

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Engenharia Zootécnica

Dissertação

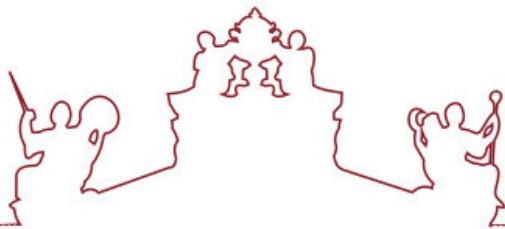
**Refractómetro de Brix como ferramenta para avaliar a
qualidade do colostro bovino**

Rute Isabel Matias Sobral

Orientador(es) | Cristina Maria dos Santos Conceição

Flávio Silva

Évora 2025



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Engenharia Zootécnica

Dissertação

**Refractómetro de Brix como ferramenta para avaliar a
qualidade do colostro bovino**

Rute Isabel Matias Sobral

Orientador(es) | Cristina Maria dos Santos Conceição
Flávio Silva

Évora 2025



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | José Manuel Martins (Universidade de Évora)

Vogais | Ana Carina Alves Pereira de Mira Geraldo (Universidade de Évora) (Arguente)
Flávio Silva (Universidade de Évora) (Orientador)

Évora 2025

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço à Professora Cristina Conceição, pela orientação e incentivo, não só na elaboração desta dissertação, mas durante todo o meu percurso académico.

Ao Engenheiro Flávio Silva, pelo apoio, paciência, disponibilidade e a dedicação e por todos os conhecimentos transmitidos.

Ao Miguel, por estar ao meu lado, por não ter desistido de mim e ter acreditado. Pelos sorrisos que me proporcionou e pelas experiências.

Às madrinhas que Évora me deu, Inês e Beatriz por estarem presentes sempre que precisei, pelos concelhos e pelos desabafos.

À Catarina, a minha amiga que levo para sempre comigo. Pelas conversas, pela companhia e pela amizade.

A toda a minha família pelo apoio que me deram durante toda a minha vida. Especialmente à minha avó Amélia, que possibilitou toda esta minha experiência. Aos meus pais, ao Miguel, pelas nossas brincadeiras, pelos nossos passeios e pelos momentos divertidos que passámos juntos.

À Dona Margarida pela prontidão em ajudar, a atenção e pelas reflexões.

Por fim, agradeço a todos os amigos que estiveram presentes ao longo deste percurso e a todas as pessoas que, de forma direta ou indireta, contribuíram e deixaram a sua marca.

Refratômetro de Brix como ferramenta para avaliar a qualidade do colostro bovino

Resumo

O refratômetro de Brix é amplamente utilizado para avaliar a qualidade do colostro bovino. O objetivo deste trabalho foi avaliar a associação entre o grau Brix e a concentração dos parâmetros principais do colostro. Foram analisadas 82 amostras de colostro de bovinos leiteiros, encontrando-se uma média de $25,18\% \pm 4,87\%$, de matéria seca, $4,63\% \pm 3\%$, de gordura, $15,25\% \pm 3,64\%$, de proteína e $52,53 \text{ g/L} \pm 24,54 \text{ g/L}$ de imunoglobulina G (IgG). O Brix médio foi de $25,26 \pm 4,26$ tendo observado-se uma relação linear significativa entre o Brix e os níveis de proteína ($R^2=0,81$), e matéria seca ($R^2=0,62$) e IgG ($R^2=0,56$). Foi obtido um ponto de corte de 25,1% Brix para identificar colostro de boa qualidade ($\text{IgG} \geq 50 \text{ g/L}$), com uma sensibilidade de 80% e uma especificidade de 76%. O colostro com $\text{Brix} \geq 25,1$ apresentou maior teor de matéria seca e proteína, mas não de gordura. O refratômetro Brix revelou ser uma boa ferramenta para diferenciar o colostro de acordo com o seu valor imunológico.

Palavras-chave: Refratometria, Bovinos leiteiros, Vitelos, Bem-estar, Imunoglobulina G

Brix refractometer as a tool to evaluate the quality of bovine colostrum

Abstract

The Brix refractometer is widely used to assess the quality of bovine colostrum. The aim of this study was to evaluate the association between the Brix degree and the concentration of the main colostrum parameters. A total of 82 bovine colostrum samples were analyzed, with an average of $25.18\% \pm 4.87\%$ dry matter, $4.63\% \pm 3\%$ fat, $15.25\% \pm 3.64\%$ protein, and $52.53 \text{ g/L} \pm 24.54 \text{ g/L}$ immunoglobulin G (IgG). The average Brix value was 25.26 ± 4.26 , and a significant linear relationship was observed between Brix and protein levels ($R^2 = 0.81$), dry matter ($R^2 = 0.62$), and IgG ($R^2 = 0.56$). A cutoff point of 25.1% Brix was determined to identify good quality colostrum ($\text{IgG} \geq 50 \text{ g/L}$), with a sensitivity of 80% and a specificity of 76%. Colostrum with $\text{Brix} \geq 25.1\%$ had higher dry matter and protein content, but not higher fat content. The Brix refractometer proved to be a useful tool for differentiating colostrum based on its immunological value.

Key-words: Refractometry, Dairy cattle, Calves, Welfare, Immunoglobulin G

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Índice de Figuras	v
Índice de Tabelas	vi
Lista de Abreviaturas e Acrónimos.....	vii
1. Introdução.....	8
2. Revisão bibliográfica.....	10
2.1. O colostro bovino	10
2.1.1. Composição do colostro bovino	11
2.1.2. Avaliação da composição do colostro	16
3. Materiais e Métodos.....	24
3.1. Recolha e conservação das amostras	24
3.2. Processamento laboratorial das amostras.....	24
3.3. Análise estatística	30
4. Resultados e Discussão.....	32
4.1. Concentração dos constituintes do colostro e do grau Brix.....	32
4.2. Relação entre o grau Brix e os constituintes do colostro	34
4.2.1. Análise de correlação.....	34
4.2.2. Análise de regressão	36
4.2.3. Modelos de regressão linear múltipla.....	38
4.3. Determinação do valor de <i>cut-off</i> de Brix para identificação da qualidade do colostro	39
4.4. Avaliação da qualidade nutricional com base no refratômetro Brix	41
5. Considerações finais.....	45
6. Referências bibliográficas	46

Índice de Figuras

Figura 1: Refratómetro digital (Fonte: Agriterra, 2020)	21
Figura 2: Refratómetro ótico (Fonte: fruugo, s.d.)	21
Figura 3: Interpretação dos resultados do colostrómetro (Fonte: Bittar e Paula, 2020)	22
Figura 4: Medidor de pH (Fonte: Prolab, 2018)	22
Figura 5: Cadiños na estufa (Fonte: Própria)	25
Figura 6: Cadiños a arrefecer no exsicador (Fonte: Própria).....	25
Figura 7: Pipetagem da amostra de proteína (Fonte: Própria)	26
Figura 8: Figura 8: Leco, instrumento de leitura de proteína bruta (Fonte: Própria)....	26
Figura 9: Adição da restante amostra no butirómetro (Fonte: Própria)	27
Figura 10: Colocação de um recipiente sobre as amostras de forma a não solidificar as mesmas (Fonte: Própria)	27
Figura 11: Butirómetros dentro da centrifugadora (Fonte: Própria)	28
Figura 12: Leitura da percentagem de gordura (Fonte: Própria).....	28
Figura 13: Pipetagem da amostra de densidade (Fonte: Própria)	29
Figura 14: Curva ROC, com valor de cut-off, sensibilidade e especificidade (Fonte: R Core Team, 2024).....	40
Figura 15: Colostros de qualidade inadequada e adequada na percentagem da MS para o valor de cut-off de 25,1%	42
Figura 16: Colostros de qualidade inadequada e adequada na percentagem da proteína para o valor de cut-off de 25,1%	43
Figura 17: Colostros de qualidade inadequada e adequada na percentagem de gordura para o valor de cut-off de 25,1%	43

Índice de Tabelas

Tabela 1: Composição do colostro bovino	12
Tabela 2: Métodos de avaliação da composição do colostro (Adaptado de Gomes & Oliveira, 2018)	17
Tabela 3: Análise descritiva da composição físico-química do colostro.....	32
Tabela 4: Matriz de correlção entre os parâmetros avaliados no colostro bovino.....	35
Tabela 5: Regressão linear simples entre o Brix e os constituintes do colostro analisados	37
Tabela 6: Comparação de modelos	38
Tabela 7: Modelo de Regressão linear múltipla relativo à relação entre os componentes do colostro e o Brix. São representados os coeficientes (erro padrão) para cada variável.	
.....	39

Lista de Abreviaturas e Acrónimos

- AIC - Akaike Information Criterion
ANOVA - Analysis of Variance
AOAC - Association of Official Agricultural Chemists
AUC – Area Under the Curve
BIC - Bayesian Information Criterion
d - Densidade
DCT – Detetor de Condutividade Térmica
DIC – Detetor de Ionização de Chama
ELISA – Enzyme Linked ImmunoSorbent assay
ENA – Extratos Não Azotados
ESD - Extrato seco desengordurado
FIL – Fédération Internationale du Lait
g - Gramas
g/cm³ - Grama por centímetro cúbico
g/L – Gramas por litro
g/mL – Gramas por mililitro
°C – Graus Celsius
IDF – Federação Internacional de Lacticínios
Igs - Imunoglobulinas
IgA – Imunoglobulina A
IgG – Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
IU/g gordura - Unidades Internacionais por grama de gordura
ISO – International Organization for Standardization
Kg/dm³ - Quilograma por decímetro cúbico
m - Massa
mg/mL - Miligramas por mililitro
m/L - Mililitros por litro
MS – Matéria seca
NIR – Espectroscopia no infravermelho próximo
NP – Norma Portuguesa
ng/mL - Nanograma por mililitro
pH – Potencial de hidrogénio
PB – Proteína Bruta

RID – Radial Immunodiffusion assay

RMSE - Root Mean Squared Error

SI - Sistema Internacional de Unidades

TPI - Transferência Passiva de Imunidade

% - Percentagem

VIF – Variance Inflation Factor

v - Volume

$\mu\text{g/g}$ gordura – Microgramas por grama de gordura

$\mu\text{g/mL}$ – Microgramas por mililitro

$\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ – Microgramas por 100 mililitros

$\mu\text{g/L}$ – Microgramas por litro

1. Introdução

O colostrum é a primeira secreção mamária, rico em macro e micronutrientes e compostos bioativos com atividade antimicrobiana. Este é crucial para a assistência nutricional, imunológica, e para o crescimento e desenvolvimento do recém-nascido (Playford & Weiser, 2021).

Os vitelos nascem desprovidos de imunidade adquirida, uma vez que não ocorre transferência placentária de imunoglobulinas da mãe para o feto durante a gestação (Larson et al., 1980). Por este motivo, a aquisição de imunidade passiva depende exclusivamente da ingestão de colostrum com elevada concentração de imunoglobulina G (IgG) (Baumrucker et al., 2010). Quando a quantidade de IgG ingerida é insuficiente, verifica-se uma falha na transferência passiva da imunidade (TIP), clinicamente definida por uma concentração sérica de IgG inferior a 10 mg/mL (Calloway et al., 2002). Embora a avaliação da concentração sérica de IgG forneça uma importante informação sobre a TIP, serve também como um proxy para avaliar os benefícios adicionais da ingestão de colostrum, como os fatores antimicrobianos e nutritivos, a provisão de fluidos e de calor (Lombard et al., 2020). A prevenção da TIP exige a administração rápida de colostrum de elevada qualidade, contendo pelo menos 50 mg/mL de IgG, valor que pode ser determinado através do método de difusão radial (RID – *Radial Immunodiffusion*) (McGuirk e Collins, 2004; Godden, 2008). Tendo em conta a elevada variabilidade na qualidade do colostrum e a significativa prevalência da TIP, é fundamental que os produtores avaliem previamente a concentração de IgG no colostrum antes de o fornecer aos vitelos ou de o conservar para utilizações futuras.

A avaliação da qualidade do colostrum em contexto de exploração deve reunir critérios de fiabilidade, precisão e facilidade de execução (Fleenor e Stott, 1980). Recentemente, foi sugerido que o refratômetro grau de Brix constitui uma ferramenta fiável para a determinação da concentração de IgG no colostrum bovino, sendo considerado que valores entre 18% e 23% Brix representam um valor de *cut-off* adequado para classificar o colostrum como de boa qualidade de forma a garantir uma proteção imunológica eficaz aos vitelos (Chigerwe et al., 2008; Bielmann et al., 2010; Quigley et al., 2013). Esta praticidade permite que os produtores avaliem diretamente, no campo, a qualidade do colostrum e tomem decisões imediatas quanto à sua administração, otimizando a transferência passiva de imunidade e reduzindo o risco de doenças neonatais (Elewa et al., 2020). Embora a avaliação imunológica, baseada na concentração de IgG, seja o método mais comum para aferir a qualidade do colostrum, existem também abordagens complementares centradas na análise da sua composição nutricional. Estas incluem a medição da matéria seca, das frações azotadas, do teor de

gordura butírica, da lactose, bem como a determinação dos componentes minerais e vitamínicos (Unamuzaga et al., 2024).

Este estudo tem como objetivo investigar as associações entre as leituras de grau Brix e componentes como matéria seca (MS), proteína bruta (PB), gordura, extrato seco desengordurado (ESD) e IgG, assim como a eficácia do Brix em distinguir colostrum de alta qualidade, definido tanto pela concentração de IgG como pelos restantes componentes.

2. Revisão bibliográfica

2.1. O colostro bovino

Segundo a Comissão Europeia (2006), o colostro é definido como o fluido secretado pela glândula mamária dos mamíferos, após o parto, sendo rico em anticorpos e minerais e que precede a produção de leite. Na bibliografia encontram-se significados semelhantes e que complementam esta última definição. Foley & Otterby (1978); Abdou et al., (2012) e; Yilmaz & Kaşikçi (2013) referem que o colostro é o fluido formado na fase final da gestação, constituído por secreções lácteas e constituintes do soro sanguíneo, acumulando-se na glândula mamária durante o período seco e pré-parto e tem como início de secreção o momento logo a seguir ao parto, sendo distinguível do leite nos parâmetros físicos (viscosidade, coloração e densidade) e químicos.

Este fornece uma dieta completa com nutrientes essenciais, energia (podendo aumentar a produção de calor endógeno em 17%) e, graças ao seu poder laxativo, facilita a expulsão de meconígio (Kuralkar & Kuralkar, 2010; Yilmaz & Kaşikçi, 2013; Dwyer et al., 2015).

O colostro tem como principal finalidade assegurar nos primeiros tempos de vida a maior vitalidade possível aos recém-nascidos, conferindo proteção imunológica temporária ao vitelo, contra infecções durante os primeiros dias após o nascimento até que o seu sistema imunitário se torne totalmente funcional. Assim, a ingestão do colostro é particularmente importante na imunidade passiva do recém-nascido, através da transferência de imunoglobulinas maternas (Playford et al., 2000; Blum, 2003; Day & Schultz, 2014; Hailu et al., 2019).

