

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INIBIDOR DE TRIPSINA DA SOJA NA  
TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA  
DE BEZERRAS DA RAÇA HOLANDESA**

**Marcela Simões Florio Ferreira**

Zootecnista

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INIBIDOR DE TRIPSINA DA SOJA NA  
TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA  
DE BEZERRAS DA RAÇA HOLANDESA**

**Marcela Simões Florio Ferreira**

**Orientador: Prof. Dr. João Alberto Negrão**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Regina Barbieri de Carvalho**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
Julho de 2012**

Ferreira, Marcela Simões Florio  
F383i Inibidor de tripsina da soja na transferência de imunidade passiva  
de bezerras da raça Holandesa / Marcela Simões Florio Ferreira. --  
Jaboticabal, 2012  
xi, 55 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012  
Orientador: João Alberto Negrão  
Co-Orientadora: Maria Regina Barbieri de Carvalho  
Banca examinadora: José Jurandir Fagliari, Maria da Graça  
Pinheiro  
Bibliografia

1. Colostro. 2. Fração albumina. 3. Imunoglobulina. 4. Perfil  
proteico. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e  
Veterinárias.

CDU 636.2:636.087

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.  
e-mail: masfferreira@gmail.com

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**MARCELA SIMÕES FLORIO FERREIRA** – nascida na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, no dia 29 de agosto de 1986, filha de Antonio Henrique Ferreira e Maria Paula Simões Florio Ferreira. Iniciou o curso de Graduação em Zootecnia na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp – Jaboticabal, em março de 2005, tendo realizado estágio curricular no Programa de Desenvolvimento da Pecuária Leiteira da Região de Viçosa, PDPL–RV, em Viçosa – MG nos meses de setembro a novembro de 2009. Obteve o grau de zootecnista em janeiro de 2010 e em março do mesmo ano, ingressou no curso de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, área de concentração em Produção Animal, pela mesma Instituição, onde foi bolsista CAPES tendo obtido o título de mestre em 05 de Julho de 2012.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela minha vida e por todos que dela fazem parte.

Aos meus pais pelo amor, dedicação e apoio desde minhas primeiras escolhas.

Às minhas irmãs e cunhados, agradeço o companheirismo, incentivo e a compreensão nos momentos que dela precisei.

Ao meu sobrinho Guilherme, que mesmo ainda tão jovem, tem feito dos meus dias mais alegres e esperançosos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, pela oportunidade de completar mais esta etapa da minha vida.

Ao Prof. Dr. João Alberto Negrão por ter aceito ser meu orientador, muito obrigada.

À Profa. Dra. Maria Regina Barbieri de Carvalho agradeço pela amizade, dedicação, carinho, apoio e pelo incentivo durante o período em que trabalhamos juntas. Certamente jamais me esquecerei de alguém tão especial. Obrigada por tudo que representa pra mim.

À Agropecuária Agrindus S.A pela disponibilização de parte das bezerras de seu plantel para a realização deste trabalho. Sou especialmente grata aos funcionários da maternidade e bezerreiras, dos quais sempre me lembrarei com muito carinho.

Aos membros das bancas examinadoras pelas sugestões que tanto contribuíram para o aperfeiçoamento e finalização desta pesquisa.

Aos colegas do departamento em especial à Tânia e à Fátima pela amizade, paciência e auxílio no desenvolvimento das análises.

Às minhas avós, agradeço a Deus por tê-las comigo sempre presentes.

Aos meus amigos Gregório, Bruna Kamimura, Graziela, Mariana Berton, Gabriela, Mariana Fröner, Natália Irano, Kamilla e às meninas da república,

presentes nos bons e maus momentos desde o início da minha jornada em Jaboticabal. Sentirei saudades de tudo o que vivemos juntos.

Aos amigos da graduação, da faculdade e à todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento e amadurecimento.

