tru.uni-sz.bg/bjvm/vol11-no1-01.pdf>. Accessed: Dec. 23, 2012.

GODDEN, S. Microbial risks associated with feeding colostrum to calves. **Annu Mtg Southwest Nutrition and Management Conference**, p.26-27, 2009. Available from: [http://www.cals.arizona.edu/ans/swnmc/Proceedings/2009/05Godden\\_09.pdf](http://www.cals.arizona.edu/ans/swnmc/Proceedings/2009/05Godden_09.pdf). Accessed: Jan. 14, 2013.

HAGA, S. et al. Changes in hepatic key enzymes of dairy calves in early weaning production systems. **J Dairy Sci**, v.91, p.3156-3164, 2008. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030208711111>. Accessed: Apr. 13, 2011. doi: 10.3168/jds 2007-0853.

- HEINRICHS, A.J.; HARGROVE, G.L. Standards of weight and height for Holstein heifers. **J Dairy Sci**, v.70, p.653-660, 1987. Available from: <[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(87\)80055-3/abstract](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(87)80055-3/abstract)>. Accessed: Mar. 23, 2009. doi:10.3168/JDSS0022-0302(87)80055-3.
- HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2003. 446p.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. São Paulo, 1985. 533p.
- KEHOE, S.I. et al. A survey of bovine colostrum composition and colostrum management practices on Pennsylvania dairy farms. **J Dairy Sci**, v.90, p.4108-4116, 2007. Available from: <[http://www.sulostrum.com/fileuploadmaster/161628\\_Research%20Colostrum,%20Kehoe%202007.pdf](http://www.sulostrum.com/fileuploadmaster/161628_Research%20Colostrum,%20Kehoe%202007.pdf)>. Accessed: May, 10, 2010. doi: 10.3168/jds.2007-0040.
- LANUZA, F. et al. Variaciones en la composición química y microbiana del calostro acidificado a distintas temperaturas. In: REUNIÓN ANUAL DE LA SOCIEDAD CHILENA DE PRODUCCIÓN ANIMAL, IV, 1980, Valparaíso, Chile. **Anais IV Reunión anual de la Sociedad Chilena de Producción animal**, Valparaíso, Chile: Sociedad Chilena de Producción animal, 1980. p.45.
- LUCCI, C. **Bovinos leiteiros jovens**. São Paulo: Nobel/Edusp, 1989. 371p.
- NATIONAL ANIMAL HEALTH MONITORING SYSTEM. **Dairy herd management practices focusing on preweaned heifers**. USDA: APHIS, 1993. Available from: <[http://www.aphis.usda.gov/animal\\_health/nahms/dairy/downloads/ndhep/NDHEP\\_HerdMgmt.pdf](http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/dairy/downloads/ndhep/NDHEP_HerdMgmt.pdf)>. Accessed: May, 5, 2009.
- NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL). **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.ed. Washington: National Academic, 2001. Available from: <<http://www.nap.edu/openbook.php?isbn=0309069971>>. Accessed: June, 10, 2009.

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

STEWART, S. et al. Preventing bacterial contamination and proliferation during the harvest, storage, and feeding of fresh bovine colostrum. **J Dairy Sci**, v.88, p.2571-2578, 2005.

Available in: <[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(05\)72933-7/abstract](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(05)72933-7/abstract)>. Accessed: Sept. 10, 2009. doi: 10.3168/jds.S0022-0302 (05) 72933-7.



Table 1 - Microorganisms isolated from colostrum.

Microorganisms isolated	Days of fermentation						
	Day 0	Day 7	Day 14	Day 21s	Day 30	Day 60	Day 90 - 360
<b><i>Lactobacillus spp.</i></b>	$2 \times 10^7$	$6 \times 10^{10}$	$5.7 \times 10^8$	$4.3 \times 10^7$	$2.9 \times 10^7$	$2.3 \times 10^6$	$2.3 \times 10^4$
<b><i>Escherichia spp.</i></b>	$6 \times 10^7$	$24 \times 10^2$	ND	ND	ND	ND	ND
<b><i>Staphylococcus spp.</i></b>	$5 \times 10^9$	$3 \times 10^4$	ND	ND	ND	ND	ND
<b><i>Candida spp.</i></b>	$1 \times 10^1$	$1 \times 10^1$	$1 \times 10^1$	ND	ND	ND	ND
<b><i>Klebsiella spp.</i></b>	$1 \times 10^1$	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND- unidentified

Table 2 - Physical-chemical evaluation of colostrum and milk hours *post partum*.

<i>Post partum</i>	pH	Lactose(%)	Ash(%)	Protein(%)	Fat (%)	DM (%)	°D
	Média (SD)						
0 h	6.4 (0.24)	2.6 (0.44)	1.7 (0.92)	16.6 (3.57)	6.0 (0.90)	26.0 (4.48)	30 (9.25)
12h	6.2 (0.33)	2.7 (0.53)	1.6 (0.67)	16.1 (3.83)	5.6 (0.28)	19.6 (5.7)	28 (12.25)
24h	6.2 (0.13)	3.2 (0.60)	1.2 (0.028)	10.4 (3.73)	6.4 (0.63)	14.7 (0.91)	35 (5.5)
36h	6.4 (0.20)	3.1 (0.51)	1.4 (0.23)	9.5 (3.15)	5.9 (0.50)	15.3 (0.81)	25.(4.40)
48h	6.3 (0.08)	3.2 (0.42)	1.2 (0.08)	7.0 (1.44)	6.0 (0.52)	15.5 (1.40)	46 (3.53)
60h	6.3 (0.09)	3.4 (0.31)	1.2 (0.10)	6.9 (1.07)	5.9 (0.36)	14.1 (0.05)	25 (4.76)
Milk	6.6 (0.08)	4.5 (0.21)	0.6 (0.09)	3.1 (0.18)	3.7 (0.61)	12.6 (0.98)	18 (0.06)

DM = dry matter; °D = Dornic Degrees; (SD)= standard deviation

Table 3 - Physical-chemical evaluation of anaerobically fermented colostrum.

Fermentation	Protein (%)	Lactose(%)	pH	DM (%)	Ash (%)	LacticAcid	Fat (%)
Days	Média (SD)						
0	14.4 (5.1)	2.3 (0.5)	6.5 (0.1)	22.4 (4.9)	2.2 (1.1)	4.9 (1.1)	6.1 (0.7)
7	12.8 (4.5)	1.5 (0.6)	4.3 (0.3)	20.2 (4.7)	2.0 (0.9)	16.1(3.6)	5.9 (0.7)
14	13.1 (4.8)	1.1 (0.7)	4.2 (0.3)	17.3 (3.7)	2.4 (0.9)	19.5 (6.6)	5.6 (0.7)
21	14.6 (4.6)	0.8 (0.7)	4.1 (0.3)	18.5 (5.0)	1.4 (0.4)	19.5 (5.7)	5.9 (1.0)
30	13.4 (3.9)	0.76 (0.6)	4.0 (0.2)	16.5 (3.4)	1.6 (0.5)	21.1 (5.9)	5.8 (1.0)
60	14.2 (3.8)	ND (ND)	4.0 (0.2)	17.5 (4.9)	1.7 (0.6)	28.7 (4.8)	5.5 (1.0)

SD: standard deviation; ND: levels undetected; DM: Dry matter

Table 4 - Average daily and cumulative weight gain (kg/day) of animals fed milk and colostrum silage.

Parameters	Milk		Colostrum silage	
	Female (n=7)	Male (n=10)	Female (n=9)	Male (n=5)
Starting weight (kg)	33 a $\pm$ 5.1	36 a $\pm$ 4.0	38 a $\pm$ 2.7	39 a $\pm$ 5.0
Final Weight (kg)	68 b $\pm$ 5.8	69 b $\pm$ 5.3	84 a $\pm$ 6.7	84 a $\pm$ 11.6
Cumulative weight gain (kg)	34 b $\pm$ 4.2	32 b $\pm$ 5.7	46 a $\pm$ 5.7	44 a $\pm$ 7.2
Weight dairy (kg)	0.6 b $\pm$ 0.07	0.6 b $\pm$ 0.09	0.7 a $\pm$ 0.09	0.7 a $\pm$ 0.12

Different letters represent statistical difference between milk and colostrum silage.

**4 ARTIGO 2**

**Evaluation of the transfer of immunoglobulin from colostrum silage to  
newborn calves**

**Manuscrito submetido à Revista Journal Dairy Science**

**Evaluation of the transfer of immunoglobulin from colostrum silage to newborn calves**

SAALFELD, M. H. \*; PEREIRA, D. I. B<sup>†</sup>; BORCHARDT, J. L. <sup>†</sup>; STURBELLE, R.; T<sup>†</sup>. DA  
ROSA, M. C<sup>†</sup>. ; GUEDES, M.C<sup>‡</sup>. ; GULARTE, M. A. <sup>†</sup>; LEITE, P. L. F. <sup>†</sup>

\*<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil; Emater/ASCAR- RS, Brasil.

<sup>†</sup>Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil;

<sup>‡</sup> Emater/ASCAR- RS, Brasil.

\*<sup>1</sup> Corresponding Author: Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, CEP: 96010-900, Pelotas, RS, Brasil. E mail: [mara.s@brturbo.com.br](mailto:mara.s@brturbo.com.br)

**ABSTRACT**

Colostrum is the first milk produced by mammals *post partum* and it is responsible for passive immunity transfer to the newborn. Under circumstances in which colostrum *in natura* is not available, colostrum banks are essential. The colostrum silage is a method of anaerobic fermentation used as food supplement for calves with a storage period over 24 months. We focused on assessing the endurance of immunoglobulins in the colostrum after anaerobic fermentation and its absorption by newborn calves. The concentration of immunoglobulins in the blood of calves was assessed by ELISA, immediately after birth and 24 h after colostrums silage intake. The results highlighted that colostrum silage kept similar levels of immunoglobulins to the ones found in colostrum *in natura* ( $p < 0,05$ ), thus being transferred to the newborn calves with similar titers to the calves which suckled colostrum *in natura* ( $p < 0,05$ ). Therefore, in emergency situations, the colostrum silage can be used as the first food and as a source of antibodies for the sources.

Keywords: colostrum, newborn, calves, immunoglobulins, dairy cows.

## 1. INTRODUCTION

Colostrum contains components produced by the mammary glands and elements from the bloodstream, specially the immunoglobulins (Foley and Otterby, 1978; Morrill, 2012). Colostrum is produced within 5 to 7 days give birth. Its content is similar to blood, but it differs significantly from milk (Kehoe et al., 2007; Saalfeld et al., 2012). Colostrums play an important role of supplying immune protection and appropriate food to the newborn calf (Ehrlich, 1892; Howe, 1921; Godden, 2009). According to Blum and Hammon (2000) colostrum is the only source to transfer antibodies, thus being responsible for the newborn protection and modulation of immune response. The colostrums immunoglobulin absorption occurs in the neonatal intestinal epithelium in an active process in which the immunoglobulins are transferred by the enterocytes until they reach the basal membrane (Quigley, 2004).

The immunoglobulins serum level in calves might be affected by factors such as the time from birth to the first ingestion and the concentration of ingested immunoglobulins (Morin et al., 1997). Besides this, the passive immunity deriving from the colostrum reaches a peak of serum concentration between 12 and 48 hours. After this period it tends to decrease due to the catabolism (Oyeniya and Hunter, 1978; Pauletti, 2005).

The colostrum management is one of the most important management factors to determine the health and the survival of the calves. In case of death, mastitis or communicable diseases from the mother, there is the need to keep a colostrum bank at the farms to ensure the transfer of immunity to the calves.

Colostrum preservation is studied since the mid 1940s using the colostrum immunological and nutritional potential (Allen, 1944). One of the possibilities is refrigeration or freezing (Morrill, 2012), however the costs are high or even unfeasible in certain regions due to the need of storage equipment (Foley and Otterby, 1978). Natural acidification, with

and without preservatives, make the colostrum feasible for only 28 days (Foley & Otterby, 1978; Gonzales, 1978).

Contributing for a better quality and longer colostrum storage period, researches from Saalfeld in 2008 used anaerobic fermentation in the colostrums preservation (colostrums silage). This preservation enables keeping the stored colostrum for periods more than 24 months (Saalfeld et al., 2013 in press). Colostrum silage storage does not need refrigeration, freezing or additives, reinforcing its low elaboration cost. Studies proved that colostrum silage elaborated through anaerobic fermentation is a feasible food for usage as a milk replacement, keeping nutrients and feasible non-pathogenic lactic acid bacteria (Saalfeld et al., 2013 in press). However, immunoglobulin concentration data in this food have not been established yet.

Thus, the present work aimed to estimate the levels of immunoglobulins found in bovine colostrum silage and its absorption by calves.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1. Experiment Location**

The experiments were carried out at the Farmers Training Center in Canguçu – CETAC/RS from EMATER-RS/ASCAR. The lab analyses were performed at the bacteriology laboratory at the Technological Development Center, Biotechnology department of UFPel. The project was approved at the Animal Experimentation Ethics Committee at UFPel (23110.009613/2011-21 CEEA 9613).

### **2.2. Experiment 1**

#### **2.2.1. Immunoglobulin Quantification in cow serum, colostrum and colostrum silage**



In this experiment five Holstein cows were used. The blood sample was collected immediately after the birth through jugular vein puncture using needle (25 x 8) and BD Vacutainer® tubes. After clot retraction serum was centrifuged at 3000 g for 10 minutes, separated and kept at -20°C and then analyzed by the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) of 2.4 item.

Then, colostrum from the first and third milkings was collected from each cow. This was divided into samples for assessment *in natura* and samples for colostrum silage production. Colostrum *in natura* samples were stored in 100 mL bottles at -20°C until the assessment. Colostrum for colostrum silage production was stored in 500 mL polyethylene terephthalate bottles, sterile, fully, filled, closed and stored for fermentation in environment protected from heat and light for 12 months (Saalfeld et al., 2008). The amount of immunoglobulins was established by ELISA, as mentioned in 2.4 item.

## **2.3 Experiment 2**

### **2.3.1. *In vivo* transfer of immunoglobulins found in colostrum silage**

To assess the immunoglobulins absorption level by the calves, the experiment was carried out with two treatments. The data were expressed as absorption rate means the OD obtained from the assessment of immunoglobulins in colostrum or colostrum silage divided by the OD obtained in the serum of the animals after the administration of foods.

Colostrum silage group (CSG): Calves, females (n=7) being fed with colostrum silage. Colostrum silage was produced with first milking colostrum as mentioned by Saalfeld (2008), and was stored for 12 months. The colostrum silage sample used in the feeding of calves was sent for immunoglobulins assessment.

Immediately after birth, a blood sample from the calves was collected through jugular vein puncture using needle (25 x 8) and BD Vacutainer® tubes. After clot retraction, serum was centrifuged at 3000 g for 10 minutes, separated and kept at -20°C to then be analyzed by

the ELISA method. Then calves were fed with 500 mL of colostrum silage without dilution and warmed in water bath at 37°C. The calves were fed with four liters of colostrum silage divided in two moments, with an eight-hour interval. After 24 hours of age, the second blood sample was collected.