Para que ocorra uma transferência de imunidade passiva eficaz, o colostro deve ser consumido pelo vitelo imediatamente após o nascimento, pois há uma relação linear entre o período de ingestão do colostro e a eficácia de absorção de macromoléculas no lúmen intestinal do neonato. Na realidade, estas, são apenas absorvidas nas primeiras 24 horas após o nascimento do vitelo, com níveis de absorção máxima entre as 2 e 4 horas pós-parto (Godden et al., 2009). Após o parto, termina a fase referida com lactogénesse I, que abrange a produção de colostro (colostrogénesse), dando-se início à fase seguinte, a lactogénesse II, que engloba a produção de leite (Baumrucker & Bruckmaier, 2014). Assim, a composição do colostro muda de forma continua após o parto, com uma diminuição o seu valor nutritivo ao longo do tempo.

2.1.1. Composição do colostro bovino

Segundo El-Loly (2022) a composição do colostro está divida em composição nutricional, composição imunológica e fatores de crescimento. Os componentes incorporados na fração nutricional são a água, a proteína, gordura, carboidratos, vitaminas e minerais. No que concerne à fração imunológica, esta é constituída por imunoglobulinas (Igs) e componentes com atividade antimicrobiana e antiviral. Os fatores de crescimento, estes, são constituidos principalmente pelo fator de crescimento semelhante à insulina e ao fator de crescimento transformador beta.

Existem vários fatores que afetam a composição do colostro. Esta é afetada pelo número de lactações, duração do período seco, volume de colostro produzido, raça (Weaver et al., 2000), vacinação (Dunn et al., 2017), exposição a doenças, nutrição (Mann et al., 2016), variação individual (Parrish et al., 1950), início da colostrogénese (Baumrucker & Bruckmaier, 2014) e regulação sistemática e endócrina (Guy et al., 1994a, 1994b). A maioria da bibliografia centra-se no efeito destes fatores na concentração de imunoglobulina G (IgG), mas Dunn et al., (2017), caracterizou os fatores que afetam os componentes do colostro além da concentração de IgG, incluindo a gordura, proteína e lactose.

2.1.1.1. Composição química

Os constituintes químicos do colostro apresentam variações entre as diferentes espécies mamíferas, no entanto, é geralmente rico em energia, proteína, vitaminas e minerais (Dang et al., 2009). Na Tabela 1, encontra-se a composição química e propriedades físicas do colostro de acordo com algumas referências bibliográficas. Além de todos os componentes de importância nutricional e imunológica, o colostro possui na sua constituição uma série de outros componentes bioativos como: fatores e hormonas de crescimento, citoquinas e péptidos bioativos (Blum, 2003; Kuralkar & Kuralkar, 2010; Moreno-Indias et al., 2012; Yilmaz & Kaşikçi, 2013).

Tabela 1: Composição do colostro bovino

Componentes	Colostro bovino	Referências
Sólidos totais (%)	23,9	Playford & Weiser (2021)
Gordura (%)	6,7	Zou et al., (2015)
Lactose (%)	2,7	McGrath et al., (2016)
Proteína (%)	14	
Albumina (%)	6	Playford & Weiser (2021)
Caseína (%)	4,8	
IgG (mg/ mL)	32	
IgA (mg/mL)	1,66	Kehoe et al., (2007)
IgM (mg/mL)	4,32	
Lisozima (mg/L)	0,14 - 0,7	
Lactoferrina (g/L)	1,5 - 5	Korhonen (1977)
Sódio (%)	0,07	
Cálcio (%)	0,26	
Potássio (%)	0,14	Godden et al., (2019)
Magnésio (%)	0,04	
Vitamina A ($\mu\text{g}/100 \text{ mL}$)	295	
Vitamina D (IU/g gordura)	0,89 - 1,81	
Vitamina E ($\mu\text{g}/\text{g gordura}$)	84	Foley & Otterby (1978);
B1 (Tiamina) ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0,58	Godden et al., (2019)
B2 (Roboflavina) ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	4,83	
Hormona de crescimento (ng/mL)	0,17	
Fator de crescimento semelhante à insulina (ng/mL)	870	Elfstrand et al., (2002)
Insulina ($\mu\text{g}/\text{L}$)	65,9	Georgiev (2008); Godden et al., (2019)
Gravidade relativa	1, 056	
pH	6,17	Borad & Singh (2018)

As Ig's são os principais constituintes imunológicos do colostro, uma vez que assumem uma importante função no sistema imunitário do recém-nascido. Como nos bovinos e outros ruminantes, não ocorre transferência de Ig's via placenta, a transferência via colostro é a forma natural mais eficaz de conferir ao neonatos uma defesa imunitária.

adicional, enquanto este desenvolve a imunidade adaptativa. As concentrações de IgG, imunoglobulina A (IgA), imunoglobulina M (IgM) no colostro bovino são altamente heterogéneas, sendo influenciadas por diversos fatores fisiológicos e ambientais (Godden et al., 2019). De acordo com Newby et al., (1982) no colostro as concentrações médias de IgG, IgA, IgM, foram de 75 g/L, 4,4 g/L e 4,9 g/L, respectivamente. Estudos demonstram que a variação interindividual é significativa, com diferenças marcantes entre vacas primíparas e multíparas. O número de partos é um fator importante em relação ao conteúdo de Ig no colostro, sendo que as vacas primíparas apresentam um conteúdo em imunoglobulinas consideravelmente mais baixo do que as vacas multíparas na terceira (ou mais) lactação (Gulliksen et al., 2008). Além disso, fatores como a raça, estação do ano e o estado nutricional da vaca podem modular a produção de imunoglobulinas no colostro.

Uma das razões pela qual o colostro é distinto do leite é devido à sua caracterização proteíca. Num trabalho realizado por Kehoe et al., (2007), a proteína foi definida como o composto predominante no colostro, representando 14,9%, o estudo de Foley & Otterby (1978), apresentou um valor semelhante, de 14%. Esta elevada percentagem é explicada pela presença das Igs, mais concretamente a IgG que durante as primeiras quatro ordenhas, representa 53,6 a 89,1% do teor de proteína. Apesar de haver, ao longo das ordenhas, uma diminuição geral de todas as componentes proteicas do colostro existe uma diminuição especialmente marcada na concentração da IgG, passando, posteriormente a ser, a beta-lactoglobulina, a proteína com maior concentração no colostro (Mach & Pahud, 1971).

Os lípidos representam a segunda grande categoria mais preponderante no colostro. De acordo com Kehoe et al., (2007) e Godden et al., (2019), estes constituem 6,7%, sendo os ácidos gordos saturados os principais constituintes desta classe. Os lípidos presentes no colostro não só constituem uma importante fonte de energia, essencial para os vitelos que nascem com reservas energéticas limitadas, como também desempenham um papel relevante na proteção imunitária dos neonatos, por meio de transporte de vitaminas lipossolúveis. Para além do seu valor energético, esses componentes atuam como agentes termorreguladores, auxiliando os vitelos a manter a temperatura corporal e a sustentar o metabolismo nos primeiros dias de vida. Adicionalmente, os lípidos possuem propriedades antimicrobianas que reforçam as defesas imunológicas, contribuindo para a proteção contra agentes patogénicos. Diversos estudos têm evidenciado que a gordura colostral é determinante para o crescimento, adaptação e sobrevivência dos vitelos no ambiente extrauterino. (Quigley et al., 2012; Fischer et al., 2021).

Relativamente aos carbohidratos, são representados maioritariamente pela lactose. Parrish et al., (1950) retrataram que esta constitui 2,5%, resultados semelhantes aos obtidos por Kehoe et al., (2007). A concentração deste constituinte é baixa no colostro e muda de maneira inversa a outros constituintes. Foi relatado por vários autores que, nas primeiras ordenhas pós-parto, a lactose apresenta baixos níveis, seguido por um aumento constante, até que um nível normal seja atingido, de aproximadamente de 5% (Parrish et al., 1950; Klimes et al., 1986; Tsoulpas et al., 2007; El-Fattah et al., 2012). Uma diminuta percentagem de lactose resulta num colostro extremamente viscoso, uma vez que a sua produção causa um influxo de água no colostro que, por sua vez, regula o volume produzido (Jenness & Holt 1987; Bleck et al., 2009). Nesta situação, a água atua sensitivamente na densidade do leite. Assim a produção do colostro é influenciada pelo fornecimento de água e diminui significativamente quando esta, destinada ao consumo animal, é limitada ou deixa de estar disponível. Daí a importância de se ter água em abundância e de livre acesso ao animal (Moreira, 2014).

No que concerne ao grupo vitamínico podemos dividi-lo em vitaminas lipossolúveis (representadas pelas vitaminas A, D, E e carotenoides) e hidrossolúveis (representadas pelas vitaminas B1, B2, B6, B12, folato – B9, biotina – B7, e ácido pantoténico – B5). O colostro contém de 4 a 10 vezes mais vitaminas A, D e E do que o leite, sendo a principal via de fornecimento destes nutrientes aos recém-nascidos, pois as vitaminas lipossolúveis, em particular, não são capazes de atravessar a barreira placentária (Hodulová et al., 2014).

Os minerais mais importantes no colostro são os macrominerais cálcio, fósforo, potássio, sódio e magnésio. Estes são fundamentais nos ciclos metabólicos enzimáticos celulares (Althaus et al., 2001).

Os principais fatores de crescimento no colostro bovino são o fator de crescimento semelhante à insulina e o fator de crescimento transformador beta. O fator de crescimento semelhante à insulina, é um péptido que controla as ações da hormona de crescimento. Este, por não ser absorvido sistemicamente, pensa-se ter uma ação sobretudo local, relacionada com o desenvolvimento gastrointestinal (nomeadamente com o número das vilosidades intestinais) e com a absorção de IgG (Elfstrand et al., 2002). O fator de crescimento transformador beta atua também no trato gastrintestinal, com um papel importante na manutenção da integridade gastrintestinal em vitelos recém-nascidos. A hormona de crescimento desempenha um papel de crescimento e função intestinal (devido aos receptores desta hormona presentes por todo o trato gastrintestinal) (Jensen et al., 2020).

2.1.1.2 Propriedades físicas

O valor de pH é ligeiramente ácido (com uma variação entre 6,0 e 6,6) na altura do parto, aumentando progressivamente ao longo da lactação, até chegar a um valor próximo do neutro (cerca de 6,5 a 6,7) (McIntyre et al., 1952).

A capacidade de tampão do colostro é definida como a resistência a mudanças no pH (Lucey et al., 1993). McIntyre et al., (1952) relataram que a capacidade tampão do colostro era maior que a do leite e diminuía rapidamente durante as primeiras quatro ordenhas. Klimes et al., (1986) também relataram uma capacidade tampão maior do colostro em comparação ao leite.

O colostro tem uma cor amarelada, em grande parte devido à presença de carotenóides (McGrath et al., 2016). Observou-se que os níveis de carotenóides (β -caroteno) são elevados no colostro inicial, em particular na fração de gordura, mas diminuem acentuadamente durante a primeira semana de lactação. (Parrish et al., 1948; Calderon et al., 2007). Os mesmos autores relataram uma relação linear entre a concentração de β -caroteno e o índice de cor e concluíram que o β -caroteno foi responsável por 65% das variações no índice de cor do colostro.

Durante o período pré-parto, há um aumento da permeabilidade das membranas da glândula mamária e mais constituintes sanguíneos têm acesso ao colostro. Uma cor avermelhada no mesmo pode ser indicativa de infecção intramamária (Olives et al., 2013).

Usando a escala de cor CIE L*, a*, b*, Madsen et al., (2004) relataram que houve mudança de cor na transição do colostro para as seguintes ordenhas. Ficou mais claro (L*, aumentou nas primeiras seis ordenhas), menos vermelho (a*, diminuiu e estabilizou após a segunda ordenha) e menos amarelo (b*, diminuiu nas primeiras 12 ordenhas). Madsen et al., (2004), Argüello et al., (2005) e El-Loly (2022), referiram nos seus estudos que avaliar a qualidade do colostro visualmente não é uma forma precisa, pois um colostro mais amarelo não significa que tenha melhor qualidade quando comprado com um colostro de uma cor mais clara. Esta avaliação visual pode ser útil aquando da verificação do fim do colostro e início do leite de transição, onde o colostro apresenta ser mais viscoso e com um tom amarelado e o leite de transição mais fluido e claro (Chudy et al., 2020).

A densidade absoluta (d) de um sistema é definida como a razão entre sua massa (m) e seu volume (V), expressa pela fórmula $d = m/V$, sendo dependente fundamentalmente da temperatura. Porque a densidade absoluta também é considerada uma propriedade específica de cada substância, e por isso cada substância possui uma densidade característica, essa densidade de substâncias puras é chamada de massa específica

(μ). Por outro lado, a densidade relativa é a relação entre a densidade absoluta de um material e a densidade de uma substância padrão. Para sólidos e líquidos, o padrão mais comumente usado é a água, cuja densidade a 4°C é de 1,000 kg/dm³ (ou 1,000 g/cm³). A unidade de medida da densidade absoluta, no Sistema Internacional de Unidades (SI), é o kg/m³. Já a densidade relativa, por ser uma relação entre densidades, não possui unidade, sendo uma grandeza adimensional (Vaz et al., 2004).

O valor da densidade do colostro varia consoante a bibliografia consultada. De acordo com Maunsell et al., (1998), o colostro de vacas das raças Ayshire e Pardo-Suíça é caracterizado por uma menor densidade (respetivamente: 1,0488 g/mL e 1,0473 g/mL) em comparação ao colostro de vacas Holstein-Frísia (1,0524 g/mL). Strekozov et al., (2008) observaram variações na densidade do colostro de acordo com a época de parto. A densidade de colostro de vacas que pariram no outono foi maior, seguida pelo inverno e depois pela primavera. Durante o outono e o inverno, as vacas tendem a receber dietas mais energéticas, favorecendo o aumento da concentração de nutrientes no colostro. Em contrapartida, nas estações mais quentes, como a primavera, o stress térmico pode comprometer a qualidade do colostro. Soma-se, a influência das alterações hormonais e fisiológicas decorrentes do fotoperíodo e da temperatura, que também podem afetar a sua composição. A densidade do colostro está fortemente associada à sua qualidade imunológica e nutricional, principalmente à concentração de IgG, fundamentais para garantir a imunidade passiva dos recém-nascidos. Em geral, colostros com maior densidade apresentam uma quantidade mais elevada de sólidos totais, como IgG, proteínas e gordura. Por outro lado, colostros com densidade mais baixa tendem a ser mais diluídos, refletindo uma qualidade inferior tanto do ponto de vista imunológico quanto nutricional (Weaver et al., 2000).

Parrish et al., (1950) relataram que a densidade específica do colostro é mais elevada inicialmente, tendo uma diminuição repentina entre a primeira e a quarta ordenha, continuando a diminuir após a quarta ordenha, mas a um ritmo mais lento. Os mesmos autores observaram que uma menor densidade específica é geralmente encontrada em vacas da raça Holstein Frísia, enquanto maiores gravidades específicas foram encontradas no colostro de vacas das raças Ayrshire, Jersey e Guernsey.

2.1.2. Avaliação da composição do colostro

Muitos dos componentes do leite e produtos lácteos podem ser analisados por métodos padrão aprovados pela Federação Internacional de Laticínios (FIL). Estes métodos têm por objetivo determinar: sólidos totais, proteína, gordura, energia, cinzas, acidez,

lactose, minerais, adicionados corantes, resíduos de detergentes, resíduos orgânicos e microrganismos (Oliveira, 2011).

Neste capítulo procura-se retratar os métodos de determinação da concentração da componente nutricional do colostro e das propriedades físicas analisadas neste trabalho (Tabela 2).