À CAPES pela bolsa de estudos.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. Geral.....	14
2.1. Específicos.....	14
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
3.1. Imunidade passiva em neonatos.....	15
3.2. Inibidores de tripsina vegetal.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 Local e material.....	23
4.2 Obtenção da fração albumina da soja.....	23
4.3 Processamento do colostro.....	24
4.4 Manejo dos animais.....	24
4.5 Alimentação.....	25
4.6 Colheita e preparo das amostras de sangue.....	25
4.7 Preparo das amostras de colostro.....	25
4.8 Análises laboratoriais.....	26
4.8.1 Composição centesimal dos grãos de soja.....	26
4.8.2 Determinação da atividade dos inibidores de tripsina.....	26
4.8.3 Análises do colostro.....	27
4.8.4 Análises do soro sanguíneo.....	29
4.9 Análise estatística.....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1 Composição centesimal da soja.....	30
5.2 Atividade do inibidor de tripsina da soja.....	30

5.3 Características do colostro.....	31
5.4 Características do soro sanguíneo.....	35
6. CONCLUSÕES.....	43
7. IMPLICAÇÕES.....	44
8. REFERÊNCIAS.....	45
ANEXO 1.....	55



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1.	Gel de eletroforese em poliacrilamida (SDS-PAGE) de amostras de soro sanguíneo de bezerra da raça Holandesa, submetida ao tratamento 3, antes da ingestão de colostro adicionado de fração albumina (a) e 12 (b), 24 (c), 36 (d) e 48 horas (e) após a ingestão de colostro e solução marcadora (Sigma) (P).....	38
2.	Sequencia de traçado eletroforético de amostras de soro sanguíneo de bezerra da raça Holandesa, submetida ao tratamento 3, antes da ingestão de colostro adicionado de fração albumina (a) e 12 (b), 24 (c), 36 (d) e 48 horas (e) após a ingestão de colostro.....	39
3.	Concentrações de IgG ( $\text{g.dL}^{-1}$ ) no soro sanguíneo de bezerras alimentadas com colostro adicionado de inibidor de tripsina da soja, durante as primeiras 48 horas pós-parto.....	40
4.	Atividade de GGT ( $\text{U.L}^{-1}$ ) no soro sanguíneo de bezerras alimentadas com colostro adicionado de inibidor de tripsina da soja, durante as primeiras 48 horas pós-parto.....	40
5.	Concentrações proteína total ( $\text{g.dL}^{-1}$ ) no soro sanguíneo de bezerras alimentadas com colostro adicionado de inibidor de tripsina da soja, durante as primeiras 48 horas pós-parto.....	41

### LISTA DE TABELAS

TABELA		Página
1.	Composição centesimal da soja.....	30
2.	Atividade dos inibidores de tripsina (UTI.mg amostra <sup>-1</sup> ) da farinha de grãos de soja, da fração albumina não coagulada pelo calor e do inibidor purificado.....	31
3.	Médias e desvios-padrão dos valores de acidez (°D), densidade (mg.mL <sup>-1</sup> ), gordura (%) e inibidores de tripsina (mg.mL <sup>-1</sup> ) de cada “pool” de colostro armazenado sob congelamento.....	32
4.	Perfil protéico (%) dos “pool” de colostro armazenados sob congelamento.....	33
5.	Concentração de imunoglobulina G (IgG) e de proteína total (PT) e atividade de gamaglutamiltransferase (GGT) no soro lácteo de colostro bovino.....	35
6.	Análise de variância (teste F) dos parâmetros do soro sanguíneo de bezerras alimentadas com colostro adicionado de inibidor de tripsina da soja, durante as primeiras 48 horas pós-parto.....	36