Control Group (CG): Calves, females (n=7) suckling colostrum from the cow. Immediately after birth, blood from the calves was collected through jugular vein puncture using needle (25X8) and BD Vacutainer® tubes. After clot retraction, serum was centrifuged at 3.000 g for 10 minutes, separated and kept at -20°C to be analyzed by the ELISA. The calves remained with the cow for 24 hours suckling *ad libidum*. After 24 hours of age, a second blood sample was collected from the calves as mentioned above.

#### **2.4. Indirect ELISA**

Colostrum *in natura* and colostrum silage samples was centrifuged at 8.000g for 10 minutes for pellet precipitation. A BD 40mm x 12 mm needle was introduced through the fat and serum was taken for assessment by indirect ELISA. All samples were performed in duplicate.

To assessment of antibodies presence in the samples was carried by ELISA, using as antigen a sample of *Escherichia coli* K99 from the Immunology Laboratory of the Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Biotechnology department from UFPel.

Plates with 96 cavities (NUNCK) were used to carry out the tests. *E. coli*  $2 \times 10^8$  UFC/mL was suspended in carbonate-bicarbonate buffer of pH 9.6. The plates were sensitized with 100µL of antigen samples and were incubated at 37°C for 1h 30min. Then, they were washed 3 times with Phosphate Buffered saline with tween-PBST pH 7,6 and 100µL diluted 1:40 of test serum was added in each well, and incubated at 37°C for 1 h. After that, it was washed 3 times with PBST, an anti-bovine conjugate was added (Sigma) (1:4000) and once

again incubation at 37°C for 1h 30min. Washing was done 5 more times with PBST, with the addition of chromogenic substrate (SIGMAFAST™ OPD) keeping the material in the dark for 15 minutes at room temperature. The reaction was stopped with sulphuric acid 1N, and the absorbance's were measured in a microplate reader (MR 700 Microplate reader) at 450 nm.

### 5 Statistical analysis

The analysis of variance (ANOVA) was used for statistical analysis, and the averages were compared according to the test Tukey at 5% significance for comparison between samples of food and T-Test to evaluate between calves, the program used was Statistics for Windows v. 6.0.

### 3. RESULTS

Optical density values (OD) observed in the first milking colostrum silage (2.485 OD) did not differ ( $p < 0.05$ ) in relation to the OD values found in the colostrums *in natura* (2.613 DO). On the other hand, the levels of immunoglobulins in the blood serum collected at birth were lower (2.236 OD) ( $p < 0.05$ ) than the ones observed in the colostrum and colostrum silage. When the colostrums silage from the third milking was assessed, an OD value of 0.390 was highlighted, 84.31% lower ( $p < 0.05$ ) than the ones observed in the first milking colostrums silage (2.85 OD) (Figure 1).

When assessing the immunoglobulin serum levels, both in the CG calves and in the CSG calves, no circulating antibodies levels were detected at birth. However, 24 hours after administration of colostrum *in natura* and colostrum silage these levels were 1.808(OD) and 1.216 (OD) respectively.

In both groups the immunoglobulin absorption rate did not present significant difference ( $p < 0.05$ ) (Table 1).

#### 4. DISCUSSION

The necessity of colostrum ingestion for bovines is known for many years (Howe, 1921), as they do not transfer immunoglobulins through the placenta (Kuralkar and Kuralkar, 2010). Especially in the prevention of neonatal diarrhea which are the cause of morbidity and mortality calves in the first weeks of life (Games et al., 2006). The moment, quantity and quality of colostrum intake are fundamental for the passive immunity in calves (Franklin et al., 2003). If it is impossible to feed colostrum *in natura*, the availability of other sources of immunoglobulins for calves is rather important. For a long time, the refrigeration of colostrums has been recommended to preserve it as food and as a source of antibodies (Morris et al., 2012).

Recent studies have shown that the colostrum anaerobic fermented, called colostrum silage, keeps the nutritional features and it can be used as a milk replacer for calves (Saalfeld, 2008; Saalfeld et al., 2013 in press). However, so far this food had not been assessed in terms of immunoglobulin levels.

In the present study, the assessment of calves' blood serum from the Colostrum group (CG) and Colostrum silage group (CSG) showed that, in both groups, the animals did not present detectable levels of circulating antibodies at the birth. Twenty hours after colostrum silage intake the absorption rate of the immunoglobulins was similar to the animals which suckled colostrum *ad libitum* from their mothers. Although Snyder et al. (1974) e Foley et al. (1978) reported differences in the absorption levels of antibodies when fermented colostrum aerobically and frozen colostrum were used, our results differ and show that the absorption level was similar. This suggests that colostrums silage might be recommended as a food and source of immunoglobulins. In this study we observed that colostrums silage kept enough immunoglobulins to be transferred antibodies to the animals with no difference when compared with values found in colostrum *in natura* and in colostrum silage.

Studies from Hancock (1985) report that the minimal quantities of serum immunoglobulins should be passively acquired in the calves first hours of age may range among the authors. Even though quantifying the minimum amount of Ig of needed to provide immunity to the newborn was not the focus of the present study, one can be noticed that colostrum silage could supply the needed immunoglobulins to ensure the calves survival, as the ones in this study fed with colostrum silage were followed up for 12 months of age did not present health problems during their development. Thus, this food can be used to replace colostrums as a source of antibodies. Similar results were reported in studies from Carlson and Müller (1977) when studying the content of immunoglobulins between the refrigerated stored colostrums and the naturally acidified colostrum. Foley et al. (1978) concluded that the aerobically fermented colostrum is a potential source of antibodies for newborn calves when the maternal colostrums are not available. However, the short storage period of colostrum makes it difficult to have colostrum banks. Opposing this information, Saalfeld et al. (2013 in press) states that colostrum silage is a practical way to store it with no cost and it can be stored for period longer than 24 months. Besides this, in the present study it was noticed that the colostrum silage kept the levels of immunoglobulins suitable to calves administration. A decline in the level of immunoglobulins in cow serum at birth in relation to colostrum *in natura* detected in this study, agree with the findings of Sasaki et al. (1976) who state that the decline in serum concentration of immunoglobulins during the pre-natal period is associated to active removal of these antibodies by the mammary gland. Later, Foley and Otterby (1978) demonstrated that during the last three weeks before birth, 500 to 700 grams of immunoglobulins are transferred from the blood to the milk secretions.

The levels of antibodies in first milking colostrum silage were higher than the ones found in the third milking. This data agrees with Morrill et al. (2012) who mentioned that at birth the concentration of immunoglobulins in the colostrum is at its peak and declines at each

milking in the post-natal period. Pauletti (2005) states that the average concentration of immunoglobulins in Holstein cows starts to decline between the colostrums 12 and 24 hours after the birth. The results found in this study suggest that first milking silage should be chosen for colostrum banks. However, colostrums silage produced up to third milking colostrums might be the only source of immunoglobulins and food available to the calf and should be used in emergency situations.

## 5. CONCLUSION

Colostrum silage keeps the levels of immunoglobulins, being able to transfer passive immunity to newborn calves and it may be indicated for colostrum banks at dairy farms. So far all calves treated with colostrums silage as their first food have grown properly.

## 6. REFERENCES:

- Allen, N.N. 2011. The Use of stored colostrum to replace marketable milk for calf feeding. **J. Dairy Sci.** v.27, p.652-653, 1944. Available in: <http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/0022-0302/PIIS0022030244926391.pdf>>. Accessed 23 september,
- Blum, J. W and Hammon, H. 2000. Colostrum effects on the gastrointestinal tract, and on nutritional, endocrine and metabolic parameters in neonatal Calves *Livestock Production Science* 66 151–159 ISSN 0301-6226, [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-6226\(00\)00222-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-6226(00)00222-0), Acesso em 10/01/2013 disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301622600002220>
- Carlson, S. M. A.; and Muller, L. D. 1977. Compositional and metabolic evaluation of colostrum preserved by four methods during warm ambient temperatures. *J. Dairy Sci.* 1 April., 60: 566-571 DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(77)83903-9)
- Ehrlich, P. 1892. Ueber Tmmunitat Durch Vererbung Und S-Augung., "in 12 ed: 183-203

Franklin, S. T.; Amaral-Phillips, D. M.; Jackson, J. A. AND Campbell A. 2003. A Health and Performance of Holstein Calves that Suckled or Were Hand-Fed Colostrum and Were Fed One of Three Physical Forms of Starter<sup>1</sup> Lexington J. Dairy Sci. 86:2145–2153

Foley J. A.; A. Hunter, G. and . Otterby, D. E. 1978. Absorption of Colostral Proteins by Newborn Calves Fed Unfermented, Fermented, or Buffered Colostrum <sup>1</sup>Department of Animal Science University of Minnesota St. Paul 55108 J Dairy Sci 61:1450-1456

Gamez, H. A. J.; Rigobelo E. C. ; Fernandes S. A. ; Marin J. M.; Ávila F.A. Diarréia bovina: estudo da etiologia, virulência e resistência a antimicrobianos de agentes isolados de bezerros da região de ribeirão preto – SP, BRASIL. ARS VETERINARIA, Jaboticabal, SP, Vol. 22, nº1, 022-030, 2006.

Godden, S. 2009. Microbial risks associated with feeding colostrum to calves. **ANNU. MTG. SOUTHWEST NUTRITION AND MANAGEMENT CONFERENCE**. Tempe, AZ. 26-27.

KURALKAR, P.; Kuralkar, S. V. 2010. "Nutritional and Immunological Importance of Colostrum for the new born." Veterinary World 3.1 : 46-47.

Howe, P. E. 1921. An effect of the ingestion of colostrum upon the composition of the blood of new-born calves. Am. J. Dis. Child. V.21, p. 57.

Kehoe S. I.; Jayarao, B.M.; Heinrichs A. J. A. 2007. Survey of Bovine Colostrum Composition and Colostrum Management Practices on Pennsylvania Dairy Farms<sup>1</sup>. Journal of Dairy Science. 90:4108–4116.

Klobasa F.; Goel M. C. and Werhahn, E. 1998. Comparison of freezing and lyophilizing for preservation of colostrum as a source of immunoglobulins for calves **J ANIM SCI**. 76:923-926.

- Morrill, K. M.; Conrad, E.; Lago A., Campbell, J.; Quigley, J.; Tyler, H. 2012. Nationwide evaluation of quality and composition of colostrum on dairy farms in the United States *Journal of dairy science*. 95 ,7 : 3997-4005 DOI: 10.3168/jds.2011-5174)
- Morin, D. E.; Mccoy, G.C.; Hurley, W. L. 1997. Effects of quality, quantity, and timing of colostrum feeding and addition of a dried colostrum supplement on immunogloblin G1 absorção in Holstein bull calves. *Journal of Dairy Science* , Champaign, Ill., US, 80.4:747-753, [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)75994-0](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)75994-0),
- Müller, L. D.; Ellinger, D. K. 1981. Colostral immunoglobulin concentration among breeds os dairy cattle. *Journal Dairy Science*, v. 9: 1727-1730.
- Oyeniya, O. O. and Hunter A. G. 1978. Colostral Constituents Including Immunoglobulins in the First Three Milkings *Post partum* *Journal of Dairy Science*. Champaign, Ill., US, 61,1: 44-48.
- Pauletti, P.; Bagaldo, A. R.; Kindlein, L, De Paz, C. C. P.; Lanna, D. P. D.; Machado Neto, R. 2005. IGF-I e IgG séricos e nas secreções lácteas em vacas tratadas com rbST no período pré-parto. *Revista Brasileira de Zootecnia* 34, 976–986. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982005000300031>
- Quigley, J. 2004. The role of oral immunoglobulins in systemic and intestinal immunity of neonatal calves. Diamond V Mills, Cedar Rapid,Iowa, USA.
- Saalfeld, M. H. 2008. Uso da Silagem de Colostro como substituto do Leite na Alimentação de terneiras leiteiras *Revista : A Hora Veterinária*. 162: 59-62.
- Saalfeld, M. H.; Pereira D. I. B.; Silveira K. R. K.; Granda, E.; Gularte, M. A. e Leite, F. P. L. Silagem de colostro: alternativa sustentável para minimizar a fome no mundo. **4º SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR- 4**. 2012 Gramado Anais. Gramado: FAURGs Rs, 2012.



Saalfeld, M. H.; Pereira, D. I. B.; Silveira, K. R. K.; Schramm, R.; Valente, J. S. S.;

Borchardt, J.; Gularte M. A.; Leite, F. P. L. 2013. Anaerobically fermented colostrum: an alternative for feeding calves. *Ciencia Rural* (in press).

Sasaki, M.; Davis, C. L.; Larson, B. L. 1976. Production and turnover of IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2</sub> immunoglobulins in the bovine around parturition. **Journal of Dairy Science**,59.12: 2046-2055,

Snyder, A. C.; Schuh, J. D.; Wegner, T. N.; AND Gebert, J. R. 1974. Passive immunization of the newborn dairy calf via fermented colostrum. *J. Dairy Sci.* 57 (Suppl.1):641.

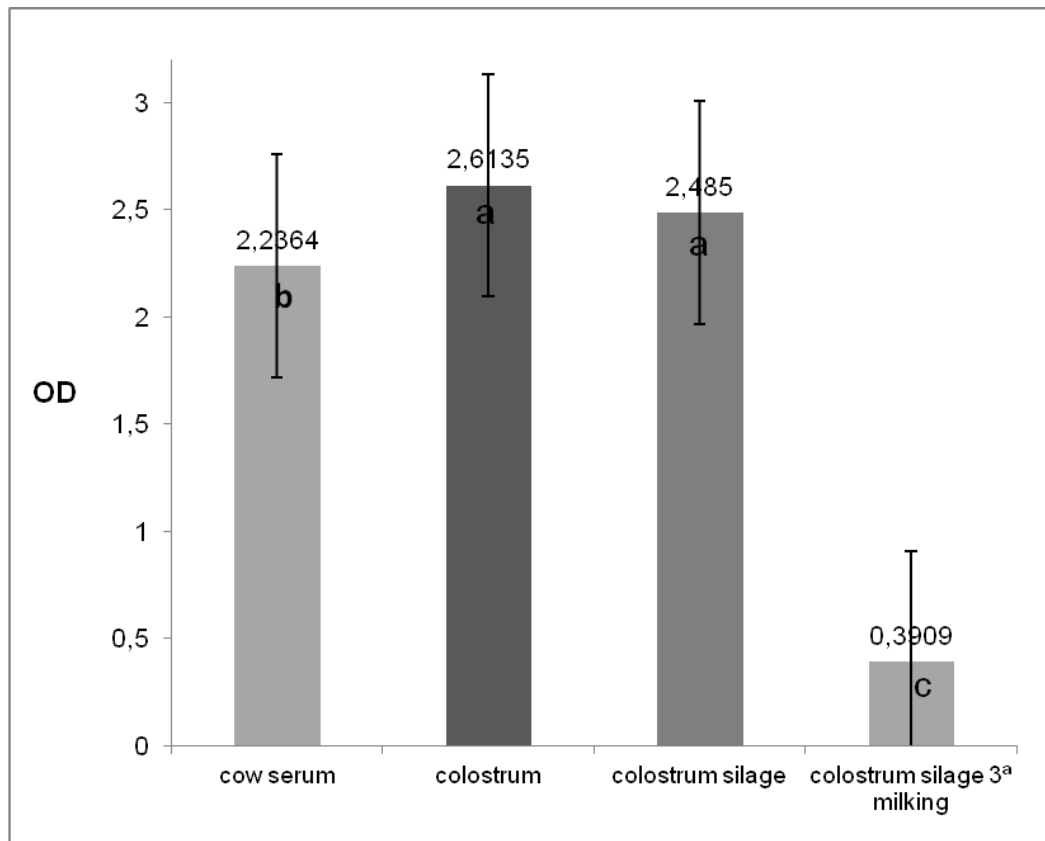


Figure 1: Optical density (OD) values observed in blood serum samples, colostrum and colostrum silage from the first and third milking after 12 months storage. Distinct averages, differing by the Tukey test ( $p < 0.05$ ).