Tabela 2: Métodos de avaliação da composição do colostro (Adaptado de Gomes & Oliveira, 2018)

Componentes	Métodos
Matéria seca	Secagem na estufa
Proteína	Método Kjeldahl, método de Dumas
Gordura	Método de Greber, método de Rose-Gottlieb
Imunoglobulinas	ELISA, RID, IR, Colostrómetro e Refratómetro
pH	Medidor de pH
Densidade	Colostrómetro

pH – Potencial de hidrogénio; ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática; RID – Imunodifusão radial; IR – Espectroscopia de infravermelho.

É de salientar que os métodos posteriormente descritos são maioritariamente utilizados na análise de leite, efetuando-se pequenas adaptações quando a amostra é de colostro. Para a determinação da matéria seca do colostro e outros líquidos, é feita a extração da água, com auxílio de uma estufa. É recomendado a utilização de areia analítica, uma vez que esta vai distribuir o líquido, com o propósito de evitar a formação de bolhas, a formação de espuma e crostas, tornando o processo de evaporação em estufa menos eficiente, aumentando a superfície de contato com o calor, tornando a evaporação mais uniforme (Corrêa et al., 2016).

A determinação direta da proteína engloba os métodos de Dumas e o método de Kjeldahl, onde se calcula o azoto total da amostra e depois multiplica-se pelo fator de conversão (6,25), no caso do leite é de 6,38. Estes seguem as normas internacionais como Association of Official Agricultural Chemists (AOAC), International Organization for Standardization (ISO), entre outras, engloba ainda, a utilização de corantes, a cromatografia e a eletroforese (VELP scientifica, s.d.).

O método de Dumas (Dumas, 1831) foi o primeiro método descrito para análise de azoto e proteína. Este baseia-se na combustão de amostras orgânicas num sistema hermeticamente fechado, gerando água, dióxido de carbono (CO_2) e azoto. O gases

produzidos passam por uma etapa subsequente de redução, transformando o azoto em azoto molecular, que é quantificado (Giovanaz, 2022).

A determinação da fração azotada (Kjeldahl, 1883), ainda é amplamente utilizada por ser uma técnica confiável, com procedimentos bem estabelecidos e que, ao longo do tempo, permaneceu quase inalterada (Galvani, 2006). O método envolve uma bordagem em três etapas, nomeadamente, a digestão, destilação e titulação. Este método consiste na digestão da matéria orgânica utilizando ácido sulfúrico concentrado, na presença de um catalisador para acelerar a reação e o processo de oxidação da mesma, de modo a converter o azoto em amónio. Na segunda etapa, ocorre a destilação que vai resultar numa solução ácida, surgindo a conversão do amónio em amónia, seguida de titulação com o fim de quantificar a amónia presente na solução (Nogueira & Souza, 2005). As principais limitações desta técnica passam pela demora no processamento das amostras devido às etapas, o que pode levar a erros por parte do técnico, o uso de reagentes corrosivos em concentrações elevadas que apresentam toxicidade e os custos associados à compra dos mesmos, produção de resíduos que necessitam de neutralização antes de serem descartados, possibilidade de perdas de amostras no processo de destilação, que resulta em subestimação dos teores de azoto (Araújo, 2019).

É importante destacar que, ao comparar as técnicas de determinação de azoto de Dumas e de Kjeldahl, os valores obtidos na técnica de Dumas tendem a ser levemente superiores. Isto ocorre porque o azoto oriundo de fontes inorgânicas (nitratos e nitritos) também passam pelo processo de redução na técnica de Dumas, sendo detetado no final do processo juntamente com o azoto proveniente da fonte orgânica. Tal fenómeno não ocorre na técnica de Kjeldahl (Giovanaz, 2022).

Apesar do método de Dumas ser mais antigo que o método de Kjeldahl, este acarreta vantagens como velocidade, segurança, limpeza e custo por análise. Para leite e derivados, segundo Lynch & Barbano (1999), o método de referência para determinação de proteína é o método Kjeldahl, isto pode ser explicado por problemas do passado na dificuldade de reproduzir as condições necessárias para a realização do método de Dumas, contudo com a progressão da tecnologia, realizar este método é cada vez mais generalizado (VELP scientifica, s.d.).

Para determinação indireta, métodos espectroscópicos, são os que se destacam pela exatidão em relação a outros métodos e um menor consumo de quantidade de amostras, como por exemplo o método de Lowry, o método do reagente de Bradford e o NIR (Espectroscopia no infravermelho próximo) (Alves, 2018).

Relativamente à gordura as duas técnicas de medição mais utilizadas são o método Gerber, 1891 e o método de Rose – Gottlieb (Faria, 2022).

O método do butirómetro de Gerber baseia-se na quebra da emulsão do leite pela adição de ácido sulfúrico com posterior adição de álcool isoamílico, para clarificar a gordura. O teor de gordura é separado através do processo de centrifugação, por esta ser menos densa, fica na parte superior do butirómetro com uma escala volumétrica de 0 a 12%, que auxilia na leitura do resultado (Faria, 2022).

Já o método de Rose–Gottlieb consiste na extração do teor de gordura por uma mistura de éteres, a partir de uma amostra com peso conhecido. Depois, a gordura extraída é seca e pesada até obter um peso constante, e o conteúdo de gordura é determinado pela relação entre a massa inicial da amostra e a massa de gordura obtida (González et al. 2001, citados por Águas et al., 2014). Este método é considerado método de referência pela AOAC e pela FIL, mas como o método de Gerber é mais rápido e mais barato, tem sido utilizado mundialmente, no entanto, com uma base científica limitada quanto à precisão e exatidão (Associação Brasileira de Programas de Melhoria da Qualidade do Leite, 2010; Andrade et al., 2022). Por outro lado, estudos realizados por Crocker et al., (1955) e mais tarde por Manuel et al., (2000), demonstraram uma forte correlação entre estes dois métodos, $r = 0,999$ e $r = 0,997$, respectivamente.

Vários métodos foram desenvolvidos para medir a concentração de IgG no colostrum direta ou indiretamente. Existem os métodos laboratoriais (diretos), como a imunodifusão radial (RID) (McBeath et al., 1971), a imunoabsorção enzimática (ELISA) (Gelsinger et al., 2015), a espectroscopia de infravermelho (IR) (Mancini et al., 1965), e os métodos indiretos (on-farm), com o uso do colostrômetro (Bartier et al., 2015) e do refratômetro (Bielmann et al., 2010).

A RID é considerada o método referência mais preciso para medir diretamente a concentração de IgG no colostrum (Mancini et al., 1965; McBeath et al., 1971; Oyeniyi & Hunter, 1978; Chigerwe et al., 2008; Bartier et al., 2015). Esta técnica consiste em depositar um antígeno num gel com um anticorpo específico e verificar a difusão radial do antígeno e a precipitação após reação com o anticorpo. O diâmetro da precipitação radial observada é proporcional à dose de antígeno. Este método tem desvantagens significativas, que são compartilhadas pela maioria dos métodos laboratoriais, incluindo o tempo necessário para obter o resultado (18–24 h), falta de automação, a utilização de reagentes com vida útil curta e o alto custo (Bielmann et al., 2010).

O ELISA também tem sido usado para a mesma finalidade que o ensaio RID (Gelsinger, 2015). Este método baseia-se na interação entre o antígeno e o anticorpo, com uma enzima acoplada a um desses componentes. Após a adição de um substrato, ocorre uma reação enzimática visível, que indica a presença e a quantidade da substância analisada.

A espectroscopia de infravermelho surgiu como uma técnica alternativa para avaliar a qualidade do colostro (Rivero et al., 2012; Elsohaby et al., 2016). É um método rápido, de baixo custo, requer uma preparação mínima da amostra, pode ser utilizado na exploração e em laboratório (Shaw et al., 1998; Shaw et al., 2000; Santos et al., 2013). Os métodos indiretos mais comuns para avaliar a qualidade do colostro numa exploração são o refratômetro e o colostrômetro, conhecidos também, como métodos *on-farm* (Bielmann et al., 2010; Bartier et al., 2015).

O refratômetro Brix é utilizado para medir a concentração de sacarose num líquido. Quando utilizado em líquidos que não contêm sacarose, o precentual de Brix aproxima-se ao precentual de sólidos totais (Deelen et al., 2014). Estudos anteriores relataram uma forte correlação entre os valores de Brix e a concentração de IgG, conforme determinado pelo RID (Chigerwe et al., 2008; Bielmann et al., 2010; Bartier et al., 2015). Existem dois tipo de refratômetros Brix, o digital e o ótico, (Figuras 1 e 2, respetivamente). Ambos funcionam com base no princípio da refração da luz, contudo, o refratômetro Brix digital apresenta a leitura em unidades de Brix numa tela digital. Já o refratômetro Brix ótico exige que o utilizador observe o instrumento e determine o percentual de Brix do líquido, identificando uma linha azul na escala. Os valores do refratômetro ótico podem ser interpretados de forma diferente por pessoas distintas e o modelo digital tende a oferecer resultados mais consistentes, desde que seja corretamente utilizado e limpo (Bielmann et al., 2010).

O refratômetro não é sensível à temperatura ambiente e é menos frágil (Bielmann et al., 2010; Bartier et al., 2015). Assim, o refratômetro foi promovido pela indústria de laticínios como um método eficaz na exploração para estimar a concentração de Igs e a qualidade do colostro (Thornhill et al., 2015). Colostros com leituras de Brix $\geq 22\%$ são classificados como de alta qualidade, correspondendo a uma concentração estimada de IgG $\geq 50 \text{ mg/mL}$, conforme por estudos comparativos com o método RID (Chigerwe et al., 2008; Bartier et al., 2015). Leitura entre 18% e 21% Brix indica colostros de qualidade intermediária, geralmente com 30 a 50 mg/mL de IgG, enquanto valores de Brix $< 18\%$ refletem colostros de baixa qualidade, com provável concentração de IgG $< 30 \text{ mg/mL}$ (McGuirk & Collins, 2004).



Figura 1: Refratómetro digital (Fonte: Agriterra, 2020)



Figura 2: Refratómetro ótico (Fonte: fruugo, s.d.)

O colostrómetro determina a densidade do colostro, que por sua vez, permite estimar a concentração de IgG (Pritchett et al., 1991). Num estudo realizado por Fleenor & Stott (1980), observou-se uma boa correlação entre as concentrações de IgG determinadas pelo RID e a densidade medida pelo colostrómetro ($r = 0,699$).

Antes de se efetuar a avaliação pelo colostrómetro, o colostro é deixado em banho-maria até atingir a temperatura de 37°C. Isto com o objetivo de padronizar o método, uma vez que, os resultados são afetados pela temperatura do colostro (um colostro que apresente temperaturas diferentes, vai resultar em valores de densidade diferentes), pelo conteúdo total dos sólidos, e não apenas das IgGs (Mechor et al., 1992; Morin et al., 2001; Vaz et al., 2004).

O colostrómetro, (Figura 3) geralmente, mede valores entre 1,025 e 1,075, considerando-se um colostro de fraca qualidade abaixo de 1,035, de qualidade intermédia entre 1,035 e 1,045 e de boa qualidade a partir de 1,045. Uma densidade de 1,045 corresponderá aproximadamente a 50 mg/mL de imunoglobulinas e uma densidade de 1,035 corresponde a aproximadamente 20 mg/mL de imunoglobulinas (Silva et al., 2021).

Algumas desvantagens deste método passam pela fragilidade do equipamento e pela necessidade de ser cuidadosamente limpo antes de ser utilizado (Bielmann et al., 2010; Bartier et al., 2015).

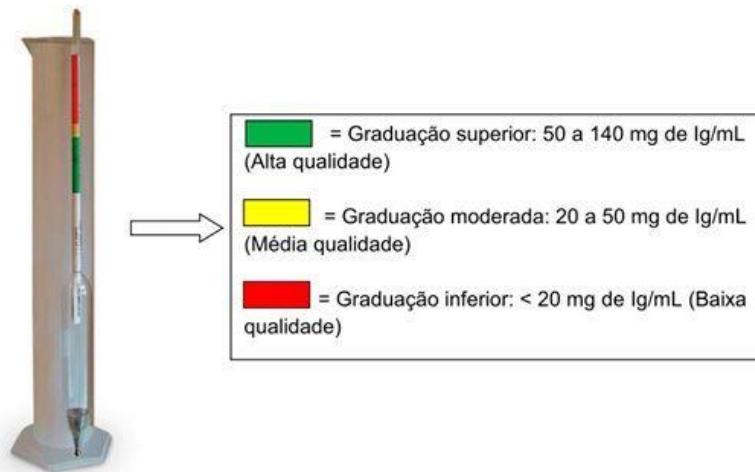


Figura 3: Interpretação dos resultados do colostrómetro (Fonte: Bittar e Paula, 2020)

A ingestão insuficiente de IgG aumenta as taxas de morbilidade e mortalidade nas primeiras semanas e causa perdas económicas (McGuirk & Collins, 2004). Vasseur et al., (2010); Klein-Jöbstl et al., (2014); Staněk et al., (2014), relataram nos seus estudos que pequena percentagem das explorações medem a qualidade do colostro de forma rotineira, e aqueles que o fazem utilizam métodos pouco precisos, como aspeto visual ou a quantidade de colostro ordenhado (Chigerwe et al., 2008). Uma pesquisa realizada na Áustria por Klein-Jöbstl et al., (2015), revelou que 20,8% das explorações relatam testar a qualidade do colostro, das quais 13,5% utilizam o colostrómetro, enquanto 86,1% estimam a qualidade pelo aspetto visual.

O valor de pH é medido através de um medidor de pH que é constituído por um elétrodo e um potenciómetro (Figura 4).



Figura 4: Medidor de pH (Fonte: Prolab, 2018)

O aparelho é calibrado utilizando tampões de pH em função ao que se pretende analisar. A leitura do aparelho é obtida com base na tensão (em milivolts) produzida pelo elétrodo quando imerso na amostra. A intensidade da tensão medida é convertida para uma escala de pH. O aparelho realiza a conversão, utilizando uma escala de 0 a 14 pH (Karastogianni et al., 2016). Vários autores comentaram que o pH tende a ser menor no colostro e após 5 a 10 dias tende a aumentar (Klimes et al., 1986; Madsen et al., 2004; Tsoulpas et al., 2007). A razão pela qual o pH do colostro é menor ainda é desconhecida, contudo Sebela & Klicnik (1977) relataram que o baixo pH é causado pelo aumento da concentração de proteínas.

3. Materiais e Métodos

3.1. Recolha e conservação das amostras

No presente estudo foram recolhidas amostras de um grupo experimental constituído por 82 animais da raça Holstein Frísia, provenientes de quatro explorações leiteiras, no período entre março de 2021 e junho de 2023. Estes foram selecionados de forma aleatória entre vacas. As amostras foram recolhidas nas explorações em copos de recolha de 60 ou 100 mL, transportadas numa geleira térmica para o Laboratório de Tecnologia e Qualidade dos Produtos Regionais da Universidade de Évora e posteriormente armazenadas no congelador (-20°C) de acordo com as normas de recolha de amostras (FIL_IDF 50B: 1985. Milk and milk products. Methods of sampling) até serem analisadas.

3.2. Processamento laboratorial das amostras

Para proceder à análise das amostras, as mesmas foram descongeladas de forma gradual, a 2-4°C, durante um período de 16 horas. Os parâmetros avaliados foram: MS, proteína, gordura, grau Brix, pH e densidade. A MS foi determinada pelo método de secagem em estufa, para a proteína utilizou-se o método de Dumas, para determinação da gordura utilizou-se o método de Greber, para determinação do grau Brix foi utilizado o refratômetro, o pH foi determinado pelo medidor de pH e a densidade foi determinada pela fórmula $d = m/v$.