## INIBIDOR DE TRIPSINA DA SOJA NA TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA DE BEZERRAS DA RAÇA HOLANDESA

**RESUMO** – O sistema imunológico de bezerros consolida-se com a ingestão do colostro, alimento rico em imunoglobulinas que são proteínas responsáveis por transferir imunidade aos bezerros. A eficiência dessa transferência é influenciada por uma série de fatores, dentre eles a integridade das imunoglobulinas a serem absorvidas. No colostro estão naturalmente presentes os inibidores de tripsina, capazes de preservar as imunoglobulinas da ação de enzimas proteolíticas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a potencialidade dos inibidores de tripsina da soja na transmissão da imunidade passiva de bezerras da raça Holandesa, por meio da análise das concentrações de imunoglobulina G (IgG) e proteína total (PT) e atividade da gamaglutamiltransferase (GGT) sérica. Foram utilizadas 18 bezerras recém-nascidas alimentadas com colostro (T1), colostro adicionado de inibidor de tripsina purificado Sigma tipo I-S (50 mg) (T2) e provenientes da fração albumina da soja 1,08 g (T3). As amostras de sangue foram colhidas por venopunção da veia jugular com 1, 12, 24, 36 e 48 h após o nascimento, sendo a primeira colheita realizada antes do fornecimento do colostro. O colostro apresentou teor de gordura de 3,2 a 7,2 %, de proteína total de 14,10 a 19,52 %, representada por 7,84 a 9,44 % pelas proteínas do soro (PS). A atividade dos inibidores de tripsina variou de 0,766 a 0,945 mg de tripsina inibida.mL<sup>-1</sup>. Não houve influencia dos tratamentos (p>0,05%) para os parâmetros analisados, porém houve efeito (p<0,05%) do período de amostragem, com aumento nas concentrações de IgG, GGT e PT a partir da 0h com respectivos valores médios de 0,68 g.dL<sup>-1</sup>; 15,17U.L<sup>-1</sup>, 4,43 g.dL<sup>-1</sup>, com pico de absorção às 24 h: 3,06 g.dL<sup>-1</sup>, 2.779 U.L<sup>-1</sup> e 7,54 g.dL<sup>-1</sup>, respectivamente, indicando transmissão adequada de imunidade passiva. A adição dos inibidores de tripsina da soja não interferiu na absorção de IgG, provavelmente devido a elevada atividade dos inibidores de tripsina e a qualidade do colostro utilizado.

**Palavras-Chave:** colostro, fração albumina, imunoglobulina, perfil proteico

## **SOYA TRYPSIN INHIBITOR ON PASSIVE IMMUNITY TRANSFER OF THE DUTCH RACE FEMALE CALVES**

**SUMMARY** - The calves' immune system is consolidated by the ingestion of colostrum, which is rich in immunoglobulin, the proteins that are responsible for transferring the immunity to the calves. This transferring efficacy is influenced by a series of facts, among them the immunoglobulin's integrity to be absorbed. Trypsin inhibitors are naturally present on the colostrum and they are able to preserve the immunoglobulin from the proteoclastic enzyme actions. The aim of this work was to evaluate the potentiality of soya Trypsin inhibitor on the passive immunity of the Holstein female calves, by evaluating the concentration of immunoglobulin G (IgG) and total protein (PT) as well as Gammaglutamil transferase (GGT) activity in serum. Eighteen newborn female calves were taken and they were fed with colostrums (T1), colostrums with purified trypsin inhibitor I-S Sigma (50mg), (T2) and colostrums with soya albumin fraction 1.08 g (T3). Blood samples were collected by jugular veined punch within 1, 12, 24, 36 and 48 hours after they were born, the first collection was done before the colostrums was given. Colostrums have presented 3.2% to 7.2 % of fat contents; 14, 10% to 19, 52 % of total protein represented by 7, 84% to 9, 44 % of serum protein (PS). Trypsin inhibitor activities have varied from 0,766 mg to 0,945 mg of inhibited trypsin mL<sup>-1</sup>. There was no influence of the treatments ( $p > 0,05\%$ ) for the analyzed parameters, however, there was ( $p < 0,05\%$ ) a significant effect for the period of collection, with an increase on IgG, GGT and, PT concentrations from 0h with the respective medium values of 0,68g.dL<sup>-1</sup> 15,17U.L<sup>-1</sup>, 4,43 g.dL<sup>-1</sup>. The absorption pick was at 24 h: with 3,06 g.dL<sup>-1</sup>, 2.779 U.L<sup>-1</sup> and 7,54 g.dL<sup>-1</sup> means, respectively for IgG, GGT and PT, indicating an adequate transmission of passive immunity. The addition of soya Trypsin inhibitors did not interfere on IgG absorption, probably due to the high activity trypsin inhibitors and the quality of the colostrum used.