Table 1: Antibodies levels (OD) detected in the colostrum *in natura*, colostrum silage, animals serum and immunoglobulin transfer rate in animals in the control group and colostrums silage group.

Control Group				Colostrum Silage Group			
Calves	Optical Density			Calves	Optical Density		
	Colostrum	Calf serum	Transfer rate		Colostrum Silage	Calf Serum	Transfer rate
1	2.759	2.652	1.04	1	2.631	1.399	1.88
2	2.448	1.868	1.31	2	1.384	1.06	1.30
3	2.553	1.942	1.31	3	2.126	1.996	1.06
4	2.371	1.886	1.257	4	2.632	1.292	2.03
5	2.656	2.57	1.033	5	2.394	1.363	1.75
6	2.4675	0.986	2.5	6	1.378	0.676	2.03
7	2.646	0.757	3.49	7	1.274	0.728	1.75
Average	2.557 <sup>a</sup>	1.808 <sup>a</sup>	1.70 <sup>a</sup>	Average	1.974 <sup>a</sup>	1.216 <sup>a</sup>	1.68 <sup>a</sup>

Distinct averages. differing by the Tukey test ( $p < 0.05$ ).

**5 ARTIGO 3**

**Efeito da fermentação anaeróbica em colostro contaminado  
experimentalmente com bactérias patogênicas**

**Manuscrito para submissão à Ciência Rural**

**Efeito da fermentação anaeróbica em colostro contaminado experimentalmente com bactérias patogênicas**

**Effect of anaerobic fermentation in colostrum experimentally contaminated with pathogenic bacteria**

**\*Mara Helena Saalfeld<sup>I</sup> Daniela Isabel Brayer Pereira<sup>II</sup> Júlia de Souza Silveira Valente<sup>II</sup>  
Jéssica Lopes Borchardt<sup>II</sup> Christiano Fanck Weissheimer<sup>III</sup> Márcia Arocha Gularte<sup>II</sup>  
Fábio Pereira Leivas Leite<sup>II</sup>**

**RESUMO**

Para garantir a saúde e sobrevivência dos bezerros nas propriedades leiteiras é necessário um programa eficiente de manejo fornecendo colostro de alta qualidade e em quantidades adequadas. A utilização de sucedâneos é necessária quando o colostro apresenta qualidade inadequada ou para quebrar o ciclo de transmissão de doenças infecciosas. Nesse experimento objetivou-se avaliar o efeito do processo de fermentação anaeróbica da silagem de colostro sobre bactérias de interesse em sanidade animal. Cada amostra de colostro foi inoculada experimentalmente com culturas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Brucella abortus* cepa vacinal B-19, *Leptospira icterohaemorrhagiae* e *Mycobacterium bovis*-BCG e submetidas ao processo de ensilagem. No dia zero e a cada sete dias até 30 dias de fermentação as amostras foram submetidas à coloração de Gram e avaliadas por meio de contagem de unidades formadoras de colônias. Com sete dias de fermentação não foram mais detectadas unidades formadoras de colônias de *B. abortus*, *L. icterohaemorrhagiae* e *M. bovis*-BCG e, com 14 dias de fermentação não foram detectadas unidades formadoras de colônias de *E. coli*, *S. aureus*, permanecendo bactérias ácido lácticas *B. cereus* até 30 dias de fermentação.

---

<sup>I</sup>Federal University of Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil; Emater/ASCAR- RS, Brazil. .\*Corresponding Author: CDTEC, Núcleo Biotecnologia, Campus Capão do Leão, CEP: 96010-900, Pelotas, RS, Brasil. E- mail: [mara.s@brturbo.com.br](mailto:mara.s@brturbo.com.br)

<sup>II</sup>Federal University of Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

<sup>III</sup>Embrapa Clima Temperado.

Conclui-se que o processo de fermentação anaeróbica teve efeito bactericida sobre bactérias patogênicas pesquisadas neste experimento. Estas observações sugerem que a silagem de colostro é uma forma eficaz e inócua de conservação do colostro.

Palavras-chave: silagem de colostro, bactérias ácido lácticas, bezerros, sucedâneos do leite.

#### ABSTRACT:

To assure the health and survival of calves in dairy milk farms, an efficient handling program is needed, providing high quality colostrum in adequate amounts. The usage of replacers is necessary when colostrum presents inadequate quality or to break the cycle of infectious diseases transmission. In this experiment we aimed to assess the effect of the colostrums silage anaerobic fermentation process on bacteria of interest of animal health. Colostrum silage was experimentally inoculated with *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* (a probiotic strain), *Brucella abortus* B-19 (vaccinal strain), *Leptospira icterohaemorrhagiae* and *Mycobacterium bovis*-BCG. On the first day, and every seven days until 30 days after fermentation, the samples were submitted to Gram staining and evaluated by colony forming units. With seven days of fermentation no *B. abortus*, *L. icterohaemorrhagiae* nor *M. bovis*-BCG were detected. With 14 days of fermentation no *E. coli* or *S. aureus* were detected, however we were able to detect lactic acid bacteria and *B. cereus* until 30 days of fermentation. From this study we can suggest that the anaerobic fermentation process has an efficient bactericidal effects on pathogenic bacteria studied. These observations suggest that the colostrums silage is a promising form for colostrum conservation.

Keywords: Colostrum silage, lactic acid bacteria, milk replacers.

## INTRODUÇÃO

O colostro é o primeiro leite produzido pela fêmea após o parto sendo rico em nutrientes, imunoglobulinas, minerais, vitaminas e substâncias bioativas (GODDEN, 2009; KURALKAR & KURALKAR, 2010). Em vacas saudáveis o colostro é estéril quando sai dos alvéolos mamários mas progressivamente pode se contaminar à medida que passa pelos conductos do úbere. A ordenha higiênica e a manutenção do colostro em temperatura adequada determina pequena multiplicação bacteriana devido às propriedades bacteriostáticas do colostro (GARCIA, 1981). Todavia, a partir de duas horas o colostro está sujeito a grande multiplicação bacteriana (GARCIA, 1981), podendo representar a primeira exposição das bezerras a agentes infecciosos (GODDEN, 2009).

Fatores como ausência de higiene na preparação da vaca para a ordenha, baldes ou mamadeiras contaminadas ou excessivo tempo entre as ordenhas e a amamentação podem predispor à multiplicação de micro-organismos no colostro fresco que será ingerido pelos animais (STEWART et al., 2005). Uma opção para melhorar a qualidade do colostro é a pasteurização, entretanto a temperatura é limitante, pois resulta na desnaturação de 12 a 30% da imunoglobulina G, podendo também resultar em aumento significativo na viscosidade (STABEL, 2004).

Bactérias patogênicas como *Mycoplasma spp.*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter spp.*, podem estar presentes no colostro devido à contaminação da glândula mamária, à contaminação pós-ordenha ou à proliferação bacteriana em colostro armazenado de modo inadequado (STABEL, 2004). MCGUIRK & COLLINS (2004) acrescentam a esta lista *Staphylococcus aureus*, vírus da diarreia viral bovina e o vírus da leucemia bovina que podem resultar em risco de transmissão de doenças. Entretanto é

importante ressaltar que vacas com doenças infecciosas e zoonoses não podem estar na linha de ordenha (BRASIL, 2011).

Para garantir a administração de alimentação livre de contaminantes, pesquisadores têm recomendado o uso de substitutos comerciais de colostro (FIDLER, 2011; GODDEN, 2012; PRIESTLEY, 2013). Entretanto nem sempre estes produtos são eficientes na transmissão de anticorpos aos filhotes (PRIESTLEY, 2013) representando custos adicionais aos produtores.

A maioria das vacas produz quantidades de colostro acima da capacidade de ingestão da bezerra (39 a 52 kg) durante os primeiros quatro dias pós-parto (FOLEY & OTTERBY, 1978), existindo possibilidade de armazenamento do excedente por congelamento (ALLEN in 1944.; KLOBASA, 1998.; RAMÍREZ-SANTANA, 2012), acidificação aeróbica (FOLEY & OTTERBY, 1978) ou utilização de conservantes e antibióticos (GARCIA, 1981). A partir de 2008 a silagem de colostro foi introduzida como uma alternativa de conservação do colostro por SAALFELD (2008) no Brasil.

A silagem de colostro é um alimento originado pela fermentação anaeróbica do colostro preservando os constituintes nutricionais (SAALFELD et al., 2012), e imunoglobulinas, sendo estas transferidas aos bezerros (SAALFELD et al., 2013 no prelo).

Estudos demonstraram (GILLES et al., 2002; GODDEN, et al., 2009) que embora o colostro na forma *in natura* apresente contaminação microbiana ambiental, após 21 dias de fermentação anaeróbica apenas bactérias ácido lácticas (BAL) continuam viáveis (SAALFELD et al., 2013 no prelo). Objetivou-se neste trabalho avaliar se o processo de fermentação anaeróbica da silagem de colostro tem efeito bactericida sobre micro-organismos causadores de doenças infecciosas em bovinos.



## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1: Avaliação da contaminação experimental do colostro

O colostro foi obtido através de ordenha mecânica de duas vacas holandesas do Centro de Treinamento de Agricultores da EMATER – CETAC em Canguçu RS, obedecendo as normas de higiene estabelecidas na Instrução Normativa 62 do Ministério da Agricultura e Pecuária (BRASIL, 2011). O colostro ordenhado no segundo dia pós-parto, foi transportado sob refrigeração ao laboratório de microbiologia da UFPel e dividido em sete alíquotas de 1200 mL. As amostras foram contaminadas experimentalmente com uma das seguintes bactérias: *Mycobacterium bovis* BCG ( $5 \times 10^6$  UFC/mL), *Brucella abortus* cepa vacinal B-19 (Meril) ( $4 \times 10^9$  UFC/mL), *Leptospira icterohaemorrhagiae* ( $1 \times 10^7$  UFC/mL), *Staphylococcus aureus* ( $5 \times 10^9$  UFC /mL), *Escherichia coli* ( $6 \times 10^7$  UFC/mL), e *Bacillus cereus* cepa probiótica do laboratório de bacteriologia do CDTEC ( $6 \times 10^7$  UFC/mL), gentilmente cedidas pelo laboratório de Bacteriologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da UFPel – CDTEC. Uma amostra foi armazenada sem inoculação constituindo-se no controle negativo na qual foi realizada a contagem das BAL.

Cada uma das amostras de colostro de 1200 mL foi inoculada com uma das espécies bacterianas, ficando uma amostra sem inoculação. Cada amostra inoculada foi acondicionada em cinco garrafas de Politereftalato de etileno (PET) de 226 mL, preenchidas completamente, fechadas e armazenadas para produção da silagem de colostro.

A contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de cada bactéria avaliada foi realizada por diluição seriada imediatamente após a inoculação inicial e a cada sete dias de fermentação até 30 dias de armazenamento. Diluiu-se 1 mL de colostro inoculando em 9 mL ( $10^{-1}$ ) de água peptonada até diluição  $10^{-10}$ . Todas as avaliações foram feitas em duplicata. Uma alíquota de 1 mL de cada diluição foi plaqueada pelo método de espalhamento em superfície com alça de Drigalski, em ágar BHI - Brain Heart Infusion (Difco II, EUA), para *B.*

*cereus*; ágar Chapman (Difco II, EUA), para *S. aureus*; ágar MacConkey (Difco II, EUA) para *E. coli* sendo incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Para contagem de *M. bovis-BCG* utilizou-se o meio de cultivo 7H10 Middlebrook (Difco, EUA), incubado a 35 a 37 °C por 21 dias. Já para *L. icterohaemorrhagiae* em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) enriquecidos com 10% EMJH suplemento (Difco, EUA), incubado a 30°C, por sete dias e para *B. abortus* usou-se ágar Thayer-Martin e ágar sangue ovino (Difco II, USA), incubado a 37 °C por 10 dias. A amostra controle (sem inoculação) foi plaqueada em ágar sangue ovino (Difco, EUA) e incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas para avaliar microbiota do colostro e ágar MRS (Man, Rogosa e Sharpe - Biobras) incubadas em estufa a 37 °C por 48 horas em microaerofilia para contagem das BAL.

A contagem das unidades formadoras de colônias foi feita através do contador de colônias, em placas que apresentavam entre 30 e 300 UFC. As BAL foram submetidas às provas de catalase, maltose, VP (Voges-Proskauer) e nitrato para identificação de gênero (BARROS, 2009; GARCIA, 2009).

### **3. RESULTADOS**

Na tabela 1 estão apresentados os resultados da identificação e quantificação das bactérias. Após sete dias de fermentação não foram identificadas UFC de *B. abortus*, *L. icterohaemorrhagiae* e *M. bovis-BCG* na silagem de colostro. Após 14 dias de fermentação bactérias do gênero *E.coli* e *S.aureus* não foram mais detectadas.

Na amostra utilizada como controle, após 14 dias de fermentação, apenas BAL foram identificadas. Houve um aumento nas UFC das BAL em torno de sete dias de fermentação e aos 14 dias foi observado um declínio da microbiota ficando estabilizado em torno de 10<sup>7</sup> UFC até 30 dias de armazenamento (tabela 1). A avaliação morfológica e bioquímica revelou a presença de bacilos ou cocobacilos, Gram positivos isolados ou em cadeias, catalase e

nitrito negativos e prova de maltose e VP variáveis. Estas características permitiram classificar as bactérias ácido lácticas isoladas no provável gênero *Lactobacillus*.

#### 4. DISCUSSÃO

O colostro é o principal alimento para bezerros recém-nascidos, entretanto a sua contaminação microbiana pode causar enfermidades e interferir na absorção passiva de anticorpos (GODDEN, 2009). Em experimentos anteriores com a silagem de colostro, após 21 dias de fermentação anaeróbica não foram detectadas enterobactérias, mofos e leveduras (SAALFELD et al., 2013 no prelo). Neste experimento observou-se que após o processo de fermentação do colostro não foram detectadas bactérias de importância em sanidade animal. Embora não tenha sido objetivo deste trabalho avaliar agentes causadores de doenças infecciosas e zoonoses, é importante ressaltar que animais acometidos por enfermidades não podem fazer parte de linha de ordenha (BRASIL, 2011). No presente estudo, ficou demonstrado que após sete dias de fermentação o crescimento das bactérias patogênicas *L. icterohaemorrhagiae*, *B. abortus* e *M. bovis-BCG* não pode ser detectado pela técnica realizada. Da mesma forma, *S. aureus* e *E. coli* não apresentaram crescimento após 14 dias de fermentação do colostro. É provável que este fato deva-se ao pH da silagem de colostro que em média apresenta valores em torno de 3,6 a 4,2 (SAALFELD et al., 2012). Estudos anteriores de PORTAELS & PALTYN (1982) afirmam que o pH ótimo para o crescimento de *M. bovis* varia entre 5,8 e 6,5. Já para a *B. abortus* esses valores variam de 6,6 a 7,4 (PAULIN, 2003) e para *Leptospira spp.* de 7,2 a 7,8 (AVILA, 1998). Provavelmente o pH abaixo do ótimo para estas bactérias foi um dos fatores que interferiu no desenvolvimento das mesmas na silagem de colostro.