A determinação da MS efetuou-se segundo a norma portuguesa (NP) - 475 (1983). O método consiste na secagem em estufa a $101 \pm 1^\circ\text{C}$ (Figura 5) de uma determinada quantidade de leite até obtenção do mínimo de massa, isto é, até que duas pesagens sucessivas não difiram mais de 0,5 mg ou antes que se verifique aumento de massa devido à oxidação.



*Figura 5: Cadiinhos na estufa
(Fonte: Própria)*

Ao tirar os cadiinhos da estufa colam-se no exsicador para arrefecerem (Figura 6), é de realçar que no momento das pesagens estes precisam de estar à temperatura ambiente, uma vez que uma temperatura elevada dos cadiinhos pode levar a erros de pesagem.



*Figura 6: Cadiinhos a arrefecer no exsicador
(Fonte: Própria)*

São feitas pesagens ao longo do processo e o teor de matéria seca do colostro é obtido quando o peso da amostra permanece constante entre duas amostras sucessivas.

A determinação do teor de proteína total foi realizada de acordo com a norma “ISO 14891/FIL-IDF 185” (2002) utilizando o método de Dumas. Numa cápsula de estanho foi colocada amostra até ao topo (Figura 7), de seguida a cápsula é introduzida no

FP528, LECO Corporation, St. Joseph, Michigan, USA, onde ocorre a combustão a 975°C (Figura 8) numa ambiente rico em oxigénio puro. Sob essas condições, a amostra é completamente digerida, convertendo todos os compostos orgânicos em gases simples como dióxido de carbono (CO_2), água (H_2O) e óxidos de azoto (NO_x). Os gases resultantes da combustão passam por um tubo contendo um catalisador de cobre a alta temperatura. Nesse processo, os óxidos de azoto são reduzidos a azoto molecular (N_2). O mesmo é então detetado por um detetor de condutividade térmica (DCT) ou por um detetor de ionização de chama (DIC). A quantidade de azoto detetado é diretamente proporcional ao conteúdo de proteína da amostra, uma vez que a maioria das proteínas contém aproximadamente 16% de azoto, pelo que o azoto total da amostra é igual ao valor de N_2 vezes 6,38.

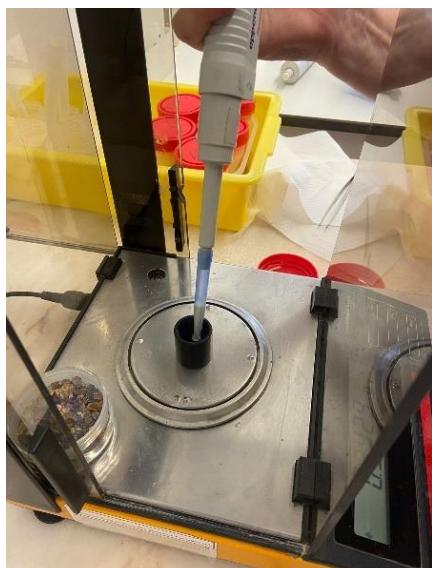


Figura 8: Pipetagem da amostra de proteína (Fonte: Própria)



Figura 7: Figura 8: Leco, instrumento de leitura de proteína bruta (Fonte: Própria)

O teor de gordura das amostras foi determinado pela “NP-469” (1983) utilizando o método de Gerber. Ao realizar-se este método com amostras de colostro, foi necessário uma adaptação, uma vez que o colostro possui uma maior viscosidade quando comparada com o leite. Adicionou-se 6 mL de amostra ao H_2SO_4 , colocando de imediato a solução em banho-maria a 60°C, com agitação frequente. Quando a amostra estava dissolvida foram adicionados os restantes 5 mL de amostra (Figura 9).



*Figura 9: Adição da restante amostra no butirómetro
(Fonte: Própria)*

Quando colocada a amostra total em banho-maria, verificou-se que a mesma não era totalmente coberta pela água e começava a solidificar a gordura, pelo que se colocou um recipiente sobre os butirómetros, com o objetivo de concentrar a temperatura e reverter o processo de solidificação (Figura 10). Caso a gordura solidificasse, não seria possível realizar a leitura correta no butirómetro.



Figura 10: Colocação de um recipiente sobre as amostras de forma a não solidificar as mesmas (Fonte: Própria)

Quando a amostra estava totalmente digerida, adicionou-se 1mL de ácido isoamílico colocando-se os butirómetros na centrifugadora a 55°C, durante 6 minutos (Figura 11). O teor de gordura é lido na escala do butirómetro (Figura 12).



Figura 11: Butirómetros dentro da centrifugadora (Fonte: Própria)

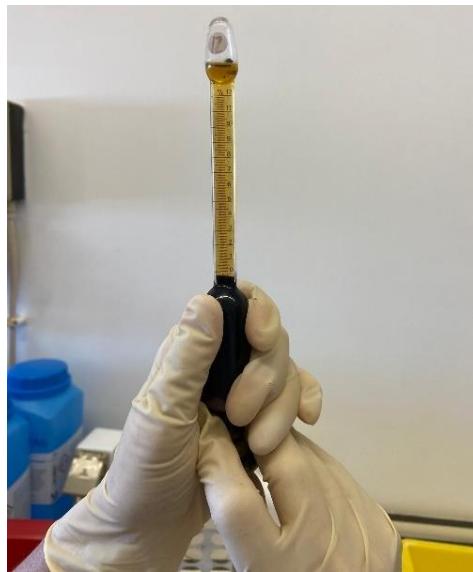


Figura 12: Leitura da percentagem de gordura (Fonte: Própria)

A avaliação do grau Brix do colostrum foi medida num refratômetro Brix digital (ORF-E, Kern, Albstadt, Germany). Foram colocadas sobre a lente do aparelho, uma a duas gotas de amostra, de forma a cobrir toda a área, com o uso de uma pipeta, lendo-se o grau de Brix.

A concentração de imunoglobulina G (IgG) foi determinada com recurso a um kit comercial ELISA (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, EUA), no âmbito de um projeto de doutoramento desenvolvido na Universidade de Las Palmas de Gran Canaria. O método apresentou um coeficiente de variação intra-ensaio de 3,7% e inter-ensaio de 4,7%, refletindo, respetivamente, a precisão e a reprodutibilidade do teste.

O coeficiente de variação intra-ensaio avalia a consistência dos resultados obtidos ao testar repetidamente a mesma amostra na mesma placa de ELISA, enquanto o coeficiente inter-ensaio mede a variação entre diferentes ensaios realizados em condições distintas.

Valores baixos para estes coeficientes indicam que o método é fiável, com boa precisão e consistência ao longo do tempo. De forma geral, coeficientes inferiores a 10% são considerados aceitáveis em métodos imunológicos como o ELISA.

Antes da medição do pH as amostras eram agitadas com o objetivo de homogenizar as mesmas. A medição foi realizada no copo que continha a amostra pelo um medidor de pH (Hanna Instruments - HI 931400, Limena, Itália), durante as medições era controlada a temperatura, de forma a descartar possíveis erros de leitura. O controlo da temperatura durante a avaliação do pH é essencial, uma vez que oscilações térmicas podem interferir significativamente na precisão dos valores obtidos. O colostrum, por sua

vez, pode apresentar variações no pH em função do modo e tempo de armazenamento. Tradicionalmente, o colostro é congelado com o intuito de preservar a concentração de IgG e inibir o crescimento bacteriano. Adicionalmente, o processo de descongelação pode ser moroso e, se não for realizado adequadamente, pode provocar a desnaturação das IgG, diminuindo assim a qualidade do colostro e a sua eficácia na transferência de imunidade passiva. Por outro lado, a conservação do colostro em refrigeração não afeta as concentrações de IgG, mas favorece o crescimento bacteriano e a consequente redução do pH (Cummins et al., 2017). Estudos indicam que um pH mais ácido (como 4,65) pode comprometer a absorção das imunoglobulinas pelos vitelos, sendo que uma elevada carga bacteriana intestinal também pode interferir negativamente nesse processo. Neste contexto, o rigor na medição do pH, aliado ao controlo da temperatura, é fundamental para a correta avaliação da qualidade do colostro e da sua adequação ao fornecimento neonatal (Foley et al., 1978; James et al., 1981).

A densidade do leite resulta da soma das suas principais fases: gordura, extrato seco desengordurado (ESD) e água. Essa propriedade é determinada por métodos analíticos e pode variar de acordo com fatores como a composição natural do leite ou possíveis adulterações. No caso das amostras analisadas, que consistiam em colostro, a densidade pode ser especialmente influenciada pela alta concentração de proteínas e outros sólidos presentes nesse estágio inicial da lactação.

No leite a densidade relativa é avaliada por um colostrómetro de acordo com a norma “NP-474” (1967) mas dado ao reduzido volume das amostras, a densidade do colostro foi determinada com base na fórmula $d = m/v$. Para o efeito foi utilizado um volume de 5 mL para todas as amostras (Figura 13).

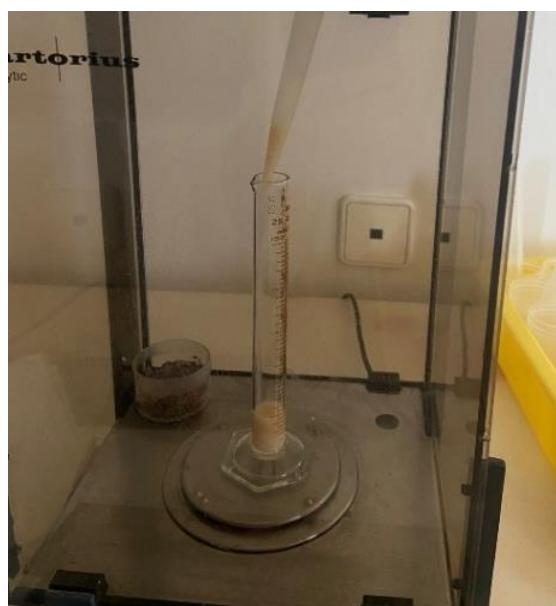


Figura 13: Pipetagem da amostra de densidade
(Fonte: Própria)

O ESD foi calculado a partir da diferença entre a MS e do teor de gordura (ESD = MS – gordura).

3.3. Análise estatística

Recorreu-se ao software Microsoft Excel® para o registo dos dados obtidos em laboratório. Os procedimentos estatísticos foram realizados com recurso ao software R Studio versão 1.4.555 (Allaire, 2024), num ambiente de desenvolvimento integrado para o R (R Core Team, 2024). De modo a caracterizar a nossa amostra efetuou-se uma análise descritiva, com cálculo de médias, desvio-padrão, mínimos e máximo para todas as variáveis.

Efetuou-se uma análise de correlações de Spearman e uma regressão linear simples como uma primeira abordagem às possíveis relações existentes entre o Brix e as restantes variáveis (IgG, MS, proteína, gordura, densidade e pH). Com o objetivo de perceber quais destas variáveis melhor explicam os valores obtidos com o refratómetro Brix, foi realizada uma regressão linear múltipla apenas com as variáveis que na análise de regressão simples estavam significativamente associadas com o Brix ($P < 0,05$). Foram testados os pressupostos da regressão linear, nomeadamente a normalidade através da análise gráfica dos resíduos (histograma e gráfico Q-Q), a existência de observações influentes e possíveis *outliers* através da Distância de Cook, a homogeneidade de variâncias através do teste de Breush-Pagan, e a multicolinearidade através do Variance Inflation Factor (VIF) e considerou-se o valor 5 como limite. O pressuposto da independência foi garantido no momento da recolha das amostras. Devido à existência da várias observações influentes e de heterocedasticidade procedeu-se a duas abordagens alternativas. A primeira consistiu na transformação da variável Brix (foi testada a transformação logarítmica da base 10 e a raiz quadrada) analisada através da regressão múltipla, a segunda consistiu na utilização da variável Brix não transformada numa análise de regressão robusta (Yu & Yao, 2017). Os modelos foram posteriormente comparados ao pacote “Performance” (Lüdecke et al. 2021), onde vários parâmetros relacionados com a performance do modelo são comparados, tais como o R^2 , RMSE, AIC e BIC. Foi selecionado o modelo com melhor performance.

A segunda análise estatística teve como objetivo identificar um limite (*cut-off*) de Brix para o que é atualmente definido através da concentração de IgG como colostro de boa qualidade ($IgG \geq 50 \text{ g/L}$) (Goodden et al. 2019), avaliando assim a capacidade do equipamento em identificar colostros de boa qualidade, ou qualidade adequada. Para tal foi utilizada uma análise ROC (*Receiver Operating Characteristic*) e criada uma

matriz de confusão de modo a obter as medidas de exatidão, precisão. Foi ainda criada uma curva ROC e calculada a AUC (*Area Under the Curve*). O valor limite foi identificado através do Índice de Youden, avaliando a sensibilidade e especificidade do equipamento.

Uma vez que o valor de limite de Brix utilizado nas explorações leiteiras tem por base apenas a concentração de IgG pretendeu-se testar qual o efeito de utilizar um valor limite de Brix na qualidade nutricional do colostro. Assim, através do valor de Brix identificado na análise ROC foi criado um fator (qualidade do colostro) com duas categorias (qualidade inadequada e adequada). Através da ANOVA testou-se a diferença na qualidade nutricional para cada parâmetro (proteína, MS e gordura) entre os colostros identificados com qualidade inadequada e adequada. A normalidade e a homogeneidade de variâncias forma testadas para cada modelo através do teste de Shapiro Wilk e de Levene, respectivamente. Foram realizadas transformações logarítmicas quando necessário para validar os pressupostos.

4. Resultados e Discussão

4.1. Concentração dos constituintes do colostro e do grau Brix

A estatística descritiva das 82 amostras de colostro relativamente aos parâmetros de Brix, MS, proteína, gordura, IgG, ESD, pH e densidade, são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Análise descritiva da composição físico-química do colostro

Parâmetros	Média	Dp	Mínimo	Mediana	Máximo
Brix (%)	25,2	4,2	14,5	25	34,4
MS (%)	25,3	4,8	16,9	25,1	35,7
Proteína (%)	15,2	3,6	6,6	15,1	24,0
Gordura (%)	4,6	3,0	0,8	3,8	12
IgG (g/L)	52,5	24,5	11,2	47,6	129,6
ESD	20,7	3,6	12,6	20,6	28,8
pH	6,2	0,2	5,5	6,2	7,1
Densidade	1,04	0,05	1,00	1,04	1,16

Dp- Desvio-Padrão; MS – Matéria seca; ESD – Extrato seco desengordurado

No presente estudo verificou-se que o Brix obteve média de $25,2 \pm 4,2\%$, registando um valor mínimo de 14,5% e um valor máximo de 34,4%, com uma mediana de 25%. Quigley et al., (2013), Bartier et al., (2015) e Kessler et al., (2021), reportaram valores médios inferiores aos obtidos neste estudo, enquanto Bielman et al., (2010), obteve um valor médio superior de Brix, e Hue et al., (2021) apresentou resultados similares. As diferenças nos valores médios de Brix entre estudos podem ser explicadas por vários fatores biológicos, ambientais e metodológicos, bem como as práticas de manejo, nutrição (Bielmann et al., 2010). Vacas multíparas tendem a produzir colostro com maior concentração de imunoglobulinas, resultando em valores de Brix mais elevados, enquanto primíparas geralmente produzem colostro menos concentrado (Bielmann et al., 2010; Quigley et al., 2013 e; Bartier et al., 2015). O tempo decorrido entre o parto e a colheita também é determinante, quanto mais se atrasa na recolha, maior a diluição do colostro (Quigley et al., 2013). A nutrição da vaca durante o período seco desempenha um papel essencial, dietas equilibradas favorecem a concentração de sólidos totais, ao passo que deficiências nutricionais reduzem a qualidade do colostro (Quigley et al., 2013 e; Bartier et al., 2015). A raça do animal influencia a composição do colostro, com raças como Jersey apresentando teores de sólidos mais elevados que a Holstein. Fatores ambientais, como a estação do ano, também interferem, o stress

térmico em épocas quentes pode comprometer a qualidade, enquanto o clima frio tende a ter um efeito positivo (Bielmann et al., 2010).