**Key words:** albumin fraction, colostrum, immunoglobulin, proteic profile

## 1. INTRODUÇÃO

O sistema imunológico é responsável por defender o organismo de corpos estranhos, minimizando a ocorrência de danos à saúde do animal e, conseqüentemente, de custos com tratamento o que compromete a renda do produtor (ABBAS et al., 1997; MARCHESAN, 1998). Em seres humanos, por exemplo, tal sistema tem origem durante a vida intra-uterina pela transferência de anticorpos, dentre eles as imunoglobulinas, advindas da circulação materna por meio da placenta e cordão umbilical, sendo consolidado após o nascimento pela ingestão do colostro.

As fêmeas da espécie bovina possuem placenta sindesmocorial que, devido ao número de camadas de tecido que separam a circulação materna da fetal, impede a transferência de anticorpos no período pré-natal dependendo o bezerro exclusivamente da administração de colostro imediatamente após o nascimento (BAROZA, 2007). Assim, os bezerros nascem agamaglobulinêmicos ou hipogamaglobulinêmicos (ROCHA, 2010) com níveis médios de  $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$  (BESSI, 2001) aumentando a necessidade de serem colostrados ao nascimento, uma vez que esse passa a ser a única fonte de anticorpos para o bezerro (TIZARD, 2002). Para neonatos bovinos, esse cuidado é essencial para a sobrevivência e garantia da qualidade de vida, além da redução dos custos com medicamentos nos primeiros meses (BESSI, 2001; BORGES et al., 2001).

Vários fatores interferem na transmissão da imunidade passiva pelo colostro, dentre eles, a qualidade (concentração de imunoglobulinas) e quantidade do colostro produzido pela mãe, o tempo do primeiro fornecimento ao bezerro, a capacidade de absorção de macromoléculas pelo epitélio intestinal e a integridade das imunoglobulinas (SILVA, 2002; COELHO, 2005).

Dos fatores anteriormente relacionados, a integridade das imunoglobulinas é o menos estudado. Entretanto, pesquisas realizadas com inibidores de tripsina, capazes de impedir a ação das enzimas pancreáticas responsáveis pela degradação das

proteínas presentes no colostro de vacas Jersey, indicam diminuição dos danos causados às imunoglobulinas (QUIGLEY et al., 1995a).

Os inibidores de tripsina estão presentes principalmente nas leguminosas, como a soja, largamente utilizada na alimentação humana e animal. Sua capacidade de inibir a degradação de proteínas se dá no grão não submetido ao tratamento térmico ou em frações purificadas e isoladas (CARVALHO et al., 2002; FELIX, 2005).

A capacidade dos inibidores de tripsina de se complexar com a tripsina impedindo a degradação das proteínas e, conseqüentemente a absorção de aminoácidos pelo organismo animal, causa alterações pancreáticas, bem como diminuição das taxas de crescimento e desenvolvimento (AL-WESALI et al., 1995; CARVALHO et al., 2002).

Por outro lado, a capacidade de impedir a degradação de proteínas pode ser satisfatória quando a intenção é permitir que macromoléculas, como as imunoglobulinas G (IgG) sejam absorvidas intactas pela mucosa intestinal de bezerros, e manter sua capacidade de desenvolver o sistema imune (QUIGLEY et al., 1995a).

A fim de melhorar a transferência da imunidade passiva, alguns estudos foram realizados com animais monogástricos e ruminantes avaliando a possibilidade de se adicionar à dieta o inibidor de tripsina extraído da soja, capaz de impedir a proteólise das imunoglobulinas do colostro (QUIGLEY et al., 1995b).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

Avaliar a potencialidade dos inibidores de tripsina da soja na transmissão de imunidade passiva em bezerras da raça Holandesa.

### **2.2. Específicos**

Obter a fração albumina da soja com inibidores de tripsina ativos.

Avaliar a atividade dos inibidores de tripsina e caracterizar o perfil proteico do colostro de primeira ordenha de vacas da raça Holandesa.

Avaliar a resposta imune por meio de análise da concentração sérica de imunoglobulina G (IgG) e de proteína total (PT) e da atividade de gamaglutamiltransferase (GGT) durante 48 horas após o nascimento.