Em relação ao *B. cereus*, bactéria caracterizada como probiótica (TURNES, 1999), houve uma diminuição inicial na contagem bacteriana, a qual se manteve constante, em  $2,7 \times 10^3$ , até 30 dias de armazenamento. A resistência deste gênero ao processo de fermentação provavelmente está relacionado à sua capacidade de esporulação (BARBOSA & TORRES, 2000). RAEVUORI & GENIGEORGIS (1975) descreveu o crescimento de *B. cereus* em valores de pH variando de 4,3 a 9,3.

A permanência do *B. cereus* após o período de fermentação deve ser considerada e melhor avaliada, pois embora a maioria das culturas de *B. cereus* sejam classificadas como saprófitas (FLORIANO & ZAPPA, 2011) e caracterizadas como probióticas (TURNES, 1999), algumas cepas podem estar associadas à ocorrência de surtos de doenças de origem alimentar (MENDES, 2004).

A diminuição do pH do colostro aos sete dias de fermentação foi acompanhado pelo aumento nas UFC das bactérias ácidos lácticas (SAALFELD et al., 2013, no prelo). Estas bactérias desdobram lactose em ácido láctico tornando o meio ácido. Durante o período de armazenamento a contagem de BAL ficou estabilizada em torno de  $10^7$  UFC. Em 2012, SAALFELD et al. avaliaram amostras de silagem de colostro por até 24 meses de armazenamento, concluindo que as BAL mantiveram-se viáveis durante todo o período avaliado. Além da ação do pH, as bactérias lácticas têm capacidade de produzir compostos antimicrobianos denominados bacteriocinas (FULLER, 1989; BURITI & SAAD., 2007) e outras substâncias inibitórias, tais como: peróxido de hidrogênio, diacetil, metabólitos de oxigênio, entre outras (PIARD & DESMAZEAUD, 1991). Muitas bactérias lácticas têm importante papel na produção de alimentos fermentados, pela inibição do crescimento de uma ampla variedade de organismos deteriorantes de alimentos (JACK, 1995). Estudos demonstram que gêneros de bactérias consideradas ácido lácticas, assim como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Leuconstoc* e *Streptococcus thermophilus* apresentam potencial probiótico (HOLZAPFEL, 2001; GIRAFFA, 2003; BURITI, 2007; BARROS, 2009), sendo utilizadas na elaboração em produtos de laticínios, sobremesas e outros alimentos (BURITI & SAAD, 2007).

Todavia, características antimicrobianas e potencial probiótico não foram avaliadas no presente estudo e maiores estudos são necessários para identificar se as BAL presentes na silagem de colostro apresentam estas características.

A classificação fenotípica das colônias das BAL foi feita de acordo com as suas características fisiológicas, morfológicas e bioquímicas, assumindo que, entre outras características, as bactérias ácido lácticas são micro-organismos Gram-positivos, catalase negativos não esporulados e nitrato negativos, conforme descrito por Barros et al. (2009). Em relação ao perfil de maltose e VP foram variáveis permitindo apenas a classificação em gênero. Entretanto, a identificação de bactérias ácido lácticas por métodos fenotípicos é difícil e inconclusivo sendo necessária a realização de métodos moleculares para determinar com precisão a identificação da espécie (BARROS et al., 2009). No presente estudo, não foi possível determinar as espécies das bactérias ácido lácticas isoladas, uma vez que a identificação molecular encontra-se em andamento.

Embora o processo de fermentação tenha a capacidade de impedir o crescimento de bactérias não esporuladas presentes no colostro, é fundamental que os produtores mantenham atenção à higiene e saneamento para minimizar a contaminação bacteriana durante a colheita e armazenamento do colostro.

#### **4. CONCLUSÕES**

O processo de fermentação anaeróbica da silagem de colostro foi eficiente para bactérias não esporuladas. As BAL que permanecem durante o processo de fermentação constituem-se em gêneros de bactérias com possível ação probiótica.

#### **5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALLEN, N. N. The Use of stored colostrum to replace marketable milk for calf feeding. **J. Dairy Sci.**, v.27, p.652-653, 1944. Available in: <http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/0022-0302/PIIS0022030244926391.pdf>>. Accessed 23 september, 2011.

AVILA, M. O.; FURTADO, L. R. I.; TEIXEIRA, M. M.; ROSADO, R. L. I.; MARTINS, L. F. S.; BROD, C. S. Leptospiral agglutinins in dogs, in the influence area of the center for control of zoonoses, Pelotas city, RS, Brazil, 1995. **Ciência Rural**, v. 28(1): p.107-110, 1998.

Disponível em < <http://www.scielo.br/pdf/cr/v28n1/a18v28n1.pdf>> acesso 22 1b 2013

BARBOSA, H. R.; TORRES, B. B. Microbiologia Básica, São Paulo Editora Atheneu, 196 p. 2000.

BARROS, M. R. et al. Comparação entre método bioquímico e reação em cadeia de polimerase para identificação de *Lactobacillus* spp., isolados de aves **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.2, p.319-325, 2009. Disponível em

<<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v61n2/a06v61n2.pdf>> acesso 23 ab 2013.

BRASIL- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO  
GABINETE DO MINISTRO **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 62**, DE 29 DE EZEMBRO  
DE 2011 Diário Oficial da União nº 251secção 1 31 de dezembro de  
2011.<[http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultar  
LegislacaoFederal](http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal)> acesso 22 ab 2013

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. **ALAN** [online]. v..57, n.4, p. 373-380, 2007. ISSN 0004-0622. Disponível em <http://www.scielo.org.ve/pdf/alan/v57n4/art10.pdf> acesso em 02 março 2010.

FIDLER, A. P. et al. Short communication: serum immunoglobulin G and total protein concentrations in dairy calves fed a colostrum-replacement product. **J Dairy Sci.** v.94 (7). 3609- 3612, 2011. doi: 10.3168/jds.2011-4358. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21700049>> acesso em 20 mar 2013.

FLORIANO, P. N.; ZAPPA, V. Mastitis in dairy cows, MASTITE EM VACAS LEITEIRAS-REVISÃO DE LITERATURA. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária Ano IX – N. 16. Jan 2011.

FOLEY, J. A.; OTTERBY, D. E. Availability, storage, treatment, composition, and feeding value of surplus colostrums: a review. **Journal of Dairy Science**, v.61, p.1033-1060, 1978. Available in: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030278836868>. Accessed 12 may, 2010. doi: [10.3168/jds.S0022-0302\(78\)83686-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(78)83686-8).

FULLER, R. A Review Probiotics in man and animals **Journal of Applied Bacteriology** , 66, 365-378.1989.< <http://europepmc.org/abstract/MED/2666378>> acesso em 22 ab 2013.

Jaboticabal, SP, Vol. 22, nº1, 022-030, 2006. < <http://www.arsveterinaria.org.br/index.php/ars/article/viewFile/74/64>> acesso em 25 maio 2013.

GILLES, F.; BAILLARGEON, P.; HIGGINS, R.; PARÉ, J.; FORTIN, M. Bacterial contamination of colostrum fed to newborn calves in Québec dairy herds Can Vet J Volume 43, 2002.

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

GARCIA, L. B. et al. Bacteriological and salivary tests for evaluation of caries risk. **RBAC**, vol. 41(1): 69-76, 2009. Disponível em < [http://www.sbac.org.br/pt/pdfs/rbac/rbac\\_41\\_01/rbac\\_41\\_01\\_13.pdf](http://www.sbac.org.br/pt/pdfs/rbac/rbac_41_01/rbac_41_01_13.pdf)> acesso em 12 ab 2013.

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products International. **Journal of Food Microbiology**, v.88, n. 2-3, p. 215–222, 2003. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160503001831>> acesso em 13 lb 2013 [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00183-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00183-1).

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

Available in: [http://www.cals.arizona.edu/ans/swnmc/Proceedings/2009/05Godden\\_09.pdf](http://www.cals.arizona.edu/ans/swnmc/Proceedings/2009/05Godden_09.pdf).

Accessed 14 jan 2013.

GODDEN, S. M. et al. Heat-treated colostrum and reduced morbidity in preweaned dairy calves: Results of a randomized trial and examination of mechanisms of effectiveness. **J. Dairy Sci.** 95:4029-4040. Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22720957>> acesso em 10 jan 2013.

HOLZAPFEL, W. H. et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **Am J Clin Nutr.**; 73 (2 Suppl) p. 365-373, 2001. Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11157343>> acesso em 12 ab 2013.

JACK, R. W. et al. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria **MICROBIOLOGICAL REVIEWS**, v.59, n. 2 p. 171-200, 1995. Disponível <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC239359/pdf/590171.pdf>> acesso em 23 ab 2013

KLOBASA, F. et al. Comparison of freezing and lyophilizing for preservation of colostrum as a source of immunoglobulins for calves **J ANIM SCI**, v,76, p.923-926, 1998. < <http://www.animal-science.org/content/76/4/923.short>> acesso 22 ab 2013.

KRAMER, J. M.; GILBERT, R. J. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In Foodborne Bacterial Pathogens. Doyle, M. P., ed., Marcel Dekker, Inc., New York, NY. 1989.

KURALKAR, P.; KURALKAR, S. V. Nutritional and Immunological Importance of Colostrum for the new born. **Vet World.**; v.3(1): p.46-47, 2010. < <http://www.ejmanager.com/mnstemps/2/2-1296810600.pdf?t=1366750634>> acesso em 23 ab 2013.



MENDES, R. A. et al. *Food service environmental contamination by Bacillus cereus* **Rev. Nutr.**, Campinas, v.17(2): p.255-261, 2004. disponível em [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-52732004000200012&script=sci\\_arttext&tlng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-52732004000200012&script=sci_arttext&tlng=es)> acesso em 23 ab 2013.

MCGUIRK, S.; COLLINS, M. Managing the production, storage and delivery of colostrum. Pages 593–603 in *Veterinary Clinics of North America—Food Animal Practice*. V.20. W.B. Saunders, New York, NY. 2004. Disponível em < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749072004000544>> Acesso em 20 mar 2013.

PAULIN, L. M. Artigo de revisão –BRUCELOSE. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.70, n.2, p.239-249, abr./jun., 2003 < [http://www.google.com.br/#hl=pt-BR&client=psy-ab&q=BRUCELOSE+paulin&oq=BRUCELOSE+paulin&gs\\_l=hp.12...1645.6163.0.8614.8.8.0.0.0.0.540.1629.3-2j1j1.4.0...0.0...1c.1.11.psy-ab.Q9WQegVpv5s&pbx=1&bav=on.2,or.r\\_qf.&bvm=b.v.45580626,d.eWU&fp=8c439532cc744d3d&biw=1366&bih=650](http://www.google.com.br/#hl=pt-BR&client=psy-ab&q=BRUCELOSE+paulin&oq=BRUCELOSE+paulin&gs_l=hp.12...1645.6163.0.8614.8.8.0.0.0.0.540.1629.3-2j1j1.4.0...0.0...1c.1.11.psy-ab.Q9WQegVpv5s&pbx=1&bav=on.2,or.r_qf.&bvm=b.v.45580626,d.eWU&fp=8c439532cc744d3d&biw=1366&bih=650)> acesso em 12 mar 2013

PIARD, J. C.; DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria- 1.Oxygen metabolites and products from catabolism. **Lait**, v.71, p.525-541, 1991. [http://lait.dairyjournal.org/index.php?option=com\\_article&access=standard&Itemid=129&url=/articles/lait/abs/1991/05/lait\\_71\\_1991\\_5\\_41/lait\\_71\\_1991\\_5\\_41.html](http://lait.dairyjournal.org/index.php?option=com_article&access=standard&Itemid=129&url=/articles/lait/abs/1991/05/lait_71_1991_5_41/lait_71_1991_5_41.html) . Acesso em 23 ab 2013.

PORTAELS, F.; PALTYN, S. R. Growth of Mycobacteria in Relation to the pH of the Medium. S.I.:s.n. **Ann Microbiol (Paris)**, v.133(2), p.213-221, 1982. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7149523> acesso 23 ab 2013.

PRIESTLEY, D. et al. Effect of feeding maternal colostrum or plasma-derived or colostrum-derived colostrum replacer on passive transfer of immunity, health, and performance of preweaning heifer calves. **J Dairy Sci.**, v.96, c.5, p. 3247-3256, 2013.

<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-6339>.

RAMÍREZ-SANTANA C. et al. Effects of cooling and freezing storage on the stability of bioactive factors in human colostrum. **J Dairy Sci.**, v. 95, c.5, p. 2319-25, 2012. doi: 10.3168/jds.2011-5066. Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22541460>> Acesso em 23 mar 2013.

RAEVUORI, M.; GENIGEORGIS, C. Effect of pH and Sodium Chloride on Growth of *Bacillus cereus* in Laboratory Media and Certain Foods **APPLIED MICROBIOLOGY**, v. 29, p. 68-73, 1975. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC186913/>> acesso 10 ab 2013.

SAALFELD, M. H. Uso da Silagem de colostro como substituto do leite na alimentação. **A Hora Veterinária**, Ano 27, n. 162, p. 59-62, 2008.

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

SAALFELD, M. H. et al. Anaerobically fermented colostrum: an alternative for feeding calves **Ciência Rural**, (no prelo) 2013.

STABEL, J. R. et al. Destruction of *Mycobacterium paratuberculosis*, *Salmonella* spp., and *Mycoplasma* spp. in Raw Milk by a Commercial On-Farm High-Temperature, Short-Time Pasteurizer **J. Dairy Sci.** v.87, p.2177–2183, 2004. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15328232>> acesso em 02 março 2013.

STEWART, S. et al. Preventing Bacterial contamination and Proliferation During the Harvest, Storage, and Feeding of Fresh Bovine Colostrum, **J. Dairy Sc**, v.88, p. 2571-2578, 2005.

< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15956318> > acesso em 14 jan 2013.

TURNES, C. G. et al. Properties of the *bacillus cereus* strain used in probiotic CenBiot **Revista de Microbiologia.** v. 30, p.11-14, 1999. Disponível em

<[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0001-37141999000100002&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0001-37141999000100002&script=sci_arttext)>

acesso em 23 ab 2013 <http://dx.doi.org/10.1590/S0001-37141999000100002>.