No que concerne à composição nutricional, avaliada pela composição dos componentes principais, a MS obteve uma média de $25,3 \pm 4,8\%$, registando um valor mínimo de 16,9% e um valor máximo de 35,7%, com uma mediana de 25,1%, a proteína apresentou uma média de $15,2 \pm 3,6\%$, registando um valor mínimo de 6,6% e um valor máximo de 24%, com uma mediana de 15,1%, sendo valores de proteína relativamente superiores aos 14% observados por Playford & Weiser (2021) e Samarütel et al., (2016), mas inferiores aos 16,6% retratados por Nardone et al., (1997). Estes valores foram semelhantes aos observados por Lokke et al., (2016); Hue et al., (2021) e Kessler et al., (2021). A gordura apresentou um valor médio de $4,6 \pm 3\%$, registando um valor mínimo de 0,8% e um valor máximo de 12%, com uma mediana de 3,8%, valores inferiores aos reportados por Kehoe et al., (2007) e Nardone et al., (1997). Relativamente à IgG, esta obteve um valor médio de $52,5 \pm 24,5$ g/L, registando um valor mínimo de 11,2 g/L e um valor máximo de 129,6 g/L, com uma mediana de 47,6 g/L. Kessler et al., (2021) relataram um valor de IgG significativamente superior do que o observado neste estudo, enquanto Lokke et al., (2016) apresentou resultados semelhantes.

A variação observada nos valores obtidos no constituinte IgG, pode ser explicada por fatores como o intervalo de tempo entre o parto e a colheita da amostra, uma vez que os teores de IgG no colostro são mais elevados imediatamente após o parto e diminuindo linearmente, juntamente com a capacidade de absorção destas moléculas pelo vitelo (Schuenemann, 2013). Embora não tenha sido possível recolher informação das explorações, há um consenso geral sobre os diferentes teores de IgG observados em vacas primíparas e multíparas, onde grande parte das amostras de colostro de vacas primíparas apresentam teores de IgG inferiores aqueles observados em vacas multiparas, devendo-se a uma maior experiência do sistema imunológico das vacas multíparas (Bielmann et al., 2010). Outro fator explicativo para a variabilidade de IgG passa pelo mês em que ocorreu o parto, onde se verificou que tende a atingir o pico de concentração no final do verão/início do outono (Costa et al., 2021).

De acordo com poucos estudos disponíveis na literatura, não há efeito na condição de armazenamento da amostra na concentração de IgG. Cummins et al., (2017) relataram uma concentração semelhante de IgG no colostro armazenado sob diferentes condições.

O ESD obteve valores médios de $20,7 \pm 3,6\%$, registando um valor mínimo de 12,6 e um valor máximo de 28,8, com uma mediana de 20,6. Muller & Ellinger (1981) e Pritchett et al., (1991) indicaram que o colostro bovino de boa qualidade geralmente apresenta um ESD entre 18% e 24%, podendo ultrapassar 28% em casos de colostros muito ricos.

De maneira semelhante, Maunsell et al., (1998) e Godden (2008) observam que colostros com altos teores de IgG frequentemente apresentam um ESD superior a 19%, sendo que valores abaixo de 15% indicam uma qualidade nutricional e imunológica comprometida. Estes dados sugerem que os valores do ESD observados no presente estudo estão de acordo com a literatura existente, refletindo a qualidade nutricional e imunológica do colostrum analisado.

Além dos constituintes, formam obtidos resultado quanto ao pH e à densidade do colostrum. O pH que apresentou um valor médio de $6,2 \pm 0,2$, registando uma valor mínimo de 5,5 e uma valor máximo de 7,1, com uma mediana de 6,2, o que corrobora os valores apresentados por McIntyre et al., (1952); Borad & Singh (2018). Já a densidade obteve um valor médio de $1,04 \pm 0,05$ g/mL, registando um valor mínimo de 1,0 e um valor máximo de 1,16 g/mL, com uma mediana de 1,04 g/mL, o que valida o testemunho de Maunsell et al., (1998).

4.2. Relação entre o grau Brix e os constituintes do colostrum

4.2.1. Análise de correlação

Através da análise de correlações de Spearman foi possível identificar as correlações existentes entre os parâmetros avaliados neste estudo, oferecendo uma visão sobre possíveis interações entre as variáveis de interesse. Na matriz de correlações (Tabela 4), observa-se que as variáveis pH, densidade e gordura não obtiveram qualquer relação com os valores de Brix, por outro lado a MS, ESD, proteína e IgG apresentam uma correlação positiva significativa, com o Brix ($P < 0,001$). As proteínas, especialmente a IgG, constituem a principal fração dos sólidos solúveis no colostrum. Assim, quando a concentração de IgG aumenta, também se verifica um aumento proporcional nos valores de grau Brix. A matéria seca total compreende todos os sólidos presentes (gordura, proteínas, lactose, minerais), enquanto o ESD exclui a gordura, refletindo com maior precisão a fração proteica. Por este motivo, os valores de MS, ESD e proteína tendem a acompanhar as variações dos valores de IgG, o que justifica a forte correlação positiva e significativa frequentemente observada entre estes parâmetros e a leitura do refratômetro Brix.

Tabela 4: Matriz de correlação entre os parâmetros avaliados no colostro bovino

	Brix	MS	ESD	Proteína	Gordura
MS	0,79***				
ESD	0,83***	0,75***			
Proteína	0,90***	0,73***	0,90***		
Gordura	0,19	0,60***	-0,08	-0,02	
IgG	0,75***	0,51***	0,67***	0,76***	-0,02

(*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001)

Destaca-se a forte correlação entre a proteína e o Brix ($\rho = 0,9$), o que sugere que a concentração de proteínas é melhor estimada pelo Brix como retratado por Lokke et al., (2016); Hue et al., (2021) e Kessler et al., (2021) do que as concentrações de IgG, que obteve uma correlação de $\rho = 0,7$, com o Brix. Isto pode ser explicado pelo fato da percentagem de IgG dentro da proteína ser variável e o Brix medir a refração da proteína. Contudo, esta constitui apenas uma parte da avaliação do colostro, outros componentes também precisam ser tomados em consideração ao avaliar a qualidade do colostro (Godden, 2008). Como se sabe o termo qualidade do colostro engloba para além dos requisitos nutricionais, de composição, os requisitos higio-sanitários, mais exatamente a carga bacteriana (McGuirk & Collins 2004). Portanto, embora o grau Brix seja uma boa ferramenta para avaliar os requisitos nutricionais e de composição do colostro, avaliar a totalidade da qualidade do colostro, deve ser ponderado os valores de contaminação bacteriana. Através da refratometria, é possível analisar o colostro com base na quantidade total de sólidos na amostra. Como a maior parte desses sólidos é composta por proteínas, esse método fornece uma estimativa aproximada das imunoglobulinas presentes. Esta ferramenta é então, reconhecida por testar a qualidade de uma amostra pelas elevadas quantidades de imunoglobulinas. Seria então, expectável que a relação encontrada neste estudo entre o Brix e a IgG fosse superior, como relatado na literatura (Chigerwe et al., 2008; Bielman et al., 2010; Bartier et al., 2015; Hue et al., 2021; Kessler et al., 2021). O resultado deste ajuste pode ser explicados pela IgG ser uma das proteínas, mas existem outras como a albumina sérica, a lactoferrina, a caseína, e proteínas bioativas e esta proporção pode variar com vários fatores. Lokke et al., (2016), explica qua a IgG representa um terço da proteína e que

nas leituras não é possível distinguir outras proteínas na complexa mistura de constituintes do colostro e que o modelo é baseado numa correlação indireta com a IgG, com a proteína sendo um fator subjacente.

A correlação entre a MS e o Brix ($\rho = 0,8$) é explicada pelo que já foi referido anteriormente sobre o refratômetro de Brix medir o conteúdo de sólidos totais de um líquido, ou seja, mede a MS, que será composta essencialmente por proteína, gordura, carbohidratos e minerais. Como a fração proteica é a mais representativa da MS (cerca de 60%) é expectável uma associação positiva entre o Brix e a MS.

Observa-se ainda, que existe uma correlação entre a MS e a IgG, e a MS e a gordura, ambos com ($\rho = 0,5$), e entre a MS e a proteína ($\rho = 0,7$).

A correlação verificada entre o Brix e o ESD indicam de fato que a proteína e os carbohidratos, ambos sólidos em solução, contribuem para os valores de Brix. Como os carbohidratos estão em concentrações reduzidas (McGrath et al., 2016), os valores de Brix são principalmente explicados pelas variações na proteína.

Por outro lado, verificou-se uma correlação negativa ($\rho = -0,4$) entre a gordura e densidade e igualmente uma correlação negativa entre a MS e o pH ($\rho = -0,3$). Estes resultados são explicáveis com base nas interações físico-químicas dos constituintes do colostro e são, em grande parte, consistentes com a literatura existente sobre a composição do colostro. A gordura e a densidade seguem uma relação inversa devido à diferença de densidade entre seus componentes, ou seja, à medida que a concentração de gordura aumenta, a densidade do colostro diminui (McGuirk & Collins, 2004). Da mesma forma, a redução do pH com o aumento da MS, a matéria seca inclui uma variedade de compostos, como proteínas, lipídios e minerais, muitos dos quais são ácidos ou propensos a reduzir o pH do colostro, especialmente quando há maior concentração de proteínas e lipídios (Quigley et al., 2013).

4.2.2. Análise de regressão

O refratômetro de grau Brix é usado para estimar a concentração de IgG do colostro (Godden et al., 2019), no entanto, este instrumento mede a concentração de sólidos dissolvidos num líquido. Por isso, pretendeu-se perceber quais os constituintes do colostro que melhor explicam os valores de Brix.

Observou-se na Tabela 5, que as variáveis gordura, pH e densidade não estiveram significativamente associadas com o Brix, por oposição a MS, a proteína, ESD e a IgG que foram estatisticamente significativas ($P < 0,001$).

Tabela 5: Regressão linear simples entre o Brix e os constituintes do colostro analisados

	Coeficiente (Erro padrão)	R ²
MS	0,75 (0,067)***	0,62
Proteína	1,00 (0,05)***	0,81
Gordura	0,20 (0,15)	0,02
IgG	0,12 (0,012)***	0,56
ESD	0,73 (0,085)***	0,69
pH	-2,25 (2,29)	0,01
Densidade	-3,14 (8,66)	-0,01

MS – Matéria seca; ESD – Extrato seco desengordurado

(*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001)

Com base na Tabela 5 é possível observar que o Brix e a proteína possuem uma relação linear positiva forte ($R^2=0,81$; $P < 0,001$), no entanto, apesar de se verificar uma relação linear significativa entre o Brix e a IgG, esta apresenta um coeficiente de determinação inferior ao da proteína ($R^2=0,56$; $P < 0,001$), indicando que o Brix pode ser um preditor útil para prever a concentração proteica, mas não exclusivamente para a IgG. A relação linear entre o Brix e a MS é moderada, mas significativa ($R^2=0,62$; $P < 0,001$), indicando que aproximadamente 62% da variação na concentração de matéria seca no colostro pode ser explicada pelo grau Brix. Este coeficiente de determinação sugere uma associação moderada, mas não perfeita, entre o grau Brix e a MS, indicando que outros fatores, além do grau Brix, podem influenciar o conteúdo de matéria seca no colostro. A relação linear entre o Brix e a ESD é moderada, mas significativa ($R^2=0,69$; $P < 0,001$), o que implica que 69% da variação no ESD pode ser explicada pelas medições do Brix. Este coeficiente de determinação reflete uma associação moderada e ligeiramente mais forte do que a observada para a MS. Apesar da correlação moderada, o valor de R^2 sugere que o Brix pode ser uma ferramenta eficaz para estimar o conteúdo de sólidos não lipídicos no colostro, com um bom grau de confiabilidade. Entre o Brix e a gordura, e o Brix e o pH não se verificou qualquer existência de relação linear ($R^2=0,02$ e $R^2=0,01$, respectivamente; $P > 0,1$), ou seja, apenas 2% e 1% da variação do teor de gordura e do pH, respectivamente, pode ser explicado pelo Brix. A correlação entre o Brix e a densidade foi negativa e não significativa ($R^2= -0,01$; $P > 0,1$).

Em suma, as variáveis MS, proteína, IgG e ESD apresentam coeficientes significativos e valores de R^2 razoáveis ou elevados, indicando uma relação positiva substancial com o Brix. Por outro lado, as variáveis Gordura, pH e Densidade têm um impacto reduzido, com valores de R^2 muito baixos e coeficientes pequenos ou imprecisos, sugerindo uma

influência mínima ou inexistente com o Brix. Esses resultados indicam que algumas variáveis são mais relevantes para explicar a variação do grau Brix, enquanto outras contribuem de forma marginal ou nenhuma contribuição.

4.2.3. Modelos de regressão linear múltipla

Com base na análise anterior, selecionaram-se as variáveis candidatas para o modelo de regressão múltipla. Foi analisado um modelo com as três variáveis que apresentaram um relação linear com o Brix (variável dependente), no entanto, a variável “IgG” não foi significativa ($P < 0,1$) em nenhum modelo testado, pelo qual, a IgG não foi incluída no modelo final. Dos modelos propostos tentou-se perceber qual seria o mais adequado para o estudo. Os resultados de performance dos diferentes modelos estão reportados na Tabela 6. O modelo 1 (variável dependente não-transformada) tem um ajuste de 82%, um RMSE e um Sigma baixos, mas com uma performance de 50%, quando comparado com os modelos 2 e 4 este verifica uma menor eficácia. O modelo 2 (variável dependente com transformação Log_{10}) também obteve um ajuste forte de 89%, contudo os resultados do RMSE e do Sigma não são tão favoráveis quando comparados com o modelo 4. O modelo 3 (variável dependente com transformação da raiz quadrada) o pior ajuste global, (mesmo explicando 89% da variância, igual ao modelo 2) além de apresentar altos valores de RMSE e Sigma, foi o que apresentou a menor performance de 26,42%. O modelo 4 (regressão linear robusta) foi o modelo que apresentou melhor ajuste e melhor performance, 95% e 97,12%, respectivamente e obteve valores de RMSE e Sigma baixos, indicando um ajuste preciso. Por isso, conclui-se que o modelo 4 foi o que apresentou melhor capacidade explicativa e preditiva.