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1. Imunidade passiva em neonatos**

Os povos que inicialmente habitavam a terra começaram a prática agrícola, e em seguida, a domesticação dos animais como um meio de melhorar sua subsistência, já que assim poderiam produzir seu próprio alimento, deixando de depender apenas da caça de animais ou da colheita de alimentos naturalmente fornecidos pela flora local. Desde então, é constante a busca por meios de desenvolver e aperfeiçoar tais práticas, obtendo-se grande avanço, notadamente na área da medicina veterinária.

Décadas de estudos e pesquisas possibilitaram conhecimentos suficientes para que hoje se compreenda o funcionamento dos sistemas que regem o corpo animal e que os mantêm vivos e saudáveis, capazes de crescer e se reproduzir, sendo possível, aperfeiçoar a produtividade dos sistemas de criação atuais sem, contudo, deixar de se prezar pela saúde dos animais.

Dentre tais sistemas, o imunológico é responsável pela defesa do organismo às condições climáticas adversas e a corpos estranhos, tais como: vírus, bactérias e fungos, capazes de lhe causar doenças (ABBAS et al., 1997; MARCHESAN, 1998). O desenvolvimento ocorre pela transferência de anticorpos (imunoglobulinas) advindos da circulação materna ao indivíduo ainda em formação, por meio da placenta e cordão umbilical, e continua em formação, após o nascimento, pela ingestão do colostro (COELHO, 2005) que é o primeiro leite produzido pelas fêmeas mamíferas, e que além de transmitir imunidade passiva, serve de alimento aos filhotes (COUTO et al., 2010). Os anticorpos, provenientes do colostro, são transportados por pinocitose como macromoléculas intactas através dos enterócitos do intestino delgado, de onde atingem a circulação sanguínea, garantindo aos animais proteção adequada para as primeiras semanas de vida.

Por possuir grande variedade de componentes de defesa natural, o colostro é considerado alimento completo do ponto de vista nutricional, auxiliando na prevenção



de doenças (BAROZA, 2007). Entre os constituintes do colostro destacam-se as imunoglobulinas das quais de 85 a 90% são imunoglobulinas G (ROCHA, 2010), considerada a mais importante na imunização passiva de bezerros (FAGLIARI, 2006). São proteínas indispensáveis à consolidação do sistema imune (ANDREWS; LYONS, 1990), considerando-se valores de  $2,4 \text{ g.dL}^{-1}$  de IgG como ideais quando medidas no soro sanguíneo de bezerros recém natos após a ingestão de colostro (ROCHA, 2010).

Devido ao fato de haver pouca variação nos teores de albumina no soro sanguíneo de bezerros recém-nascidos, o aumento no teor de proteína total é utilizado como parâmetro indireto na quantificação de imunoglobulina G, assim como a atividade da enzima gamaglutamiltransferase (GGT) que também indica a ingestão de IgG (FEITOSA et al., 2001; ROCHA, 2010). Esta situação pode ser comprovada pela correlação positiva encontrada por Rocha (2010), onde o teor de IgG às 24 horas de vida correlacionou-se com a GGT em 0,69 ( $P < 0,01$ ) e com o teor de proteína total em 0,85 ( $P < 0,01$ ). Teores de proteína total menores que  $4,2 \text{ g.dL}^{-1}$  e atividade de GGT inferior a  $200 \text{ U.L}^{-1}$  ocorrem em animais nos quais houve deficiência na transferência de imunidade.

A eficiência da transferência da imunidade aos bezerros depende da qualidade do colostro, característica essa influenciada pelo histórico de doenças e vacinações da vaca, bem como quantidade produzida, raça e época do ano em que ocorre o parto e ao manejo sanitário (vacinações e limpeza dos ambientes e equipamentos) adotado. O colostro é considerado de boa qualidade quando possui quantidade superior a  $51 \text{ mg}$  de imunoglobulinas. $\text{mL}^{-1}$ . Concentrações inferiores a  $20 \text{ mg.mL}^{-1}$  caracterizam colostro de baixa qualidade (COELHO, 2005) e comprometem a transferência da imunidade passiva, aumentando os riscos de doenças e a taxa de mortalidade (NOCEK et al., 1984).