Tabela 1: Contagem de bactérias em silagem de colostro inoculada experimentalmente por 30 dias de fermentação

Micro-organismo avaliado	Contagem inicial	Dias de fermentação			
		7 dias	14 dias	21dias	30 dias
BAL	$2,5 \times 10^7$	$6,0 \times 10^9$	$5,7 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$
<i>B. cereus</i>	$6 \times 10^7$	$3,5 \times 10^3$	$2,7 \times 10^3$	$2,7 \times 10^3$	$2,7 \times 10^3$
<i>E. coli</i>	$6 \times 10^7$	$3,0 \times 10^3$	ND	ND	ND
<i>S. aureus</i>	$5 \times 10^9$	$3,0 \times 10^4$	ND	ND	ND
<i>B. abortus</i>	$4 \times 10^9$	ND	ND	ND	ND
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	$1 \times 10^7$	ND	ND	ND	ND
<i>M. bovis-BCG</i>	$0.5 \times 10^7$	ND	ND	ND	ND

ND- Não detectado

**6 ARTIGO 4**

**Sequenciamento da região 16S rDNA de bactérias ácido lácticas isoladas da  
silagem de colostro bovino**

**SAALFELD, M. H.<sup>1</sup>; PEREIRA, D. I. B.<sup>2</sup>. ; VALENTE, S. J.<sup>2</sup>.; BORCHARDT, J. L.<sup>2</sup>.;  
GULARTE, M. A.<sup>2</sup>; LEITE, F. P. L.<sup>2</sup>.**

**Manuscrito para submissão a Revista Veterinary Microbiology.**

## Sequenciamento da região 16S rDNA de bactérias ácido lácticas isoladas da silagem de colostro bovino

Mara Helena Saalfeld<sup>1\*</sup>, Daniela Isabel Brayer Pereira<sup>2</sup>, Julia Silveira Valente<sup>2</sup>, Jéssica Lopes Borchardt<sup>2</sup>, Márcia Arocha Gularte<sup>2</sup>, Fábio Pereira Leivas Leite<sup>2</sup>

<sup>\*1</sup>*Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil; Emater/ASCAR- RS, Brasil.*

<sup>2</sup>*Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil;*

<sup>\*1</sup> *Corresponding Author: Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, CEP: 96010-900, Pelotas, RS, Brasil. E- mail: [mara.s@brturbo.com.br](mailto:mara.s@brturbo.com.br)*

### RESUMO

Neste estudo objetivou-se caracterizar molecularmente 60 cepas de bactérias ácido lácticas isoladas de silagem de colostro bovino. A caracterização genotípica foi realizada através do sequenciamento da região 16S rDNA. As bactérias isoladas foram classificadas em dois gêneros: *Lactobacillus* (75%), sendo identificadas as espécies *L. casei*, *L. brevis*, *L. reannaqily* e *L. crustorum* e *Enterococcus* (25%) com as espécies, *E. durans*, *E. faecium*, *E. faecalis* e *E. mundyii*. Concluiu-se que as bactérias ácido lácticas isoladas da silagem de colostro são do gênero *Lactobacillus* e *Enterococcus* descritas na literatura como bactérias com potencial probiótico.

Palavras-chave: Bactéria ácido láctica, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Colostro*, *Bovino*

### ABSTRACT:

In this study we aimed to molecularly characterize 60 strains of lactic acid bacteria isolated from the colostrums silage. The genotypic characterization was carried out through the

sequencing of the 16S rDNA. The isolated bacteria were classified in two genera: *Lactobacillus* (75%), in which the species *L. casei*, *L. brevis*, *L. reannaqily* and *L. crustorum*. were identified and *Enterococcus* (25%), (*E. durans*, *E. faecium*, *E. faecalis* and *E. mundyii*). It has been concluded that the lactic acid bacteria isolated from colostrum silage are of the *Lactobacillus* and *Enterococcus* genera described in the literature as bacteria with probiotic potential.

Keywords: lactic acid bacteriae, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, colostrum, bovine

## INTRODUÇÃO

Bactérias ácido lácticas - BAL, constituem um grupo de bactérias Gram positivas agrupadas devido suas características morfológicas, metabólicas e fisiológicas. São micro-organismos não esporulados, catalase-negativos, desprovidos de citocromos, anaeróbios, mas aerotolerantes, ácido-tolerantes e fermentativos (Axelsson, 2004; Barros et al.; 2009).

As BAL são encontradas em associação com produtos lácteos fermentados (Jack, 1995) sendo responsáveis por características organolépticas e de viscosidade durante a transformação do leite para queijo e iogurte (Piard e Desmazeaud, 1991). Estas bactérias são defendidas por seus benefícios à saúde desde 1908 por Metchnikoff, estando entre os mais importantes micro-organismos probióticos geralmente associados com o trato gastrointestinal humano (Holzapfel et al., 2001) e fazendo parte da mucosa humana e animal saudável (Axelsson, 2004).

A capacidade de produzir grande quantidade de ácidos orgânicos, fundamentalmente ácido láctico, pela fermentação dos carboidratos presentes nos alimentos e conseqüentemente reduzirem o pH, é o fator primário em que se baseia a atividade antimicrobiana das bactérias lácticas (Piard e Desmazeaud, 1991). Além disso, as bactérias lácticas têm capacidade de

produzir outras substâncias antimicrobianas, tais como: peróxido de hidrogênio, diacetil, metabólitos de oxigênio entre outras (Piard e Desmazeaud, 1991).

Historicamente as BAL eram relacionadas aos *Lactobacillus* entretanto atualmente mais de 20 gêneros de bactérias fazem parte deste grupo, entre eles as *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Oenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (Axelsson, 2004).

Segundo Axelsson (2004) os *Lactobacillus* e *Carnobacterium* apresentam-se como bastonetes e os outros gêneros em forma de cocos. Uma exceção é o gênero *Weissella* que pode se apresentar como cocos ou bastonetes. Segundo este autor só no gênero *Lactobacillus* são encontradas cerca de 80 espécies diferentes.

A identificação de BAL através de morfologia e provas bioquímicas tem se mostrado pouco eficiente (Barros et al., 2009). Holzapfel et al. (2001) destaca a atenção da necessidade de diferenciar cepas de BAL consideradas seguras e probióticas de outras de origem clínica, salientando a necessidade de identificação por meio de técnicas modernas de tipagem molecular tais como PFGE (eletroforese em campo de gel pulsátil) e PCR (reação em cadeia de polimerase).

O interesse por bactérias com capacidade de produzir compostos antimicrobianos denominados bacteriocinas tem aumentado a cada ano e bactérias ácido lácticas são valorizadas não só como preservantes de alimentos, mas também pela capacidade bactericida frente a bactérias patogênicas (Field et al., 2007).

O produto resultante da fermentação anaeróbica do colostro, denominado silagem de colostro, é um sucedâneo lácteo utilizado na alimentação de bezerros, uma vez que mantém os constituintes nutricionais e do colostro *in natura* (Saalfeld et al., 2013, no prelo), e imunoglobulinas, sendo estas transferidas aos bezerros (observações pessoais). Após o



período de fermentação de 21 dias apenas BAL continuam viáveis conservando este alimento por períodos de 24 meses (Saalfeld et al., 2013 no prelo). Objetivou-se neste estudo, identificar genotipicamente estas bactérias.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

No período de 2009 a 2012 foram isoladas BAL de amostras de silagem de colostro produzidas conforme Saalfeld (2008). Para a caracterização das BAL levou-se em consideração: morfologia celular, reação tintorial a coloração de Gram e prova de catalase. As bactérias caracterizadas foram armazenadas em meio BHI com 40% de glicerol a -20°C.

### 2.1 Amplificação e sequenciamento parcial da região 16S rDNA das BAL:

Das bactérias armazenadas foram selecionadas 60 cepas, as quais foram plaqueadas em meio MRS (Man, Rogosa e Sharpe - Biobras, Brasil) e cultivadas em microaerofilia a 37°C por 24 horas. As colônias foram avaliadas por Gram e morfologia para posterior extração do DNA. A extração do DNA foi realizada pelo método pérolas de vidro segundo Sambrook (2001). O DNA total bacteriano extraído foi quantificado por espectrofotometria (NANOVUE-plus GE) com uma média de 1500 nanogramas de DNA e armazenado a -20° C até a utilização nos testes moleculares.

As amostras de DNA foram amplificadas através de PCR. Para cada amostra foi utilizado 30 µL de taq mix (GoTaq Colorless Master Mix- PROMEGA (pH 8.5), contendo: 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP and 3mM MgCl<sub>2</sub>); 1,5 µL (10 pmol) de cada primer: 27f (**5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'**) e1512r (**5'-CGGCTACCTTGTTACGACT-3'**) ( Magalhães et al., 2011), (Sigma), q.s.p. 25 µL de água ultra pura e adicionando-se 2,0 µL de DNA de interesse (~100-200ng). O material foi levado ao termociclador (Biocycler) com o seguinte protocolo: inicialmente 5 minutos a 95°C e

depois 30 ciclos de: 60s a 92°C, 60s a 55°C, 60s a 72°C. A extensão final foi 10 minutos a 72°C. Os produtos da PCR (~100-200ng) foram acrescidos com solução tampão de corrida (1µL de Sybr Green e 1µL de Loading buffer) e submetidos à eletroforese (70V/ 30minutos) em gel de agarose a 1%. Posteriormente visualizados em transluminador com ultravioleta (UV) e fotografados através do sistema de foto documentação (Olimpus 4000).

Os produtos de PCR foram purificados e enviados ao sequenciamento por Macrogen. As amostras foram sequenciadas em um seqüenciador automático (ABI PRISM 3730XL Analyzer). As sequências de DNA obtidas foram comparadas com a base de dados GenBank utilizando o algoritmo BLAST (National Center for Biotechnology Information, MA, EUA)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.)

### 3. RESULTADOS

A morfologia das BAL isoladas da silagem de colostro variou de bacilos Gram positivos isolados ou em cadeias (Fig.1a) a cocobacilos Gram positivos, agrupados em cadeias (Fig. 1b), não esporuladas e catalase negativas.

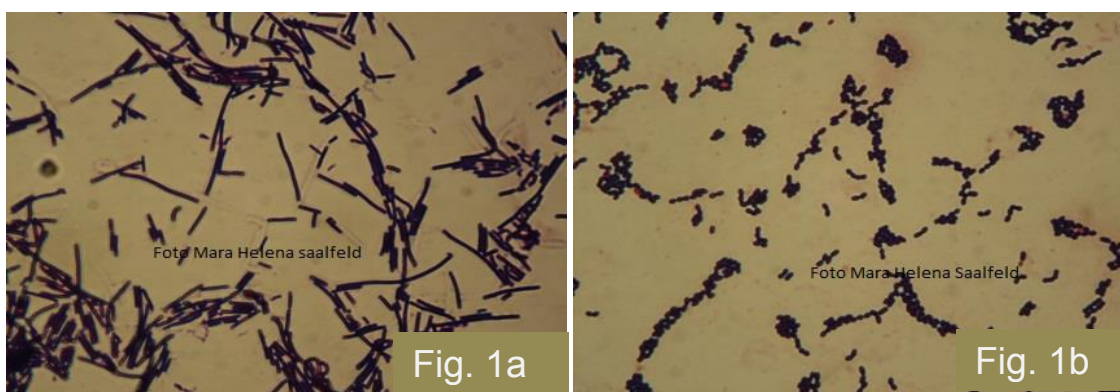


Figura 1: Morfologia de BAL presentes na silagem de colostro. Fig.1a: bacilos longos, em cadeias, Gram positivos. Fig. 1b: cocobacilos, em cadeias, Gram positivos.

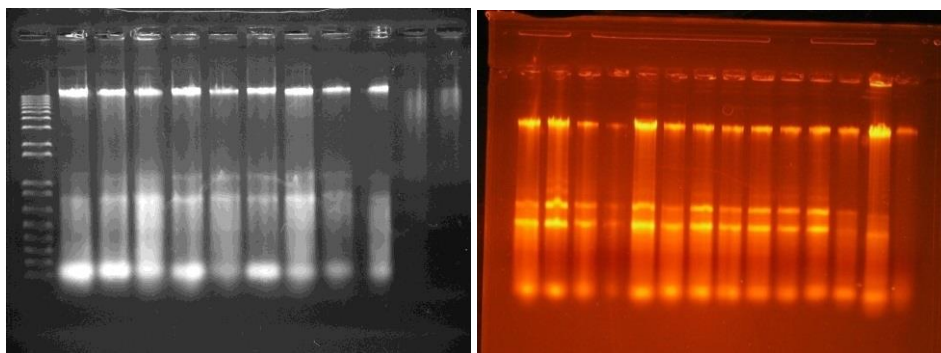


Figura 2: Fotos dos géis após extração DNA de bactérias ácido lácticas

O sequenciamento evidenciou que 75% das cepas avaliadas pertenciam ao gênero *Lactobacillus* (45/60) ao gênero *Enterococcus* (15/60). Dentre os *Lactobacillus* foram identificadas quatro espécies: *L. casei* (75%), *L. rennanyly* (12,5%), *L. brevis* (8,33%) e *L. crustorum* (4,17%). Também foram identificadas quatro espécies de *Enterococcus*: *E. durans* (50%), *E. faecium* (25%), *E. faecalis* (12,5%) e *E. mundyii* (12,5%).

#### 4. DISCUSSÃO

Saalfeld et al. (2013, no prelo) pesquisando a microbiota da silagem de colostro, comprovaram a permanência de BAL por períodos de até 24 meses na silagem de colostro. Todas as bactérias foram Gram positivas não esporuladas e catalase negativas com morfologia bacilar foi variável. No entanto, foi possível observar que a morfologia das BAL variou com o tempo de cultivo e com meio de cultura utilizado dificultando a identificação morfofisiológica.

Os bacilos apresentaram-se desde longos e delgados a cocobacilos curtos e mais arredondados. Este resultado está de acordo com Koneman et al. (2008), que descreve a mesma morfologia, ressaltando que os *Lactobacillus* são pleomórficos, com tendência a formação de paliçadas, morfologia também encontrada nas bactérias isoladas neste estudo.

Em relação a morfologia, Axelsson (2004) descreveu que dentre as BAL, os *Lactobacillus* e *Carnobacterium* são bastonetes e os outros gêneros apresentam-se em forma de cocos. Segundo Barros et al. (2009) as provas bioquímicas utilizadas para identificação de espécies de BAL são imprecisas, por outro lado, as metodologias moleculares baseadas na PCR constituem-se em uma ferramenta de identificação bacteriana rápida, de elevada sensibilidade e especificidade (Zanine, et al., 2012). Assim sendo, optou-se pelo sequenciamento da região 16S rDNA, sequência conservada com polimorfismos intraespecíficos que revelou a identificação de quatro espécies diferentes de *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. brevis*, *L. rennanyly* e *L. crustorum*) e quatro espécies de *Enterococcus* (*E. durans*, *E. faecium*, *E. faecalis* e *E. mundyii*). É importante salientar que embora nas silagens avaliadas no presente estudo tenham sido identificadas quatro espécies de *Lactobacillus* são reconhecidas cerca de 80 espécies diferentes (Axelsson, 2004). Além de haver uma percentagem maior de *Lactobacillus* nas silagens avaliadas, 75% das amostras foram identificadas como *L. casei*, descritas como probiótica e com capacidade de produção de bacteriocina (Buriti et al., 2007). Essa é uma característica importante de cepas de *Lactobacillus* por causa de suas possíveis aplicações em conservação de alimentos (Buriti et al., 2007).