Tabela 6: Comparação de modelos

Modelo	R2	R2 (ajus.)	RMSE	Sigma	AIC	BIC	Performance
1	0,82	0,82	0,031	0,032	1,00	1,00	50%
2	0,89	0,88	0,128	0,131	0	0	70,68%
3	0,89	0,89	1,317	1,344	0	0	26,42%
4	0,95	0,95	0,130	0,082	-	-	97,12%

RMSE - Root Mean Square Error, AIC - Akaike Information Criterion, BIC - Bayesian Information Criterion. Modelo 1 – modelo com a variável dependente não-transformada, modelo 2 – modelo com transformação logarítmica de base 10 da variável dependente, modelo 3 – modelo com transformação da raíz quadrada da variável dependente, modelo 4 – modelo de regressão linear robusta (RLR)

Nos modelos permaneceram alguns *outliers* e observações influentes, que se optaram por não tirar pois não há evidências que indiquem que são erros de amostragem ou analíticos, pois estão dentro do expectável. A sua remoção em prol de coeficientes de determinação mais elevados, omitiria resultados que fazem parte da variação natural do colostro e da exatidão do método. Talvez explique o porquê de se terem obtido associações menos fortes em comparação com outros estudos (Figueiredo & Silva, 2016; Davis, s.d.), uma vez que o critério de exclusão de *outliers*, ocorre, por vezes, na literatura, de forma ainda pouco sistemática. Assim, estes valores foram incluídos no modelo, mas com um peso menor, através da análise de regressão linear robusta.

Os resultados observados na Tabela 7 mostram que as variáveis MS e proteína apresentam coeficientes positivos e, foram estatisticamente significativas ($P < 0,001$), revelando que tanto a proteína como a MS são as variáveis que melhor explicam as variações do grau Brix. O coeficiente de determinação do modelo foi bastante elevado ($R^2 = 0,95$). A variável IgG não se demonstrou estatisticamente positiva porque a proteína sobrepõe-se à mesma, uma vez que está incorporada na proteína e, portanto o Brix nestes resultados estima melhor a proteína total. Assim quanto mais IgG houver na proteína total, melhor será a relação entre Brix e IgG, que não se verificou neste caso. Uma hipótese explicada por Schalich et al., (2021), passa pela presença no modelo de uma grande magnitude dos erros estatísticos que não oferece um ajuste próximo para quaisquer previsões, portanto, os valores de Brix não teriam poder preditivo para as concentrações de IgG.

Tabela 7: Modelo de Regressão linear múltipla relativo à relação entre os componentes do colostro e o Brix. São representados os coeficientes (erro padrão) para cada variável.

Componentes	Coeficiente	Erro padrão	Valor P	R^2
Constante	1,058***	0,01167	<0,001	0,95
Proteína	0,014***	0,00069	<0,001	
MS	0,004***	0,00061	<0,001	

(*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001)

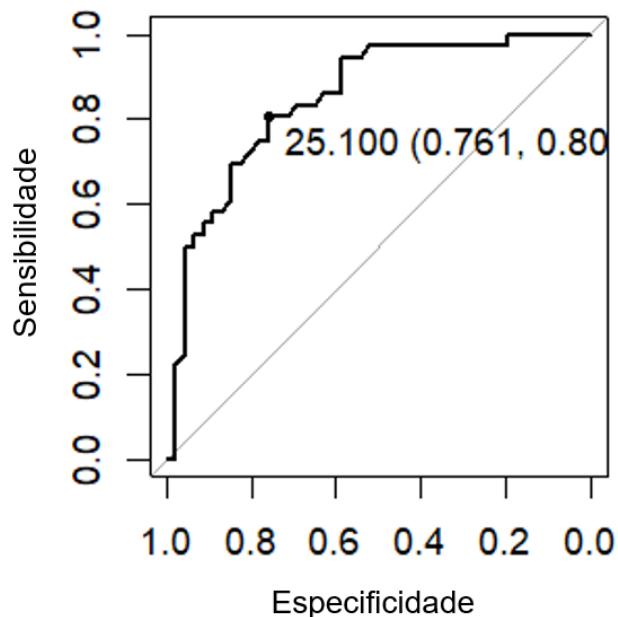
4.3. Determinação do valor de *cut-off* de Brix para identificação da qualidade do colostro

Como referido anteriormente, o colostro é considerado de qualidade alta/adequada quando a concentração em IgG ≥ 50 g/L. Neste estudo observou-se que 56,1% (n=46) das amostras de colostro foram identificados com uma qualidade adequada e 43,9%

(n=36) amostras com uma qualidade baixa/inadequada. É de grande importância referir que num estudo para determinar a utilidade do Brix para avaliação da qualidade do colostrum numa exploração é necessário incluir colostros de qualidade adequada e inadequada, de modo a ter uma variância suficientemente grande para que o estudo seja representativo (Lombard et al., 2022). Neste estudo, tal como pode ser observado pelas medidas de dispersão (Tabela 4), considera-se que a variabilidade das amostras seja representativa para atender ao objetivo do trabalho.

A análise ROC identificou o Brix como uma medida adequada para distinguir colostrum quanto à sua qualidade, com uma AUC = 0,85. Usualmente considera-se um método adequado a valores de AUC > 0,7, sendo que quanto maior perto de 1 melhor é a capacidade do método/instrumento.

De seguida averiguou-se qual seria o valor de Brix com um melhor equilíbrio entre a sensibilidade e especificidade, através do índice de Youden. O valor de *cut-off* obtido foi o de 25,1%, com uma sensibilidade de 80%, uma especificidade de 76% e uma exatidão de 79% (Figura 14), para identificar colostrum de boa qualidade ($\text{IgG} \geq 50 \text{ g/L}$).



*Figura 14: Curva ROC, com valor de cut-off, sensibilidade e especificidade
(Fonte: R Core Team, 2024)*

Observa-se ainda na Figura 14 o aumento do valor *cut-off* associado a um incremento na sensibilidade, mas com um decréscimo da especificidade. Observa-se o contrário para valores de Brix inferiores.

A delimitação do valor de *cut-off* é essencial para que a qualidade do colostrum seja avaliada de forma simples no contexto de exploração (visando as concentrações de IgG analisadas por RID ou ELISA como referência). É referido na literatura que utilizando

valores mais baixos de Brix corre-se o risco de se obter colostros de qualidade inadequada (Lombard et al., 2022). Foi apontado por estudos anteriores que o valor de *cut-off* apropriado para colostro de qualidade adequada, medido pelo refratômetro Brix, está compreendido entre os 20% e 23% (Bielman et al., 2010; Quigley et al., 2013; Bartier et al., 2015; Lokke et al., 2016; Buczinski & Vandeweerd, 2016). Kessler et al., (2021) apontou um menor valor de *cut-off* (19,3%), quando comparado com este estudo, mas com valores de sensibilidade e especificidade muito elevados (87,1% e 100%, respectivamente). Pelas descobertas do presente estudo o valor de *cut-off* apropriado foi de 25,1%, com valores de sensibilidade e especificidade de 80% e 76%, respectivamente. No estudo de Bielman et al., (2010) foi testado um valor de *cut-off* aproximado a este estudo, de 24%, onde obteve uma sensibilidade e especificidade menor de 71,8% e de 75%, já no estudo de Bartier et al., (2015), para um valor de *cut-off* de 25%, obteve uma sensibilidade maior (82,4%) e uma especificidade menor (60,3%). Bartier et al., (2015), afirmou que uma amostra com um valor de *cut-off* de Brix menor que 23%, tem 61% de probabilidade de ser inadequado na avaliação do colostro, enquanto se for maior que 23%, a probabilidade de ser adequado são 85,5%, Buczinski & Vandeweerd (2016), reportaram um valor de *cut-off* de Brix > 22%, com uma probabilidade de 94,3% desse colostro ser de boa qualidade. Existem três razões prováveis para o valor de *cut-off* nos estudos anteriores ter sido mais baixo do que neste estudo, incluindo a metodologia diferente de medição de IgG (RID ou ELISA), a variação na qualidade do colostro e o número de amostras testadas (>100) na maioria dos estudos anteriores. Conclui-se assim, que apesar do valor de *cut-off* deste estudo estar acima do intervalo proposto por outros autores, este constitui uma probabilidade de 80% de identificar colostro de qualidade adequada, é importante de referir que a principal vantagem do uso do Brix não é quantificar a qualidade do colostro de forma linear, mas excluir colostros de qualidade inadequada para alimentação do vitelo recém-nascido. Os colostros referidos como baixa qualidade pode ser posteriormente usados como tomas subsequentes à primeira (Fischer et al., 2021).

4.4. Avaliação da qualidade nutricional com base no refratômetro Brix

Neste capítulo testaram-se os colostros identificados com qualidade adequada através do refratômetro Brix que apresentavam valores significativamente superiores de MS, proteína e gordura. A divisão efetuada foi baseada nos resultados do capítulo anterior ($Brix < 25,1\%$ - qualidade inadequada; $Brix \geq 25,1\%$ - qualidade adequada).

Observou-se uma diferença significativa ($P < 0,001$) entre os colostros de qualidade inadequada e adequada na percentagem da MS ($22,5 \pm 3,25\%$ e $28,1 \pm 4,29\%$,

respetivamente; Figura 15) e de proteína ($12,8 \pm 2,77\%$ e $17,9 \pm 2,41\%$, respetivamente; Figura 16). Ou seja, os colostros classificados de qualidade adequada apresentaram percentagens significativamente superiores de MS e proteína em comparação com colostros de qualidade inadequada. Estes resultados são expectáveis, uma vez que, os colostros classificados de qualidade adequada apresentem percentagens significativamente superiores de MS e proteína em comparação com os colostros de qualidade inadequada. Isso ocorre porque, a qualidade do colostro está associada à sua composição nutricional e imunológica, em particular à concentração imunoglobulinas (como a IgG), que são cruciais para a transferência de imunidade passiva e para o desenvolvimento do vitelo. Além disso, MS reflete não apenas a presença de proteínas, mas também de outros constituintes importantes como gordura, lactose e minerais, que contribuem para o valor nutricional do colostro (Weaver et al., 2000).

Por outro lado, os colostros de qualidade inadequada geralmente apresentam menores concentrações desses componentes, o que compromete a transferência imunológica. A forte correlação entre a qualidade do colostro, medida pelo Brix, e a percentagem de proteína e MS indica que o uso do refratômetro Brix pode ser uma ferramenta eficiente para estimar a qualidade nutricional do colostro. Este é um aspecto relevante, uma vez que as proteínas são fontes de aminoácidos e desempenham várias funções para o recém-nascido, como a síntese de proteínas e o desenvolvimento gastrointestinal (Silva et al. 2024).

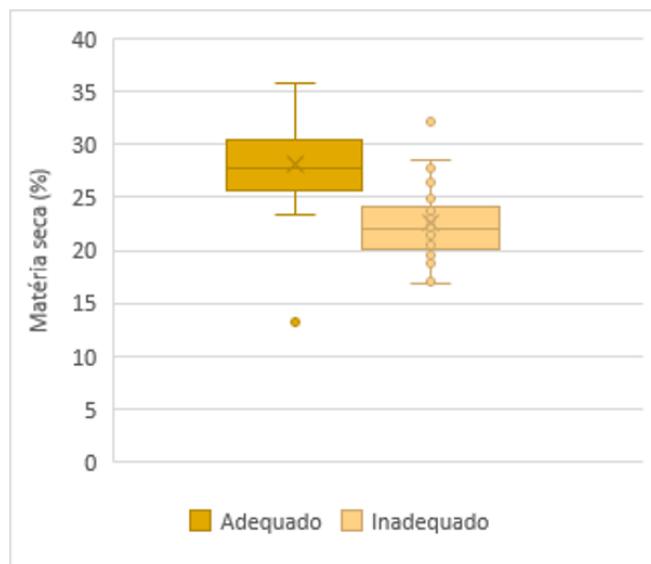


Figura 15: Colostros de qualidade inadequada e adequada na percentagem da MS para o valor de cut-off de 25,1%

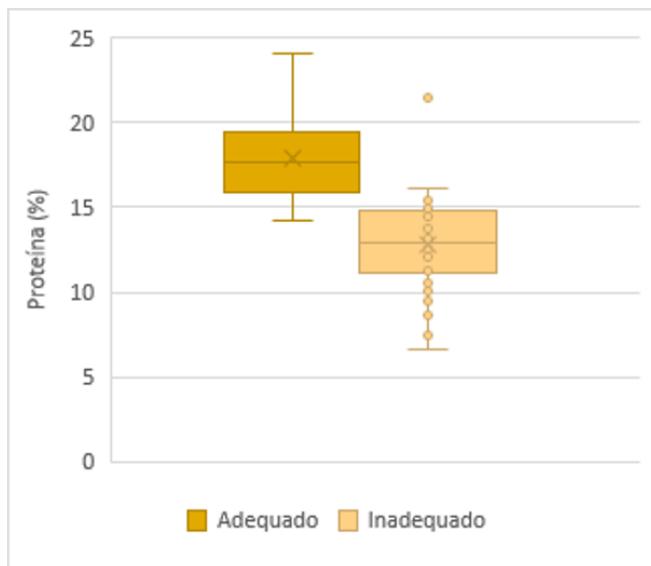


Figura 16: Colostros de qualidade inadequada e adequada na percentagem da proteína para o valor de cut-off de 25,1%

No caso da gordura verificou-se que não existe diferenças significativas ($P=0,208$) entre colostro de qualidade inadequada e adequada ($4,2 \pm 2,57\%$ e $5,1 \pm 3,38\%$, respetivamente; Figura 17), o que indica que o Brix não é um bom indicador do teor de gordura no colostro. Ou seja, um colostro admitido como adequado através da análise tipicamente realizada nas explorações não permite diferenciar colostros quanto à percentagem de gordura.

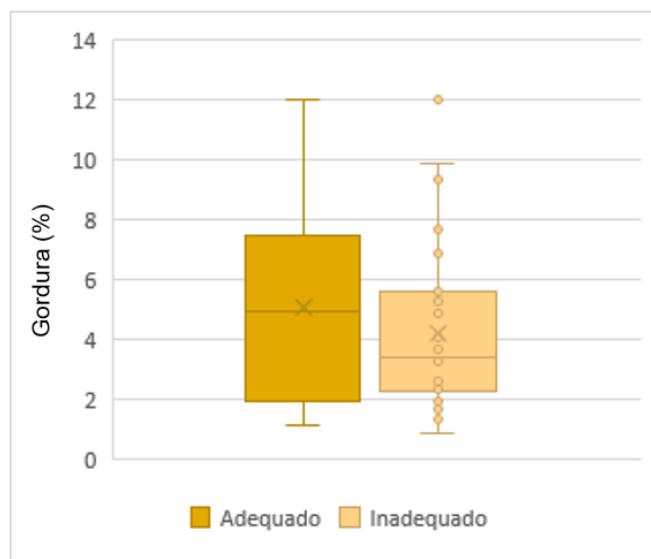


Figura 17: Colostros de qualidade inadequada e adequada na percentagem de gordura para o valor de cut-off de 25,1%

Silva et al., (2024), relataram a importância da gordura fornecida pelo colostro, sendo essencial logo após o nascimento. A gordura serve como componente estrutural das membranas, é precursor de outras moléculas e atua em vários processos biológicos. Esta fonte de energia é particularmente importante em recém-nascidos, pois a ingestão de lactose do colostro é insuficiente para atender às necessidades de glicose, também pode ser usada como fonte de calor, pois os recém-nascidos nascem mal isolados e têm baixas taxas metabólicas. Assim, pesquisas futuras e práticas nas explorações devem focar na avaliação do conteúdo de gordura do colostro para garantir que os recém-nascidos recebam o suporte nutricional adequado, especialmente na fase inicial de vida.