Dessa forma, os bezerros ficam susceptíveis à ação de patógenos causadores de doenças comuns e de grande impacto econômico até o primeiro ano de idade, tais como as diarreias e pneumonias, as principais causas de mortalidade (COELHO, 2005). Dentre estas, a diarreia ocorre como resultado da interação entre o bezerro, o meio ambiente, os agentes infecciosos causadores e o manejo sanitário e nutricional

empregados. A morte de bezerros neonatos é uma das principais causas de prejuízos econômicos e sua ocorrência é variável em função do sistema de criação, o agente causal e a capacidade de resposta do organismo. Além dos patógenos, outra fonte de predisposição às doenças está nas condições climáticas do ambiente em que o animal se encontra, principalmente no que se refere à temperatura e umidade. A elevação da temperatura do ar, associada à alta umidade e radiação solar intensa, leva ao aumento da atividade respiratória e desajusta o sistema termorregulatório, desencadeando menor taxa de crescimento dos indivíduos e queda na produção. Além disso, temperatura e umidade elevadas, aumentam as chances de ocorrerem pneumonia (SILVA, 2010).

O produtor deve, portanto, estar atento a todos os fatores influenciáveis na transmissão da imunidade passiva aos bezerros (RIET-CORREA et al., 2001; ANDREWS et al., 2008). Assim, entende-se ser necessário um controle da qualidade do colostro em termos de concentração de IgG e da quantidade ingerida pelo bezerro.

As imunoglobulinas ingeridas no colostro são absorvidas na região médio-caudal do intestino delgado dos bezerros (KAUP et al., 1996), a qual possui permeabilidade transitória com absorção máxima até 6 horas, cessando entre as 24 e 48 horas após o nascimento, caracterizando o “fechamento intestinal” (COELHO; SILPER, 2008). Daí, a importância de se administrar o colostro aos bezerros o mais rapidamente possível após o parto (TIZARD, 2003), sendo essencial que o mesmo tenha ingerido de 10 a 15% de seu peso vivo ao completar um dia de vida (SILVA, 2002). No soro sanguíneo de bezerros recém-nascidos, é possível verificar concentração máxima de imunoglobulinas G, proteína total e de atividade de gamaglutamiltransferase, por volta de 12 a 24 horas após a ingestão do colostro (ROCHA, 2010).

Corroborando com autores que afirmam ser a colostragem nas primeiras horas de vida fator crucial para o bom desenvolvimento e desempenho dos bezerros recém natos, Coelho (2005) estimou que 75% das perdas econômicas (perdas por queda do desempenho animal em decorrência da debilidade causada por doenças, maior gasto com mão de obra e com medicamentos) de uma propriedade leiteira até o primeiro ano de idade dos bezerros, ocorrem até os mesmos atingirem 28 dias de idade, época na

qual são dependentes da imunidade que adquiriram por meio da administração do colostro materno (BANKS; McGUIRE, 1989).

Sabe-se que em bezerros nos quais foi eficientemente realizada a transferência de imunidade, há elevada atividade da GGT e imunoglobulinas G em quantidade adequada, de acordo com o momento em que foi realizada a coleta do sangue (SILVA et al., 2007). O fornecimento do colostro ao bezerro pode ser realizado pela ingestão direta do úbere materno ou artificialmente em baldes ou mamadeiras, não havendo diferenças significativas quanto à transferência de imunidade em ambos os casos (SILVA, 2002; PAIVA et al., 2006).

Por outro lado, além dos fatores qualidade e quantidade do colostro fornecido e o tempo decorrente do parto até o primeiro fornecimento, a integridade das imunoglobulinas absorvidas, influenciam na formação do sistema imunológico dos bezerros colostrados (BORGES, 1997; MORAES et al., 1997; PERINO, 1997; SILVA, 2002; COELHO, 2005).