Entre as bactérias sequenciadas, 25% foram identificadas como *Enterococcus*, os quais têm sido relatados com capacidade de produzir bacteriocinas inibitórias (enterocinas) contra a deterioração dos alimentos ou bactérias patogênicas, tais como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium* spp. e *Bacillus* spp. (Giraffa, 2003).

As espécies bacterianas identificadas neste estudo são descritas como bactérias com potencial para preservar a saúde humana e animal (Fuller, 1989; Pimentel, 2011). Todavia, maiores estudos para comprovar esta atividade deverão ser futuramente realizados.

Além de ser um sucedâneo lácteo que desenvolve corretamente os bezerros (Saalfeld, 2008; Saalfeld et al., 2013 no prelo), e mantém as imunoglobulinas (observações no prelo), a

silagem de colostro, por manter bactérias ácido láticas com provável ação probiótica, passa a ter um interesse especial entre pesquisadores e produtores.

#### 4. CONCLUSÕES

As bactérias ácido láticas isoladas da silagem de colostro pertencem ao gênero *Lactobacillus* e *Enterococcus*, sendo predominantemente *L. casei*.

**AGRADECIMENTOS;** A todos os produtores de leite da região sul do RS, ao Alcio Azambuja e Christiano Fancke Weissheimer da EMBRAPA Terras Baixas, Prof.<sup>a</sup> Helenice Gonzalez e Prof.<sup>a</sup> Patrícia Nascente da UFPel, Ao Eng. Agr.<sup>o</sup> Marcio Caruz Guedes que forneceu o colostro para este experimento durante os 4 anos de estudo. Agradecimento a Dra. Renata Scharamm da Faculdade de Veterinária pela caracterização das BAL e a Dr.<sup>a</sup> Karina Teixeira Magalhães da Universidade Federal de Lavras MG pelo auxílio no sequenciamento das BAL.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Axelsson, L. 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S. et al. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. 3.ed. New York: MarcelDekker.1-66.
- Barros, M.R., Andreatti Filho, R. L., Oliveira, D.E., Lima, E.T., Crocci, A.J. 2009. Comparação entre método bioquímico e reação em cadeia de polimerase para identificação de *Lactobacillus* spp., isolados de aves **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.2, p.319-325,

- Buriti F.C.A Y Saad, S.M.I. 2007. *Bactérias do grupo Lactobacillus casei*: caracterização,viabilidade. Archivos Latinoamericanos de Nutricion. 2007, vol.57, n.4, pp. 373-380.
- Field, D., Cotter, P., Hill, C., Roos, R.P., 2007. Bacteriocins biosynthesis, structure, and function. In: Riley, M.A., Gillor, O. (Ed.), Research and Applications in Bacteriocins. Horizon Bioscience,Norfolk. 5-43.
- Fuller R., 1989. A Review Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology. 66, 365-378.
- Giraffa, G., 2003. Functionality of enterococci in dairy products. International Journal of Food Microbiology, 88, 2-3, 215–222,
- Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., Schillingeru, U., 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganismsin food and nutrition. Am J Clin Nutr.; 73, 2, 365-373.
- Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B., 1995. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria MICROBIOLOGICAL REVIEWS, June p. 171–200 Vol. 59, No. 2.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W. M., Schreckenberger, P.C., Winn, J.R.W. C. 2008. Diagnóstico Microbiológico. MEDSI São Paulo, 6ª Edição pp1488.
- Magalhães, K.T., Pereira, G.V.M., Campos, C.R., Dragone, G., Schwan, R.F., 2011. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. Brazilian Journal of Microbiology. São Paulo, vol.42 no.2.
- Metchnikoff E., 1908. Prolongation of life. New York: Putnam, pp.384.
- Piard, J.C., Desmazeaud, M. 1991. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria- 1.Oxygen metabolites and products from catabolism. *Lait*, v.71, p.525-541.

- Pimentel, T.C., 2011. PROBIÓTICOS E BENEFÍCIOS À SAÚDE Revista Saúde e Pesquisa, 4, 1, 101-107.
- Saalfeld, M.H., 2008. Uso da Silagem de colostro como substituto do leite na alimentação. A Hora Veterinária, 27, 162, 59-62.
- Saalfeld, M.H; Pereira, D.I.B, Schramm, R., Silveira, K.R.K., Valente, S.S.J., Borchardt, J., Gularte, M.A., Leite, P.L.F., 2013. Anaerobically fermented colostrum: an alternative for feeding calves. Ciência Rural, (no prelo).
- Sambrook, J., Russel, D.W., 2001. Molecular Cloning- A laboratory Manual Cold Spring Harbor.
- Zanini, S.F., Mussi, J.M.S., Zanini, M.S.; Sousa D.R., Pessotti, B.M.S. Damasceno, J.D.L. M., Silva, M.A., 2012. Identificação bioquímica e molecular de *Lactobacillus* spp. isolados do íleo de frangos de corte tratados ou não com antimicrobianos. Ciência Rural, Santa Maria, 42, 9, 1648.

**7 ARTIGO 5**

**Colostro: a redescoberta de um alimento saudável, nutritivo e com potencial probiótico**

**Publicado na revista AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL  
SUSTENTÁVEL MAIO/AGOSTO 2012**

**V.5, N.2, PAG. 18 A 24**



**Colostro: a redescoberta de um alimento saudável, nutritivo e com potencial probiótico**

SAALFELD, M.H.<sup>1</sup>; PEREIRA, D.I.B.<sup>2</sup>; SILVEIRA, K.R.K.<sup>3</sup>; DINIZ, G.L.<sup>4</sup>; KRINGEL, D.H.<sup>2</sup>; ALVES M.I.<sup>2</sup>; GULARTE, M.A.<sup>2</sup>; LEITE, F.P.L.<sup>2</sup>.

\*<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil; Emater/ASCAR- RS, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil;

<sup>3</sup>Universidade de Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil;

<sup>4</sup> EMATER/ASCAR Rio Grande do Sul

\*<sup>1</sup> Corresponding author: EMATER/RS-ASCAR Rua Félix da Cunha 626 Pelotas RS Brasil

E- mail: [msaalfeld@emater.tche.br](mailto:msaalfeld@emater.tche.br)

**RESUMO**

O panorama nutricional brasileiro evidencia que o potencial nutritivo dos alimentos não é aproveitado na sua totalidade e que muitos deles são descartados por desconhecimento e preconceitos. A utilização de alimentos pouco tradicionais pode diminuir os desperdícios, com aproveitamento e transformação em produtos, cujo valor comercial e nutricional seja reconhecido. Um exemplo disso é o leite produzido pela vaca nos primeiros dias pós-parto, que é descartado pelos agricultores. O objetivo deste trabalho foi avaliar a composição centesimal do colostro bovino e desenvolver bebida láctea e manteiga tendo como base a silagem de colostro verificando a viabilidade de bactérias ácidos lácticas nestes produtos. Neste trabalho concluiu-se que o colostro é um alimento com alto valor nutricional, sendo possível a produção de manteiga e bebida láctea da silagem de colostro. A manutenção de *Lactobacillus* spp viáveis em quantidades suficientes sugere que estes alimentos têm potencial probiótico.

**Palavras-chave: colostro, bovino, alimento, probióticos.**

## ABSTRACT

The panorama shows that the Brazilian nutritional potential nutritional value of foods is not tapped in its entirety and that many of them are discarded through ignorance and prejudice. The use of some traditional foods can reduce the waste, with recovery and transformation products, whose market value is recognized and nutrition. An example is the milk produced by cows during the first days *post partum*, which is discarded by farmers. The objective of this study was to evaluate the chemical composition of colostrum and milk drink developing and butter based on colostrum silage checking the viability of lactic acid bacteria in these products. In this work it was concluded that the colostrum is a food with high nutritional value, being possible the production of butter and milk drink on colostrum silage. The maintenance of viable *Lactobacillus* spp. in sufficient quantities suggests that these foods have the potential probiotic.

Keywords: colostrum, bovine, food, probiotics

## 1 INTRODUÇÃO:

A população mundial pode chegar em 2050 a nove bilhões de habitantes (FAO, 2011). Assim, para que todos tenham acesso à comida, a oferta de alimentos precisa aumentar nos próximos 40 anos (MUTEIA, 2011). Segundo Clay (2011) isto é um desafio assustador, visto que cerca de 70% da terra que é adequada para cultivo de alimentos, já está em uso ou sob alguma forma de proteção. O maior impacto humano em nosso planeta vem da produção alimentos. Em 2050 poderemos precisar de três planetas Terra para atender as demandas do nosso consumo. Precisamos urgentemente encontrar maneiras de fazer mais com menos sem prejudicar a biodiversidade (CLAY, 2011).

Um alimento importante para a alimentação humana é o leite, sendo o consumo recomendado para todas as faixas etárias. Segundo a FAO (2011) em 2014 com novos consumidores oriundos dos países emergentes, haverá um déficit de 34 bilhões de litros de leite. Apesar disso o leite produzido nos quatro primeiros dias pós-parto é descartado pelo produtor rural por não ter valor comercial, embora tenha potencial para ser usado na alimentação humana (SAALFELD et al., 2012).

Em 2008, Saalfeld desenvolveu a silagem de colostro como forma de aproveitamento do excesso de colostro produzido nas propriedades rurais, resolvendo problemas citados na

literatura em relação à conservação, armazenamento e qualidade do colostro (FOLEY; OTTERBY, 1978; LANUZA et al., 1980). Após 21 dias de fermentação a silagem de colostro mantém características físicas e químicas encontradas no colostro *in natura* (SAALFELD et al., 2012). As bactérias presentes na silagem de colostro após 21 dias de fermentação foram identificadas como pertencentes ao gênero *Lactobacillus* spp. Não foi identificado crescimento de outros micro-organismos nas amostras avaliadas (SAALFELD et al., 2012). Bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* spp são fermentadoras de lactose, sendo responsáveis por processos da fermentação e usados como probióticos em alimentos para uso de humanos e animais (BURITI, 2007).

O colostro é essencial para recém-nascidos, entretanto, adultos humanos também podem se beneficiar (HE, 2001). Além de nutrientes o colostro bovino contém vários componentes bioativos e é uma fonte rica em fatores de crescimento sendo comercializado como suplemento alimentar de saúde em vários países (PLAYFORD et al., 1999; URUAKPA, 2002). Quando Albert Sabin fez sua primeira vacina oral contra a poliomielite, a imunoglobulina que ele utilizou foi de colostro bovino (SABIN, 1950).

O “*Leite Imune*” produzido com colostro bovino hiper-imunizado é usado para combater problemas gastro intestinal em humanos e a empresa Lifeway Foods Inc. lançou no mercado americano o *Basic Plus*, uma bebida a base de kefir, contendo Proventa (colostro) com componentes imunológicos naturais (SOUZA, 2008).

Em muitos países do mundo o colostro bovino é usado na alimentação humana. Nos países escandinavos durante centenas de anos era produzido um pudim de colostro coberto com mel para celebrar o nascimento de herdeiros (OLIVEIRA, 2012). Na Turquia um prato feito com colostro bovino é chamado de Kelle. O colostro (avuz) é colocado em uma panela sendo lentamente aquecida para tornar-se firme. No Cáucaso este colostro solidificado é polvilhado com açúcar sendo conhecido como “Gumus” (KALAFAT, 2011).

Na Finlândia o pudim de colostro bovino é uma sobremesa tradicional, tendo sido adotado por muitos “chefs” de diferentes partes do mundo, muitas vezes com pequenas variações (GODWIN, 2011). Também na Finlândia é produzido o **Leipäjuusto cheese** ou **juustoleipä** (Wikipedia) que é um tipo de queijo fresco feito tradicionalmente com colostro de vaca. Outro produto é o queijo de colostro assado chamado de **Uunijuusto Ternimaidosta**. Na Noruega é produzido um pudim de colostro denominado kyrost, Råmelkspudding ou kalvedans (dança bezerro). Além do pudim são produzidas panquecas e waffles que podem

ser feitos sem o uso de ovos (ANNE-LISE 2010). Imigrantes alemães descrevem o uso de queijo de colostro denominado **Crost**, feito com colostro fresco, sal, açúcar e canela, assado em forno aquecido.

Segundo Dalton (2012) até pouco tempo na Nova Zelândia o colostro não era valorizado. Entretanto com o reconhecimento do colostro como um alimento saudável e usado por atletas homens e mulheres isto começou a mudar. Nos últimos três anos, empresas de laticínios pagaram aos agricultores um prêmio pelo colostro em vez de penalizá-los como era comum. Dalton (2012) cita que um mercado de exportação de alto valor está em desenvolvimento na Ásia e Japão para comercialização do colostro, inclusive com preços exorbitantes. Esta revisão demonstrou que existe possibilidade de desenvolver muitos produtos a base de colostro. O objetivo deste trabalho foi realizar a análise centesimal do colostro bovino e o desenvolvimento de manteiga e bebida láctea tendo como base a silagem de colostro, verificando a viabilidade de bactérias ácidos lácticas nestes produtos.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Análise centesimal do colostro bovino**

O colostro foi coletado através de ordenha mecânica de 10 vacas das raças Jersey e Holandesa em propriedades do sul do Rio Grande do Sul, Brasil. As amostras foram coletadas em frascos estéreis (226mL), resfriadas e transportadas ao laboratório. As análises foram realizadas em duplicata segundo metodologia descrita nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Os parâmetros avaliados foram: pH (medido em potenciômetro digital - DM 20), acidez (graus Dórnica), proteína (digestão de *Kjeldahl*, fator 6,5), extrato seco (determinado pelo método de secagem em estufa a 105°C), cinzas (determinada pelo método de incineração em forno mufla a 550°C), gordura (método de Gerber) e lactose (determinada pelo método de Fehling) Adolfo Lutz (1985)..

### **2.2 Produção de manteiga e bebida láctea**

A silagem de colostro foi produzida no Centro de Treinamento de Agricultores da EMATER/RS-ASCAR-CETAC, Canguçu, RS, conforme Saalfeld (2008). Após 21 dias de armazenamento a silagem foi utilizada como base para produção de manteiga e bebida láctea. A elaboração dos produtos ocorreu no CETAC e no Laboratório de Análise Sensorial de Alimentos do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA) da UFPel Campus Capão do Leão.

Nas amostras de silagem de colostro utilizadas para elaboração dos produtos foram realizadas análises de proteína (digestão de *Kjeldahl*, fator 6,5), pH, acidez (% m/v de ácido láctico) e umidade (% m/v) (ADOLFO LUTZ,1985).

Para obtenção da manteiga a matéria gorda da silagem de colostro foi desestabilizada através da ação física do liquidificador com água gelada. Após 2 minutos ocorreu a expulsão do leiteiro (soro e água) resultando na manteiga. Após lavagem e maxalagem foi realizada a salga e refrigeração para aquisição da consistência desejada.

Para elaboração da bebida láctea a porção contendo o soro e caseína da silagem de colostro foi liquidificada por quatro minutos. Após repouso de 2 minutos a bebida foi filtrada. Para cada 500 mL da bebida foram acrescentados 2% de bicarbonato de sódio, 4% de açúcar e 4% de polpa de morango ou para bebida sabor chocolate foi acrescentado 6% de achocolatado.