O grau Brix reflete principalmente a concentração de sólidos solúveis. Embora o grau Brix não seja uma medida de contabilizar gordura, uma vez que não é um sólido solúvel, colostros com teores de gordura elevados ou turbidez pode interferir na refração da luz usada pelo refratômetro, o que pode causar uma leitura ligeiramente alterada (Fox et al., 1998). Em contrário, Schalich et al., (2021), relataram no estudo que a gordura não afeta a leitura do grau Brix, devido à sua insubibilidade.

5. Considerações finais

O refratômetro de Brix é muito utilizado nas explorações de bovinos leiteiros como uma ferramenta prática para avaliar a qualidade do colostro, principalmente em relação à concentração de imunoglobulinas, que são essenciais para a imunidade passiva dos vitelos recém-nascidos. O objetivo deste estudo foi investigar a associação entre o Brix e diversos parâmetros de qualidade do colostro, incluindo a concentração de proteínas, gordura, MS e IgG, a fim de validar o uso do Brix como um instrumento preciso da qualidade do colostro.

Verificou-se que as variáveis MS, proteína, IgG e ESD apresentaram uma associação significativa com o Brix. Em contraste, a gordura, pH e densidade demonstraram ter pouco impacto no grau de Brix, com coeficientes baixos.

Os resultados deste estudo sugerem que o refratômetro de Brix é uma ferramenta eficaz para identificar colostro de qualidade inadequada e adequada. Foi indentificado com bons níveis de sensibilidade e especificidade o valor de 25,1% como valor de corte para distinguir colostro de baixa ($IgG < 50 \text{ g/L}$) e alta qualidade ($IgG \geq 50 \text{ g/L}$). Isso é particularmente importante para garantir que os vitelos recebam a quantidade necessária de imunoglobulinas durante as primeiras horas de vida, um período crítico para a absorção de anticorpos ajudando a aumentar a eficiência da transferência de imunidade passiva e a proteção contra doenças.

Embora o refratômetro de Brix seja indiscutivelmente uma forma de estimar as concentrações de IgG no colostro, é a ferramenta que os produtores têm atualmente disponível para indentificar de forma expedita colostros de boa qualidade, que devem ser administrados nas primeiras horas de vida do vitelo. O valor proposto permite a distinção de colostro em função da MS e proteína, mas não gordura. Esta situação poderá ser considerada limitante, face às elevadas necessidades energéticas do vitelo recém-nascido. Assim, é suportada a administração de tomas adicionais de colostro ao longo das primeiras 24h de vida, evitando situações de déficit calórico e facilitando os mecanismos termoregulatórios, especialmente importantes em situações de temperaturas ambientais abaixo da zona termoneutralidade do vitelo.

6. Referências bibliográficas

Abdou, H., Marichatou, H., Beckers, J., Dufrasne, I., & Hornick, J. (2012). Physiologie de la production et composition chimique du colostrum des grands mammifères domestiques: généralités. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 156, 87 – 98.

Associação Brasileira de Programas de Melhoria da Qualidade do Leite (2010). Lácteos Seguros - Análises de Rotina do Leite - Parte V. Ciência do Leite.

Águas, A., Broseguini, M., Gordinho R., & Drago, V. (2014). *Determinação do Teor em Matéria Gorda no Leite utilizando o método de Rose Gotillieb*. [Trabalho académico, Universidade de Algarve]. Repositório Científico Institucional (Sapientia) – Universidade do Algarve.

Agriterra (2020). Refratómetro Digital. <https://www.agriterra.pt/Artigos/307265-Refratometro-digital-HI96813-para-medicao-de-acucar-no-vinho-por-ciento-Brix-e-alcool.html>

Allaire, J. (2024). RStudio: Integrated Development Environment for R.

Althaus, R., Sosa, J., Gapel, C., Scaglione, L., Moreyra, E., & Coraza, M. (2001). Leche y Calostro de Ovejas Corriedale: Composición Química y Mineral. *Fave*, 15, 7-13.

Alves F. (2018). *Caracterização da composição do leite numa empresa de lacticínios*. [Dissertação de Mestrado, Universidade do Porto]. Repositório Aberto da Universidade do Porto.

Andrade, E., Fonseca, L., Souza, M., Penna, M., Cerqueira, M., & Leite, M. (2022). Fat content in fermented milk beverages: Determination by the Gerber method. *Semina: Ciências Agrárias*, 43 (1), 441- 447.

Araújo, M. (2019). *Revisão bibliográfica: Avaliação do método de Kjeldahl na determinação de nitrogênio e sua aplicação na análise foliar*. [Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Uberlândia]. Repositório Institucional da Universidade Federal de Uberlândia.

Argüello, A., Castro, N., & Capote, J. (2005). Evaluation of a color method for testing immunoglobulin G concentration in goat colostrum. *Journal of Dairy Science*, 88, 1752-1754.

Bartier, A., Windeyer, M., & Doepel, L. (2015). Evaluation of on-farm tools for colostrum quality measurement. *Journal of Dairy Science*, 98, 1878-1884.

Baumrucker, C., & Bruckmaier, R. (2014). Colostrogenesis: IgG1 transcytosis Mechanisms. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 19, 103–117.

Baumrucker, C., Burkett, A., Magliaro-Macrina, A., & Dechow, C. (2010). Colostrogenesis: Mass transfer of immunoglobulin G1 into colostrum. *Journal of Dairy Science*, 93, 3031-3038.

Bielmann, V., Gillan, J., Perkins, N., Skidmore, A., Godden, S., & Leslie, K. (2010). An evaluation of Brix refractometry instruments for measurement of colostrum quality in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 93, 3713-3721.

Bittar, C. & Paula, M. (2020/06/25). Interpretação dos resultados do colostrómetro. <https://www.milkpoint.com.br/columnas/carla-bittar/uso-do-colostrometro-e-do-refratometro-para-avaliacao-da-qualidade-do-colostro-e-da-transferencia-de-imunidade-passiva-89692n.aspx>

Bleck, G., Wheeler, M., Hansen, L., Chester-Jones, H., & Miller, D. (2009). Lactose Synthase components in milk: Concentrations of α -lactalbumin and β 1,4-galactosyltransferase in milk of cows from several breeds at various stages of lactation. *Reproduction in Domestic Animals*, 44, 241–247.

Blum, J. (2003) Colostrum—more than just an immunoglobulin supplier. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 142, 198-199.

Borad, S., & Singh, A. (2018). Colostrum immunoglobulins Processing, preservation and application aspects. *International of Dairy Journal*, 85, 201-210.

Buczinski, S., & Vandeweerd, J. (2016). Diagnostic accuracy of refractometry for assessing bovine colostrum quality: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 99, 7381-7394.

Calderon, F., Chauveau-Duriot, B., Martin, B., Graulet, B., Doreau, M., & Noziere, P. (2007). Variations in carotenoids, vitamins A and E, and colour in cow's plasma and milk during late pregnancy and the first three months of lactation. *Journal of Dairy Science*, 90, 2335–2346.

Calloway, C., Tyler, J., Tessman, R., Hostetler, D., & Holle, J. (2002). Comparison of refractometers and test endpoints in the measurement of serum protein concentration to assess passive transfer status in calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 221, 1605-1608.

Chigerwe, M., Tyler, J., Schultz, L., Middleton, J., Spain, J., Dill, J., & Steevens, B. (2008). Comparison of four methods to assess colostral IgG concentration in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 233, 761-766.

Chudy, S., Bilska, A., Kowalski, R., & Teichert, J. (2020). Colour of milk and milk products in CIE L* a* b* space. *Medycyna Weterynaryjna*, 76, 77-81.

Comissão Europeia. (2006). Regulamento (CE) n.º 1662/2006. Jornal Oficial da União Europeia (novembro): 1-10. <https://op.europa.eu/pt/publication-detail/-/publication/befe5c7a-c8a0-4518-8742-dc3a1b891836>

Corrêa, F., Corrêa, P., & Abreu, L. (2016). Determinação do extrato seco de leite fermentado, leite UHT e creme de leite: Avaliação de uma metodologia simplificada. *Revista Eletrônica de Extensão*, 13, 83-93. doi: [10.5007/1807-0221.2016v13n24p83](https://doi.org/10.5007/1807-0221.2016v13n24p83)

Costa, A., Goi, A., Penasa, M., Nardino, G., Posenato, L., & De Marchi, M. (2021). Variation of immunoglobulins G, A, and M and bovine serum albumin concentration in Holstein cow colostrum. *Animal*, 15(7), 100299.

Crocker, W., Jenkins, D., Provan, A., Macdonald, F., Rowland, S., & White, J. (1955). 598. A comparison of the Gerber and Röse Gottlieb methods for the determination of fat in milk. *Journal of Dairy Research*, 22(3), 336–339. doi: 10.1016/j.animal.2021.100299.

Cummins, C., Berry, D., Murphy, J., Lorenz, I., & Kennedy, E. (2017). The effect of colostrum storage conditions on dairy heifer calf serum immunoglobulin G concentration and preweaning health and growth rate. *Journal of Dairy Science*, 100(1), 525-535.

Dang, A., Kapilas, S., Purohit, M., & Singh, C. (2009). Changes in colostrum of Murrah buffaloes after calving. *Tropical Animal Health and Production*, 41, 1213–1217.

Davis, K. (s.d.). Quatro técnicas para detecção de outliers: Explorando os métodos para identificar e lidar com outliers. *Shallbd*.

Day, M., & Schultz, R. (2014). *Veterinary Immunology: Principles and practice* (2nd ed.). CRC Press.

Deelen, S., Ollivett, T., Haines, D., & Leslie, K. (2014). Evaluation of a Brix refractometer to estimate serum immunoglobulin G concentration in neonatal dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 97(6), 3838-3844.

Dumas, J. (1831). Procédés de l'analyse Organic. *Annales de Chimie et de Physique*, 247, 198-213.

Dunn, A., Ashfield, A., Earley, B., Welsh, M., Gordon, A., & Morrison, S. (2017). Evaluation of factors associated with immunoglobulin G, fat, protein, and lactose concentrations in bovine colostrum and colostrum management practices in grassland-based dairy systems in Northern Ireland. *Journal of Dairy Science*, 100, 2068–2079.

Dwyer, C., Conington, J., Corbiere, F., Holmøy, I., Muri, K., Nowak, R., Rooke, J., Vipond, J., & Gautier, J. (2015). Invited review: Improving neonatal survival in small ruminants: Science into practice. *Animal*, 10, 449–459.

Elewa, M., El-Saady, G., Ibrahim, K., Tawfek, M., & Elhossieny, H. (2020). A novel method for Brix measuring in raw sugar solution. *Egyptian Sugar Journal*, 15, 69-86.

Elfstrand, L., Lindmark-Mansson, H., Paulsson, M., Nyberg, L., & Akesson, B. (2002). Immunoglobulins, growth factors and growth hormone in bovine colostrum and the effects of processing. *International Dairy Journal*, 12, 879–887.

El-Fattah, A., Rabo, F., El-Dieb, S., & El-Kashef, H. (2012). Changes in composition of colostrum of Egyptian buffaloes and Holstein cows. *BMC Veterinary Research*, 8, 1-7.

El-Loly, M. (2022). Colostrum ingredients, its nutritional and health benefits - An overview. *Clinical Nutrition Open Science*, 44, 126-143.

Elsohaby, I., McClure, J., Hou, S., Riley, C., Shaw. R., & Keefe, G. (2016). A novel method for the quantification of bovine colostral immunoglobulin G using infrared spectroscopy. *International Dairy Journal*, 52, 35-41.

Faria, G. (2022). *Determinação do teor de gordura em amostras de leite por ultrassom*. [Trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal de Ouro Preto]. Repositório Institucional da Universidade Federal de Ouro Preto.

Figueiredo, D., & Silva, L. (2016/08). *O outlier que perturba o seu sono: Como identificar casos extremos?* 10º Encontro da Associação Brasileira de Ciência Política, Belo Horizonte, MG.

Fischer, A., Hare, A., Wood, K., & Steele, M. (2021). Effects of colostrum management on transfer of passive immunity and the potential role of colostral bioactive components on neonatal calf development and metabolism. *Canadian Journal of Animal Science*, 101, 405–426.

Fleenor, W., & Stott, G. (1980). Hydrometer test for estimation of immunoglobulin concentration in bovine colostrum. *Journal of Dairy Science*, 63, 973-977.

Foley, J., & Otterby, D. (1978) Availability, storage, treatment, composition, and feeding value of surplus colostrum. *Jounal of Dairy Science*, 61, 1033–1060.

Fox, P., McSweeney, P., & Paul, L. (1998). *Dairy chemistry and biochemistry*. Chapman & Hall

Fruugo (n.d.). Refratômetro ótico. <https://www.fruugo.pt/refratometro-de-alcool-para-medicao-percentual-de-volume-de-alcool-espiritual/p-62255737-125421572>

Galvani, F. (2006). Adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta. *Circular Técnica*, 63, 1-9.

Gelsinger, S., Smith, A., Jones, C., & Heinrichs, A. (2015). Technical note: Comparison of radial immunodiffusion and ELISA for quantification of bovine immunoglobulin G in colostrum and plasma. *Journal of Dairy Science*, 98, 4084- 4089.

Georgiev, I. (2008). Differences in chemical composition between cow colostrum and milk. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 11(1), 3–12.

Giovanaz, S. (2022). *Validação do método de Dumas para a análise de proteínas em alimentos lácteos*. [Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul]. Repositório Institucional da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Godden, S. (2008). Colostrum management for dairy Calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 24, 19-39.

Godden, S., Haines, D., Konkol, K.; & Peterson, J. (2009). Improving passive transfer of immunoglobulins in calves. II: Interaction between feeding method and volume of colostrum fed. *Journal of Dairy Science*, 92, 1758-1764.

Godden, S., Lombard, J., & Woolums, A. (2019) Colostrum management for dairy calves. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 35(3), 535–556.

Gomes, L., & Oliveira, R. (2018). Métodos para avaliação do colostro equino. *Revista Brasileira de Medicina Equina*, 13(76), 4-8.

Gulliksen, S., Lie, K., Sølverød, L., & Østerås O. (2008). Risk factors associated with colostrum quality in Norwegian dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 91(2),704-712.

Guy, M., McFadden, T., Cockrell, D., & Besser, T. (1994a) Effects of unilateral prepartum milking on concentrations of immunoglobulin G₁ and prolactin in colostrum. *Journal of Dairy Science*, 77, 3584-3591.

Guy, M., McFadden, T., Cockrell, D., & Besser, T. (1994b) Regulation of colostrum formation in beef and dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 77, 3002-3007.

Hailu M, Ambaw B, Mulueh G, Singa, A., & Woinue Y (2019). Review on colostrum and passive immunity in new born calves. *International Journal of Research and Analytical Reviews*, 6, 739-751.

Hodulová, L., Vorlová, L., & Kostrhounová, R. (2014). Dynamical changes of basic chemical indicators and significant lipophilic vitamins in caprine colostrum. *Acta Veterinaria Brno*, 83, 15-19.