Uma alíquota de 10 $\mu$ L da manteiga e bebida láctea foi semeada nos meios de cultivo: Agar sangue (Difco II, USA), MacConkey (Difco II, USA), Chapman (Difco II, USA), incubados em aerobiose por 24 horas a 37°C. As amostras foram avaliadas quanto ao número de células viáveis das bactérias ácidos lácticas totais através de diluições seriadas na base 10 em placas com meio MRS (MAN, ROGOSA e SHARPE - Biobras, Brasil) incubadas em microaerofilia em estufa a 37°C por 48 horas. A contagem das unidades formadoras de colônias foi feita através do contador de colônias, em placas que apresentavam entre 30 e 300 UFC.

A bebida láctea foi avaliada antes e após a adição do aromatizante e açúcar em relação à contagem de fungos filamentosos e leveduras. Para essa enumeração foi empregado ágar Batata Dextrose (BDA), acrescido de 0,2 mL de ácido tartárico (10% p/v), utilizando-se o método de plaqueamento em superfície, semeando-se com alça de Drigalsky, seguido de incubação a 25°C por cinco dias e visualizado em microscopia óptica.

### **3 RESULTADOS e DISCUSSÃO**

A composição centesimal das amostras de colostro conforme o horário de coleta pós-parto, apresentadas na tabela 1, evidencia que o colostro bovino é um alimento rico em constituintes nutricionais e apresenta potencial para ser pesquisado como alimento para humanos.

Tabela 1- Avaliação centesimal do colostro conforme horas pós-parto

	pH	Lactose%	Cinzas%	Proteína%	Umidade %	Gordura %	MS %	°D
Parto	6,42	2,69	1,77	16,66	75,82	6,07	26,06	30
12 horas	6,24	2,75	1,65	16,15	80,41	5,60	19,61	28
24 horas	6,29	3,21	1,2	10,44	85,24	6,40	14,76	35
36 horas	6,48	3,13	1,46	9,53	84,65	5,95	15,35	25
48 horas	6,31	3,29	1,25	7,03	84,47	6,00	15,53	46
60 horas	6,31	3,41	1,28	6,91	85,99	5,92	14,11	25

(n=10), MS = matéria seca. °D = Graus Dórníc

Neste estudo foram observados diferentes percentuais nutricionais das amostras coletadas entre raças e entre propriedades (dados não mostrados). Acredita-se que estas variações são influenciadas pelo manejo, alimentação da vaca, individualidade, raça, número de parição, ração pré-parto, duração do período seco e tempo pós-parto, estando de acordo com relatos de Kehoe et al. (2007). Gonzales (2001) ressaltou que o leite bovino é um fluido composto por uma série de nutrientes sintetizados na glândula mamária a partir de precursores derivados da alimentação e metabolismo, o mesmo ocorrendo com a composição do colostro.

Na tabela 1 está demonstrado que o nutriente com maior variação foi a proteína. No momento do parto os valores observados foram de 16,66% diminuindo para 6,91% com 60 horas pós-parto. Estes achados estão de acordo com pesquisas de Kehoe et al. (2007). Segundo este autor, um dos motivos da variação decrescente do percentual de proteínas está relacionada ao percentual de imunoglobulinas que é de quase 6% no colostro diminuindo para 0,09% no leite. Foi observado neste estudo que à medida que transcorrem as horas pós-parto os nutrientes se modificam, aproximando-se a valores encontrados no leite, corroborando resultados de Kehoe et al. (2007). Pode-se observar que o percentual de lactose aumenta com o número de ordenhas de acordo com os estudos de Foley e Otterby (1978). Neste estudo os percentuais de matéria seca diminuíram com o número de ordenhas pós-parto estando de acordo com os resultados de Gonzales (2001), este achado provavelmente está relacionado à diminuição dos percentuais de proteína. Os teores de gordura em média 6% não sofreram alteração até 60 horas pós-parto, entretanto sabe-se que os percentuais de gordura diminuem

para valores em torno de 3,7% em leite de vaca Holandesa e 4,4 % em leite de vaca Jérsi estando relacionados à alimentação e a raça da vaca leiteira (NEITZ, 1995). Foi observado teores de acidez maiores no colostro (26 a 48°D) em relação ao leite (13 a 17°D). Provavelmente esta acidez seja devida aos sólidos não gordurosos como: albumina, caseínas e fosfatos. As concentrações de fosfatos e de caseínas são as mais importantes, de maneira que a acidez será maior, quanto maior o conteúdo proteico do colostro.

Embora o colostro seja um alimento rico em constituintes importantes para alimentação e na saúde humana (PLAYFORD et al., 1999; URUAKPA, 2002) ainda é pouco utilizado na alimentação humana. Durante a pesquisa foi possível observar a existência de preconceitos em relação ao uso do colostro, entretanto não foi possível identificar a origem desse preconceito. A maioria das pessoas nunca consumiu colostro, mas tem conceitos estabelecidos de que é algo que não deve ser consumido. O uso de colostro não é proibido, visto que muitas indústrias no mundo utilizam o colostro na forma de leite imune.

Provavelmente os preconceitos e a proibição de adicionar colostro ao leite que será comercializado (ANVISA, 2012), leva ao senso comum de que o colostro não pode ser usado em alimentação humana. Entretanto esta recomendação deve-se à diferença de constituição entre eles que pode trazer problemas tecnológicos, relacionados com a instabilidade proteica face ao tratamento térmico durante a pasteurização (BEHMER, 1999).

Além do potencial para utilização de colostro *in natura*, neste experimento ficou demonstrado que a silagem de colostro pode ser utilizada como base para produção de derivados lácteos.

Conforme o MAPA (2005) bebida Láctea é o produto onde a base láctea represente pelo menos 51% (cinquenta e um por cento) massa/massa (m/m) do total de ingredientes do produto. Pode, também, ser caracterizada como um produto fermentado mediante a ação de cultivo de micro-organismos específicos, e/ou adicionado de leite fermentado e/ou outros produtos lácteos fermentados, e que não poderá ser submetido a tratamento térmico após a fermentação. A contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de  $10^6$ UFC/g, no produto final, para o(s) cultivo(s) láctico(s) específico(s) empregado(s), durante todo o prazo de validade. Saalfeld et al demonstrou em 2012 que a silagem de colostro tem quantidades de *Lactobacillus* spp. necessárias para sua classificação como bebida láctea e não possui micro-organismos patogênicos.

A silagem de colostro é uma bebida fermentada que apresenta nutrientes superiores ao leite mantendo valores de proteína, matéria seca, umidade e gordura observados no colostro *in natura*, entretanto, foi demonstrado que houve diminuição dos percentuais de lactose em silagem de colostro com 30 dias de fermentação (SAALFELD et al., 2012). Este fato sugere que a silagem de colostro seja base para a formulação de alimentos para pessoas intolerantes a lactose, necessitando maiores estudos.

O método de obtenção da manteiga usando a matéria gorda da silagem de colostro está de acordo com o que determina a legislação (BRASIL, 1996), entretanto, o resultado de acidez titulável (em ácido láctico) foi de 3,24% e a umidade foi de 52,37% valores superiores ao estabelecido como parâmetro de qualidade para manteiga de leite de vaca que é de no máximo 16% para umidade e 3% para a acidez segundo a Resolução nº4 de 28 de junho de 2000 (BRASIL, 2000). Na manteiga e bebida láctea não foi identificado crescimento bacteriano nos meios de ágar sangue, MacConkey e Chapmann, indicando qualidade higiênica sanitária do produto, conforme estabelecido pela Resolução nº12 de 02 de janeiro de 2001.

Nos dois alimentos foi identificado o crescimento de *Lactobacillus* spp. em meio MRS. Baseado nos estudos de Buriti (2007) possivelmente haja possibilidade de utilizar o *Lactobacillus* spp. da silagem de colostro como probióticos. Após a adição de produtos para enriquecimento de sabor da bebida láctea houve crescimento de bolores e leveduras, havendo necessidade de controle de qualidade destes aditivos.

Na produção da bebida buscou-se preservar características físico-químicas naturais do produto inicial, proporcionando apresentação, coloração e sabor atrativos à alimentação humana. Na avaliação físico-química da silagem de colostro sem a gordura foram encontrados os valores de 6,36% a 14,45% para proteína, superiores aos encontrados no leite relatado por (KEHOE, 2007). A variação observada entre as amostras está relacionada ao tempo da ordenha pós-parto, individualidade, manejo, alimentação, duração do período seco e raça da vaca produtora. Artesanalmente, em propriedades rurais a elaboração da bebida com esta variação centesimal não é limitante, visto que a mesma variação é observada no leite. Para a industrialização do produto, deverão ser estabelecidos padrões nutricionais, da mesma forma como acontece no leite pasteurizado. Os resultados de pH foram de 3,67 a 4,27 com gosto ácido e a avaliação de ácido láctico apresentou variação de 10,55 a 22,90%. Após a adição do bicarbonato, aromatizante e açúcar o pH ficou em média de 4,9 e o sabor ficou agradável.



Após 21 dias de fermentação a silagem de colostro apresentou apenas *Lactobacilos* spp. viáveis, com valores superiores ao valor médio de  $10^6$  UFC/g necessário para um produto final de bebida láctea fermentada. Nossa avaliação é que esta bebida pode ser utilizada como fonte de *Lactobacillus* spp. vivos com potencial probiótico. Oficinas de preparação destes produtos com agricultores familiares têm despertado interesse e adoção pela família rural.

Ainda não existe legislação específica para produtos à base de colostro e silagem de colostro, tanto para contagem bacteriana como para avaliação física e química. Neste trabalho foi utilizada como parâmetro a legislação existente para produtos lácteos.

A pesquisa sensorial realizada com a manteiga e dois sabores da bebida mostrou uma boa aceitação do produto. Percebemos que tanto a bebida láctea de morango quanto a de chocolate seriam adquiridas pelas pessoas que participaram da pesquisa, sendo que a bebida do sabor morango teve uma aprovação maior com 85,72% comparado com 82,14% do sabor chocolate (dados não mostrados).

#### **4 CONCLUSÃO:**

O colostro bovino é um alimento com qualidade nutricional que apresenta percentuais de proteínas, gorduras, cinzas e sólidos totais superiores ao leite, oferecendo potencialidade para ser estudado e beneficiado para uso na dieta humana. Neste trabalho, pode-se concluir que é possível produzir manteiga e bebida láctea tendo como base a silagem de colostro. A manutenção de *Lactobacillus* spp. viáveis em quantidades suficientes sugere que esta bebida tem potencial probiótico. Em relação à legislação microbiológica para lácteos os produtos estão aptos para consumo, existindo a necessidade de regularizar a legislação de alimentos a base de silagem de colostro junto ao MAPA.

#### **5 REFERÊNCIAS**

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) - **Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal**. Disponível em: <[http://www.agais.com/normas/riispoa/riispoa\\_titulo8a.pdf](http://www.agais.com/normas/riispoa/riispoa_titulo8a.pdf)>. Acesso em 08 ago 2012.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite: queijo, manteiga, caseína, iogurte, sorvetes e instalações: produção, industrialização, análise**. 13. ed. São Paulo: Nobel, 322 p. 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria nº146, de 07 de março 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 11 maio 1996, seção 1, p.3977.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). RESOLUÇÃO Nº 4, DE 28 DE JUNHO DE 2000. Institui o produto denominado “ manteiga comum” para comercialização exclusiva no território nacional, que deverá atender, provisoriamente às seguintes especificidades de qualidade. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 05 jul. 2000. Seção I, p.5.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA. Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília 24 de ago. 2005. Seção I. p 7

BURITI F.C.A Y SAAD, S. M. I. 2007. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, Venezuela, vol 57 n.4, 2007.

CLAY, J. **Freeze the footprint of food**. *Nature* 475. 287-289 julho 2011 doi: 10.1038/45287a

DALTON C. **Cooking with Colostrum** Disponível em <<http://www.lifestyleblock.co.nz/lifestyle-file/rural-people-a-issues/recipes/item/363.html>> acesso em 05 ago 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2011. THE STATE OF FOOD AND AGRICULTURE (FAO) 2010-2011, Disponível em <<https://www.fao.org.br/download/i2050e.pdf>>. Acesso em 08 abr 2011.

FOLEY, J. A. e OTTERBY, D.E. Availability, storage, treatment, composition, and feeding value of surplus colostrums: a review. **Journal of Dairy Science**, v.61, p.1033-1060, (1978) Champpaing., 61:1033-1060(1978)

GODWIN C. **How to Make Beestings Pudding**. Disponível em <[http://www.ehow.com/how\\_6167575\\_make-beestings-pudding.html](http://www.ehow.com/how_6167575_make-beestings-pudding.html)> acesso em 05/08/2012

GONZALES, F.H.D; DÜUR J.W.; FONTANELI R.S. **Uso do leite para monitorar o metabolismo e nutrição de vacas leiteiras**. Porto Alegre 72 p. 2001.

GONZALEZ ,M.M.; GARCIA, C.; E, LÓPEZ, A. Disponibilidad de excedentescolostrales provenientes de vacas Holstein Friesian. **Archivos de Medicina Veterinária**, Valdivia, Chile, v.9, 1978

HE, F.; TUOMOLA, E.; ARVILOMMI, H.; SALMINEN S. Modulation of human humoral immune response through orally administered bovine colostrums. **FEMS Immunology and Medical Microbiology** 31. p. 93-96, 2001

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. V.1 São Paulo: **O Instituto**, p 180 (1985).

KALAFAT Y. **Iranian Turkish Folk Cuisine**, Disponível em <<http://www.turkish-cuisine.org/english/pages.php?ParentID=3&FirstLevel=28&>> acesso em 05 ago 2012

KEHOE S. I.; JAYARAO B. M. AND HEINRICHS A. J. A Survey of Bovine Colostrum Composition and Colostrum Management Practices on Pennsylvania Dairy Farms. **Journal of Dairy Science** Vol. 90 No. 9, 2007.

LANUZA, F.; BUTENDIECK, N.; GONZÁLES, F.; STEHR, G.; GARCIA, F. Y HELLBERG, I. (1980). Variaciones en la composición química y microbiana del calostro acidificado a distintas temperaturas. **Av. Prod. Anim.** Vol.5, n.45, 1980.

MERO, A.; MIIKKULAINEN H.; RISKI, J.; PAKKANEN, R.; AALTO, J. ;TAKALA T..Effects of bovine colostrum supplementation on serum IGF-I, IgG, hormone, and saliva IgA during training. **J Appl Physiol.** V. 83, p.1144-1151, 1997.

NEITZ, M.H. Milk composition and the factors influencing it KwaZulu-Natal. **Indústria de Laticínios** 6,2 1.995 disponível em <[http://agriculture.kzntl.gov.za/publications/production\\_guidelines/dairying\\_in\\_natal/dairy6\\_2.htm](http://agriculture.kzntl.gov.za/publications/production_guidelines/dairying_in_natal/dairy6_2.htm)> acesso em 05 ago 2012.

OLIVEIRA, M. **Fatores de Transferência para enfrentar o câncer** 2012 . Disponível em <<http://www.conhecersaude.com/geral/3479-fatores-de-transferencia-para-enfrentar-o-cancer.html>> Acesso em 08 ago 2012.

PLAYFORD, R.J.; FLOYD, D.N.; MACDONALD, C.E.; CALNAN, D.P.; ADENKAN,R.O.; JOHNSON, W.; GOODLAD, R.A. AND MARCHBANK, T. Bovine colostrum is health supplement which prevents NSAID induced gut damage. **Gut**, v. 44, 653-658. 1999.

SAALFELD, M.H. Uso da Silagem de colostro como substituto do leite na alimentação. **A Hora Veterinária**. Porto Alegre ano 27, n. 162, p. 59-62, março/abril, 2008.

SAALFELD, M.H.; PEREIRA D.I.B.; SILVEIRA K.R.K.; GRANDA E.; GULARTE M.A. e LEITE F.P.L. Silagem de colostro: alternativa sustentável para minimizar a fome no mundo. **4º SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR- 4.** 2012 Gramado Anais... Gramado: FAURGs Rs, 2012.

SABIN, AB. **Substância Antipoliomielitic no leite de seres humanos e vacas certas** AMA Am J Dis Criança v. **80, n. 5, p. 866-7** PMID 14777169 . 1950.

SMAKEBITEN Anne-lise 2010 <http://smakebiten.com/2010/12/10/ramelkspudding-kyrost-eller-kalvedans/> acesso 05 ago 2012 .

SOUZA, M.A.F. **Dos laboratórios aos pontos de venda:Uma análise da trajetória dos alimentos Funcionais e nutracêuticos e sua Repercussão sobre a questão.** 2008. Tese (Doutorado) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Humanas e Sociais.

URUAKPA, F.O.; ISMOND, M.A.H.; AKOBUNDU, E.N.T. **Colostrum and its benefits: a review.** Nutr. Res., v.22, p.755–767, 2002.

WIKIPEDIA, a enciclopédia livre. Disponível em <http://pt.wikipedia.org/wiki/Leip%C3%A4juusto> Acesso em : 05 ago. 2012

WISE geet clear answers for common questions. Disponível em <http://www.wisegeek.com/what-is-uunijuusto.htm> . Acesso 05 maio 2012

## 8 CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível concluir que:

- 1) A silagem de colostro bovino é um sucedâneo lacteo adequado para a alimentação de bezerros com constituintes nutricionais superiores ao leite, com exceção da lactose.
- 2) O processo de fermentação é consequência de bactérias ácido lácticas caracterizadas genotipicamente como *Lactobacillus* e *Enterococcus*, sendo predominantemente *L. casei*.
- 3) A silagem de colostro mantém os níveis de imunoglobulinas, sendo capaz de transferir imunidade passiva para bezerros recém-nascidos.
- 4) A silagem de colostro oferece potencialidade para ser estudada e beneficiada para uso na dieta humana.

## REFERÊNCIAS

- ALLEN, N. N. The Use of stored colostrum to replace marketable milk for calf feeding. **J. Dairy Sci.**, v.27, p.652-653, 1944.
- ARANDA, P.; SANCHEZ, L., M.; PEREZ, D.; ENA, J. M.; CALVO, M. Insulin in Bovine Colostrum and Milk: Evolution Throughout Lactation and Binding to Caseins **J. Dairy Sci.** v. 74, 12, p 4320-4325, 1991.
- BALLONE, G. J.; MOURA, E. C - *hGH - Hormônio do Crescimento* - in. **PsiquWeb**, Internet, disponível em <[www.psiqweb.med.br](http://www.psiqweb.med.br)>, revisto em 2005 acesso em 14/06/2011.
- CASTRO, A. L. M.; CAMPOS, W. E.; MANCIO A. B.; PEREIRA, J. C.; CECON, P. R. Desempenho e rendimento de carcaça de bezerros alimentados com colostro fermentado, associado ao óleo de soja e zeranol. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, n.2, p.193-201, 2004.
- CAMPOS, O. F.; LIZIEIRE, S. R.; RODRIGUES, A. A.; VERNEQUE, R. S. Colostro fermentado a temperatura ambiente, sem aditivos para bezerros leiteiros. **Rev. Soc. Bras. Zoot.**, v.15 nº4, p.338-349, 1986.
- DRACKLEY, J. K. Critical evaluation of feeding options for replacement calves. Pages 141-152 in *Advances in Dairy Technology*, vol. 11, J. Kennelly, ed. **Proc. Western Canadian Dairy Seminar**, Univ. Alberta, Edmonton, AB, Canada. 1999.
- DONAHUE, M.; GODDEN, S. M.; BEY, R.; WELLS, S.; OAKES, J. M.; SREEVATSAN, S.; STABEL, J.; FETROW, J. Heat treatment of colostrum on commercial dairy farms decreases colostrum microbial counts while maintaining colostrum immunoglobulin G concentrations. **Journal of Dairy Science** v. 95 n. 5 p.2697-2702,
- EHRlich, P. Ueber Tmmunitat Durch Vererbung Und S-Augung., "in 12 ed: 183-203, 1892.
- EWERS, I.; RIZZO, L. V.; KALIL FILHO. J. Imunologia e envelhecimento Aging and immunology einstein; 6 (Supl 1):S13-S20, 2008. Disponível em: <<http://apps.einstein.br/revista/arquivos/PDF/775-Einstein%20Suplemento%20v6n1%20pS13-20.pdf>> Acesso em 20 ab 2013
- FIDLER, A. P.; ALLEY, M. L.; SMITH, G. W. Short communication: serum immunoglobulin G and total protein concentrations in dairy calves fed a colostrum-replacement product. **J. Dairy Sci.** Jul ;v.94 (7):3609- 3612 2011. doi: 10.3168/jds.2011-4358. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21700049>> acesso em 20 mar 2013.
- FOLEY, J. A.; OTTERBY, D. E. Availability, storage, treatment, composition, and feeding value of surplus colostrums: a revive. **J. Dairy Sci.**, v.61, p.1033-1060, 1978.
- GARCIA, F; GONZALEZ, F. Y.; MUNÖZ G. Preservacion de calostro, I. Efecto de aditivos orgânicos. **Ciencia e Investigação Agrária**, V.8, N. 2. 1981.

GEORGIEV, I. P. Alterations in chemical composition of colostrum in relationship to *post partum* time. *Bulg. J. Vet. Med.*, 8, No 1, 35\_39, 2005.

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

GODDEN, S. M.; D. J. SMOLENSKI.; M. DONAHUE, J. M.; OAKES, R. BEY, S. SREEVATSAN, J. STABELAND J. FETROW. 2012. Heat-treated colostrum and reduced morbidity in preweaned dairy calves: Results of a randomized trial and examination of mechanisms of effectiveness. *J. Dairy Sci.* 95:4029-4040.

GODWIN, C. **How to Make Beestings Pudding**. Disponível em <[http://www.ehow.com/how\\_6167575\\_make-beestings-pudding.html](http://www.ehow.com/how_6167575_make-beestings-pudding.html)> acesso em 05/08/2012

GONZÁLES, M. M.; GARCÍA, C. E.; LÓPEZ, A. Disponibilidade de excedentes calostrales provenientes de vacas Holstein Friesian Archivos de Medicina Veterinária, Vol X Valdivia Chile 1978.

HOWE, P. E. An effect of the ingestion of colostrum upon the composition of the blood of new born calves. *J. biol. Chem*, V.49, p.115-118. 1921.

HURLEY, W. L.; THEIL, P. K. Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Milk. *Nutrients* 3, 442-474; 2011.

KALAFAT Y. **Iranian Turkish Folk Cuisine**, Disponível em <<http://www.turkishcuisine.org/english/pages.php?ParentID=3&FirstLevel=28>> > acesso em 05 ago 2012

KEHOE S. I.; JAYARAO B. M. AND HEINRICHS A. J. A Survey of Bovine Colostrum Composition and Colostrum Management Practices on Pennsylvania Dairy Farms1 *Journal of Dairy Science*, 90, ( 9), 2007.

KLOBASA, F.; GOEL, M. C. AND WERHAHN, E. Comparison of freezing and lyophilizing for preservation of colostrum as a source of immunoglobulins for calves *J. Anim. Sci.* 76:923-926, 1998.

KURALKAR, P. AND KURALKAR S.V. Nutritional and Immunological Importance of Colostrum for the new born *Veterinary World*, Vol 3(1) 46-47, 2010.

LANUZA, A. F.; BUTENDIECK, N.; STEHR G.H.; BELTRAN, A. Calostro ácido en alimentación de terneros. *Arch. Med. Vet* 10 (1): 13-16,1978.

LANUZA, A. F.; BUTENDIECK, B. N.; STEHR, G. H.; PENEDA, A. R. Calostro feremntado naturalmente vx calostro acidificado preservado con formalina para terneros nacidos en primavera. *Agricultura Tecnica* (Chile) 56-69 , 1990.

MCGUIRK, S. and COLLINS, M. Managing the production, storage and delivery of colostrum. *Veterinary Clinics of North America—Food Animal Practice*. New York. V. 20, p. 593–603, 2004

MERO, A.; MIIKKULAINEN, H.; RISKI, J.; PAKKANEN, R.; AALTO, J.; TAKALA, T. Effects of bovine colostrum supplementation on serum IGF-I, IgG, hormone, and saliva IgA during training. *J Appl Physiol.* v. 83, p.1144-1151, 1997.

MORRILL, K. M.; CONRAD, E.; LAGO, A.; CAMPBELL, J.; QUIGLEY, J.; TYLER, H. Nationwide evaluation of quality and composition of colostrum on dairy farms in the United States *J. Dairy Sci.*, v. 95, i. 7, p. 3997-4005, 2012.

MORIN, D. E; McCOY, G. C; HURLEY, W. L. Effects of quality, quantity, and timing of colostrum feeding and addition of a dried colostrum supplement on immunoglobulin G1 absorção in Holstein bull calves. **J. Dairy Sci.**, Champaign, Ill., US, v.80, n.4, p.747-753, 1997.

**NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th. ed. National Academic Press, Washington. 2001.**

OLIVEIRA, M. **Fatores de Transferência para enfrentar o câncer** 2012 . Disponível em <<http://www.conhecersaude.com/geral/3479-fatores-de-transferencia-para-enfrentar-o-cancer.html>> Acesso em 08 ago 2012.

PAULETTI, P.; BAGALDO, A. R.; KINDLEIN, L.; DE PAZ, C. C. P.; Lanna, D. P. D.; Machado Neto, R. IGF-I e IgG séricos e nas secreções lácteas em vacas tratadas com rbST no período pré-parto. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 34, p.976–986, 2005.

PLAYFORD, R. J.; FLOYD, D.N.; MACDONALD, C. E.; CALNAN, D. P.; ADENEKAN, R. O.; JOHNSON, W.; GOODLAD, R. A. AND MARCHBANK, T. **Bovine colostrum is health supplement which prevents NSAID induced gut damage**. Gut, v. 44, 653^658. 1999.

PRIESTLEY, D. ; BITTAR, J. H.; IBARBIA, L.; RISCO, A. A.; GALVÃO, K. N. Effect of feeding maternal colostrum or plasma-derived or colostrum-derived colostrum replacer on passive transfer of immunity, health, and performance of preweaning heifer calves. **J. Dairy Sci.**, v.96, c.5, p. 3247-3256, 2013.

QUIGLEY, J. The role of oral immunoglobulins in systemic and intestinal immunity of neonatal calves. Diamond V Mills, Cedar Rapid,Iowa, USA. 2004. Disponível em: [https://www.extension.iastate.edu/dairyteam/sites/www.extension.iastate.edu/files/dairyteam/RoleOfOralImmunoglobins\\_Quigley.pdf](https://www.extension.iastate.edu/dairyteam/sites/www.extension.iastate.edu/files/dairyteam/RoleOfOralImmunoglobins_Quigley.pdf) . Acesso em 12 fev 2013.

RAMÍREZ-SANTANA, C.; PÉREZ-CANO, F. J.; AUDÍ. C.; CASTELL, M.; MORETONES, M. G.; LÓPEZ-SABATER, M. C.; CASTELLOTE. C.; FRANCH, A. Effects of cooling and freezing storage on the stability of bioactive factors in human colostrum. **J. Dairy Sci**. v. 95, c.5, p. 2319-25, 2012.

SAALFELD, M. H. Uso da Silagem de colostro como substituto do leite na alimentação. **A Hora Veterinária**, Ano 27, n. 162, p. 59-62, 2008.

SMITH, G. W.; FOSTER, D. M. **Short communication: Absorption of protein and immunoglobulin g in calves fed a colostrum replacer**. J Dairy Sci, Jun; v. 90, c.6, p.2905-2908, 2007.

SMITH, T.; LITTLE, R. B. 1922. Cow serum as a substitute for colostrum in new-born calves. **J. Exp. Med**; 36.181-198.



STEWART, S.; GODDEN, S.; BEY, R.; RAPNICKI, P.; FETROW, J.; FARNSWORTH, R. SCANLON, M.; ARNOLD, Y.; CLOW, L.; MUELLER, K. AND FERROUILLET, C. Preventing Bacterial contamination and Proliferation During the Harvest, Storage, and Feeding of Fresh Bovine Colostrum. **J. Dairy Sc.**, v. 88. 2571-2578, 2005.

THAPA, B. R. Therapeutic potential of bovine colostrum. **Indian J Pediatr.**, c. 12 (10), p. 849-852, 2005.

**ANEXO**



## ANEXO A: DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE

 INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL PROTOCOLO GERAL 28/02/2013 12:00 DERS  BR 10 2013 004797 0	Espaço reservado ao protocolo
Espaço exclusivo do INPI >	
Espaço para etiqueta	

---

### DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

**Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:**  
 O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

**1. Depositante (71):**

1.1 Nome: Universidade Federal de Pelotas -UPPEL

1.2 Qualificação

1.3 CNPJ/CPF: 92242080/0001-00

1.4 Endereço Completo: Rua Gomes Carneiro N° 1

1.5 CEP: 96010-610                      1.6 Telefone: (53)32293090                      1.7 Fax:

1.8 E-mail: agtpt@hotmail.com

continua em folha anexa

**2. Natureza:**     Invenção                       Modelo de Utilidade                       Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: Invenção

**3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):**

PROCESSO DE UTILIZAÇÃO DA FERMENTAÇÃO ANAEROBICA DO COLOSTRO (SILAGEM DE COLOSTRO) NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS, MEDICAMENTOS, INSUMOS E ADITIVOS DE USO HUMANO. VETERINÁRIO E AGRÍCOLA.

continua em folha anexa

**4. Pedido de Divisão:** do pedido N°                      Data de Depósito:

**5. Prioridade:**                       interna                       unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

**6. Inventor (72):**

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

6.1 Nome: Mara Helena Saalfeld

6.2 Qualificação: Doutoranda em Biotecnologia                      6.3 CPF: 27060985034

6.4 Endereço completo: Quinze de Novembro 1093 ap 401

6.5 CEP: 96015-000                      6.6 Telefone: 53 32227070                      6.7 Fax:

6.8 E-Mail: mara.s@brturbo.com.br

continua em folha anexa

**INPI** Formulário 1.01 – Depósito de Pedido de Patente ou de Certificado de Adição (folha 1/2 )