- Hue, T., Williams, J., Petrovski, K., & Bottema, C. (2021). Predicting colostrum and calf blood components based on refractometry. *Journal of Dairy Research*, 88, 194-200.
- James, R., Polan, C., & Cummins, K. (1981). Influence of administered indigenous microorganisms on uptake of [iodine-125] γ -globulin in vivo by intestinal segments of neonatal calves. *Journal of Dairy Science*, 64, 52-61.
- International Organization for Standardization. (2002). ISO 14891:2002 / IDF 185:2002 – Milk and milk products — Determination of nitrogen content — Routine method using combustion according to the Dumas principle. ISO.
- Jenness, R., & Holt, C. (1987). Casein and lactose concentrations in milk of 31 species are negatively correlated. *Experientia*, 43, 1015–1018.
- Jensen, E., Young, J., Mathes, S., List, E., Carroll, R., Kuhn, J., Onusko, M., Kopchick, J., Murphy, E., & Berryman, D. (2020). Crosstalk between the growth hormone/insulin-like growth factor-1 axis and the gut microbiome: A new frontier for microbial endocrinology. *Growth Hormone & IGF Research*, 53, 101346.
- Karastogianni, S., Girousi, S., & Sotiropoulos, S. (2016). pH: Principles and measurement. *Encyclopedia of Food and Health*, 4, 333-338.
- Kehoe, S., Jayarao, B., & Heinrichs, A. (2007). A survey of bovine colostrum composition and colostrum management practices on pennsylvania dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 90, 4108-4116.
- Kessler, E., Bruckmaier, R., & Gross, J. (2021). Short communication: Comparative estimation of colostrum quality by Brix refractometry in bovine, caprine, and ovine colostrum. *Journal of Dairy of Science*, 104, 2438-2444.
- Kjeldahl, J. (1883), Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Zeitschrift für Analytische Chemie*, 22, 366-382.
- Klein-Jöbstl, D., Arnholdt, T., Sturmlechner, F., Iwersen, M., & Drillich, M. (2015). Results of an online questionnaire to survey calf management practices on dairy cattle breeding farms in Austria and to estimate differences in disease incidences depending on farm structure and management practices. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 57(1), 44.

Klein-Jöbstl, D., Iwersen, M., & Drillich, M. (2014). Farm characteristics and calf management practices on dairy farms with and without diarrhea: a case-control study to investigate risk factors for calf diarrhea. *Journal of Dairy Science*, 97(8), 5110–5119.

Klimes, J., Jagos, P., Bouda, J. & Gajdusek, S. (1986) Basic qualitative parameters of cow colostrum and their dependence on season and post-partum time. *Acta Veterinaria Brno*, 55, 23–39.

Korhonen, H. (1977). Antimicrobial factors in bovine colostrum. *Journal of the Scientific Agricultural Society of Finland*, 49, 434-447.

Kuralkar, P., & Kuralkar, S. (2010). Nutritional and immunological importance of colostrum for the new born. *Veterinary World*, 3(1), 46-47.

Larson, B., Heary, H. & Devery, J. (1980). Immunoglobulin Production and Transport by the Mammary Gland. *Journal of Dairy Science*, 63, 665–671.

Lokke, M., Engelbrecht, R., & Wiking, L. (2016). Covariance structures of fat and protein influence the estimation of IgG in bovine colostrum. *Journal of Dairy Research*, 83, 58-66.

Lombard, J., Quigley, J., Haines, D., Garry, F., Earleywine, T., Uriel, N., Chamorro, M., Godden, S., McGuirk, S., Smith, G., Shivley, C., Catherman, D., Heinrichs, A., James, R., Maas, J., Sterner, K., & Sockett, D. (2022) Letter to the editor: Comments on Schalich et al. (2021), Colostrum testing with Brix is a valuable on-farm tool. *Journal Animal Science*, 100, 7469-7481.

Lucey, J., Hauth, B., Gorry, C., & Fox, P. (1993). Acid-base buffering of milk. *Milchwissenschaft*, 48, 268–272.

Lüdecke, D., Ben-Shachar, M., Patil, I., Waggoner P., & Makowski, D. (2021). Performance: An R package for assessment, comparison and testing of statistical models. *Journal of Open Source Software*, 6(60), 3139. doi: [10.21105/joss.03139](https://doi.org/10.21105/joss.03139)

Lynch, J., & Barbano, D. (1999). Kjeldahl nitrogen analysis as a reference method for protein determination in dairy products. *Journal of AOAC International*, 82, 1389-1398.

Mach, J., & Pahud, J. (1971). Secretory Ig A, a major immunoglobulin in most bovine external secretions. *The Journal of Immunology*, 106 (2), 552–563.

Madsen, B., Rasmussen, M., O’Nielsen, M., Wiking, L., & Larsen, L. (2004). Physical properties of mammary secretions in relation to chemical changes during transition from colostrum to milk. *Journal of Dairy Research*, 71, 263– 272.

Mancini, G., Carbonara, A., & Heremans, J. (1965). Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, 2, 235-254.

Mann, S., Leal Yedes, F., Overton, T., Lock, A., Lamb, S., Wakshlag, J., & Nydam, D. (2016). Effect of dry period dietary energy level in dairy cattle on volume, concentrations of immunoglobulin G, insulin, and fatty acid composition of colostrum. *Jounal of Dairy Science*, 99(3), 1515–1526.

Manuel, C., Erwin, R., Bernardo, L., & Carolina, I. (2000). Validacion del metodo butirometrico de gerber por comparacion con el metodo de referencia de Röse Gottlieb para la determinacion de materia grasa en leche. *Agro Sur*, 28, 123–131.

Maunsell, F., Morin, D., Constable, P., Hurley, W., McCoy, G., Kokoma, I., & Isaacson, R. (1998). Effects of mastitis on the volume and composition of colostrum produced by Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 81(5), 1291-1299.

McBeath, D., Penhale, W. & Logan, E. (1971). An examination of the influence of husbandry on the plasma immunoglobulin level of the newborn calf using a rapid refractometer test for assessing immunoglobulin content. *Veterinario Recife*, 88, 266-270.

McGrath, B., Fox, P., McSweeney, P., & Kelly, A. (2016). Composition and properties of bovine colostrum: A review. *Dairy Science & Technology*, 96(2), 133–158.

McGuirk, S., & Collins, M. (2004). Managing the production, storage, and delivery of colostrum. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 20(3), 593–603.

McIntyre, R., Parrish, D., & Fountaine, F. (1952). Properties of the colostrum of the dairy cow. VII. pH, buffering capacity and osmotic pressure. *Journal of Dairy Science*, 23, 405–422.

Mechor, D., Gröhn, Y., McDowell, L., & Van Saun, R. (1992). Specific gravity of bovine colostrum immunoglobulins as affected by temperature and colostrum components. *Journal of Dairy Science*, 75, 3131-3135.

Moreira, A. (2014). *Estudo comparativo das técnicas, parâmetros e indicadores de avaliação da qualidade do leite dos Açores - PT e do Estado do Paraná – BR*. [Dissertação de Mestrado, Universidade dos Açores]. Repositório da Universidade da Açores.

Moreno-Indias, I., Sánchez-Macías, D., Castro, N., Morales-Delanuez, A., Hernández-Castellano, L., Capote, J., & Argüello, A. (2012). Chemical composition and immune status of dairy goat colostrum fractions during the first 10h after partum. *Small Ruminant Research*, 103(3), 220- 224.

Morin, D., Constable, P., Maunsell, F., & McCoy, G. (2001). Factors associated with colostral specific gravity in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 84(5), 937-943.

Nardone, A., Lacetera, N., Bernabucci, U., & Ronchi, B. (1997). Composition of colostrum from dairy heifers exposed to high air temperatures during late pregnancy and the early postpartum period. *Journal of Dairy Science*, 80(5), 838-844.

Muller, L., & Ellinger, D. (1981). Colostral immunoglobulin concentrations among breeds of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 64, 1727-1730.

Newby, T., Stokes, C., & Bourne, F. (1982). Immunological activities of milk. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 3, 67–94.

NP-469 (1983). *Leite: Determinação do teor de matéria gorda (Técnica Gerber)*. Processo corrente. Lisboa: Ministério da Indústria, Energia e Exportação - Secretaria de Estado da Energia - Direcção-Geral da Qualidade.

NP-474 (1967). *Leite: Determinação da densidade relativa. Processo corrente*. Lisboa: Ministério da Indústria, Energia e Exportação - Secretaria de Estado da Energia - Direcção-Geral da Qualidade.

NP-475 (1983). *Leite: Determinação do resíduo seco e resíduo seco isento de matéria gorda*. Lisboa: Ministério da Indústria, Energia e Exportação - Secretaria de Estado da Energia - Direcção-Geral da Qualidade.

Nogueira, A., & Souza, G. (2005). *Manual de laboratórios: Solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos*. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste.

Oliveira, M. (2011). *Espectrofotometria no infravermelho por metodologia FTIR (Fourier Transform Infrared): Validação da análise do teor de uréia e de outros parâmetros de qualidade do leite*. [Dissertação de metrado, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais]. Repositório Institucinal da Universidade Federal de Minas Gerais.

Olives, A., Diaz, J., Molina, M., & Peris, C. (2013). Quantification of milk yield and composition changes as affected by subclinical mastitis during the current lactation in sheep. *Journal of Dairy Science*, 96(12), 7698–7707.

Oyeniyi, O., & Hunter, A. (1978). Colostral constituents including Immunoglobulins in the first three milkings postpartum. *Journal of Dairy Science*, 61, 44-48.

Parrish, D., Wise, G., & Hughes, J. (1948). Properties of the colostrum of the dairy cow. II. Effect of prepartal rations upon nitrogenous constituents. *Journal of Dairy Science*, 31, 889–895.

Parrish, D., Wise, G., Highes, J. & Atkeson, F. (1950). Properties of the colostrum of the dairy cow. V. Yield, specific gravity and concentrations of total solids and its various components of colostrum and early milk. *Journal of Dairy Science*, 33, 457–465.

Playford, R., McDonald, C., & Jonhson, W. (2000). Colostrum and milk-derived peptide growth factors for the treatment of gastrointestinal disorders. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 5-14.

Playford, R., & Weiser, M. (2021). Bovine colostrum: Its constituents and uses. *Nutrients*, 13(1), 265.

Pritchett, L., Gay, C., Besser, T., & Hancock, D. (1991). Management and production factors influencing immunoglobulin G1 concentration in colostrum from Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 74(7), 2336-2341.

Prolab (2018). Medidor de pH. <https://www.prolab.com.br/blog/equipamentos-aplicacoes/phmetro-de-bancada-entenda-sua-funcao-e-como-usar-o-equipamento-correctamente/>

Quigley, J., Lago, A., Chapman, C., Erickson, P., & Polo, J. (2013). Evaluation of the Brix refractometer to estimate immunoglobulin G concentration in bovine colostrum. *Journal of Dairy Science*, 96(2), 1148-1155.

R Core Team, (2024). R: A Language and Environment for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>

Rivero, M., Valderrama, X., Haines, D., & Alomar, D. (2012). Prediction of immunoglobulin G content in bovine colostrum by nearinfrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 95(3), 1410-1418.

Samarütel, J., Baumrucker, C., Gross, J., Dechow, C., & Bruckmaier, R. (2016). Quarter variation and correlations of colostrum albumin, immunoglobulin G1 and G2 in dairy cows. *Journal of Dairy Research*, 83, 209–218.

Santos, P., Edenir, R., & Luis, E. (2013). Application of handheld and portable infrared spectrometers in bovine milk analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 1205-1211.

Schalich, K., Reiff, O., Nguyen, B., Lamb, C., Mendoza, C., & Selvaraj, V. (2021). Temporal kinetics of bovine mammary IgG secretion into colostrum and transition milk. *Journal of Animal Science*, 99(5), 1-12.

Schuenemann, G., Bas, S., Gordon, E., & Workman, J. (2013). Dairy calving management: Description and assessment of a training program for dairy personnel. *Journal of Dairy Science*, 96(4), 2671-2680.

Sebela, F., & Klichnik, V. (1977). Relationship between milk acidity after milking and cow's age. *Zivocisna Vyroba-UVTIZ (Czechoslovakia)*, 22(3), 161-170.

Shaw, R., Kotowich, S., Leroux, M., & Mantsch, H. (1998). Multianalyte serum analysis using mid-infrared spectroscopy. *Annals of Clinical Biochemistry*, 35(6), 624-632.

Shaw, R., & Mantsch H. (2000). Infrared spectroscopy in clinical and diagnostic analysis. In P. J. Griffiths & J. A. de Haseth (Eds.), *Encyclopedia of analytical chemistry: Applications theory and instrumentation*, (83-102). John Wiley & Sons.

Silva, F., Conceição, C., Silva, S., & Cerqueira, J. (2021). A importância do manejo do colostrum. *Revista ruminantes*, 43, 18-19.

Silva, F., Silva, S., Pereira, A., Cerqueira, J., & Conceição, C. (2024). A Comprehensive review of bovine colostrum components and selected aspects regarding their impact on neonatal calf physiology. *Animals*, 14(7), 1130. doi: [10.3390/ani14071130](https://doi.org/10.3390/ani14071130).

Staněk, S., Zink, V., Doležal, O., & Štolc, L. (2014). Survey of preweaning dairy calf-rearing practices in Czech dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 97(6), 3973–3981.

Strekozov, N., Motova, E., & Fedorov, Y. (2008). Evaluation of the chemical composition and immunological properties of colostrum of cow's first milk yield. *Russian Agriculture Science*, 34, 259–260.

Thornhill, J., Krebs, G., & Petzel, C. (2015). Evaluation of the Brix refractometer as an on-farm tool for the detection of passive transfer of immunity in dairy calves. *Australian Veterinary Journal*, 93(1), 26-30.

Tsioulpas, A., Grandison, A., & Lewis, M. (2007). Changes in physical properties of bovine milk from the colostrum period to early lactation. *Journal of Dairy Science*, 90(10), 5012-5017.

Unamuzaga, L., Bragaça, L., Schneider, C., Garcez, K., Barrilari, M., Schwegler, E., Krolow, R., Mattei, E., & Castagnara, D. (2024). Qualidade do colostrum medida com refratômetro digital, lactodensímetro e analisador automático. *Observatório de la Economía Latinoamericana*, 22(7), 1-12. doi: <https://doi.org/10.55905/oelv22n7-058>

Vaz, A., Furtado, A., Marca, A., & Paterno, M. (2004). Qualidade do colostro bovino e transferência de imunidade aos bezerros recém-nascidos na região de Lages, SC. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, 3, 116-120.

Vasseur, E., Borderas, F., Cue, R., Lefebvre, D., Pellerin, D., Rushen, J., Wade, K., & de Passillé, A. (2010). A survey of dairy calf management practices in Canada that affect animal welfare. *Journal of Dairy Science*, 93(3), 1307–1315.

VELP scientifica. (s.d.). *Dumas and Kjeldahl method comparison: Protein determination in feed. VELP E-book*, 1-21. <https://www.velp.com/public/file/E-book-DumasandKjeldahlMethodComparison-NProteinDetermination-274578.pdf?srsltid=AfmBOoq6LWrh5T877cy4KoV572y4YtNZ5HAkRG2nZO-qLc-8yaonY1hz>

Weaver, D., Tyler, J., VanMetre, D., Hostetler, D., & Barrington, G. (2000). Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 14(6), 569–577.

Yilmaz, Ö., & Kaşikçi, G. (2013). Factors affecting colostrum quality of ewes and immunostimulation. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 37(4), 390-394.

Yu, C., & Yao, W. (2017). Robust linear regression: A review and comparison. *Communications in Statistics - Simulation and Computation*, 46(12), 6261-6282.

Zou, X., Guo, Z., Jin, Q., Huang, J., Cheong, L., Xu, X., & Wang, X. (2015). Composition and microstructure of colostrum and mature bovine milk fat globule membrane. *Food Chemistry*, 185, 362–370.