O sistema digestivo dos bezerros ao nascer produz pequena quantidade de ácidos, possui atividade mínima de enzimas como a pepsina gástrica além de haver no colostro, a presença do inibidor de tripsina, capaz de impedir a digestão dos anticorpos que chegam intactos ao intestino delgado (BESSI, 2001). Porém, tal característica é perdida com o passar das horas, havendo redução do número de macromoléculas absorvíveis, o que compromete a transferência da imunidade (SILVA, 2002).

De acordo com Andrews; Lyons (1990), as imunoglobulinas devem ser ingeridas e absorvidas intactas (como macromoléculas) pelos recém-nascidos, ou seja, sem que sofram a ação das enzimas digestivas. Porém, ao serem ingeridas, tais proteínas são colocadas em contato com o suco gástrico e pancreático presente no abomaso e intestino destes animais, os quais possuem enzimas, dentre elas a tripsina, responsável pela degradação das proteínas quebrando a ligação peptídica arginina-lisina (ANDRIGUETTO et al., 2002) e a absorção dos aminoácidos livres compromete a funcionalidade da imunoglobulina.

Para melhorar a transmissão da imunidade aos bezerros é fundamental que a ação de tais enzimas sobre as imunoglobulinas seja reduzida. Tal condição só é

possível devido à baixa atividade proteolítica no trato digestivo dos recém-nascidos e pela presença de inibidores de tripsina no colostro (TIZARD, 2002).

Segundo Jensen; Pedersen (1982) e Quigley et al. (1995b), o colostro bovino, em especial o da primeira ordenha, contém inibidor de tripsina o que pode ajudar na transferência da imunidade aos recém-natos.

Em avaliação da influencia do inibidor de tripsina na absorção de imunoglobulinas em leitões, Jensen; Pedersen (1982) concluíram que a adição de maior quantidade de inibidor ao colostro materno auxiliou no aumento da absorção intestinal das proteínas pelos leitões.

Ainda neste contexto, Sandholm, Honkanen-Buzalski (1979) compararam as concentrações de inibidor de tripsina no colostro de espécies que transferem as imunoglobulinas pela placenta e colostro, bem como das que dependem apenas da transmissão colostrual. Concluíram que o inibidor de tripsina está presente em maior quantidade nas espécies que tem na colostragem o principal meio de transferência de imunoglobulinas.

Para Quigley et al. (1995b) quanto maior a concentração de inibidor de tripsina melhor é a qualidade do colostro, de forma que o uso de inibidores na colostragem de bezerros pode potencializar a proteção das IgG à proteólise. Corroborando com tais conclusões, Carlsson et al. (1980) relataram a absorção reduzida de proteína total, IgG e albumina por leitões alimentados com colostro do qual foi extraído o inibidor de tripsina, indicando relação positiva entre a presença do inibidor de tripsina e aumento na absorção de imunoglobulinas pelos neonatos.

Pelo exposto, além do manejo, da concentração de imunoglobulinas no colostro e do seu fornecimento logo após o parto, o fator referente à degradação das imunoglobulinas pelas enzimas digestivas deve ser considerado e, estudos que indicam diminuição dos danos causados à sua integridade merecem destaques, uma vez que influenciam positivamente na eficiência do processo de transferência de imunidade aos bezerros.

### 3.2. Inibidores de tripsina vegetal

Os inibidores de tripsina estão presentes em muitas famílias de plantas, sendo encontrados em todas as subfamílias *Leguminosae* (*Mimosoideae*, *Caesalpinioideae*, *Papilionoideae* e *Solanaceae*) (BATISTA et al., 1996), como feijão, crotalaria e soja. Os inibidores de tripsina, particularmente da soja, são os mais estudados e conhecidos, representando cerca de 6% das proteínas presentes no grão (BRANDON; BATES; FRIEDMAN, 1993). Ocorrem naturalmente inibidores de tripsina do tipo Kunitz (KTI) (três vezes mais abundante em termos percentuais) e inibidor de tripsina e quimotripsina do tipo Bowman-Birk (BBI) (STAHLHUT; HYMOWITZ, 1983; TANWILSON et al., 1985).

Dentre os vegetais em que estão presentes os inibidores de tripsina, a soja é o mais utilizado na alimentação animal. A presença destas substâncias na soja é uma das causas para ser considerado um alimento que contém fatores antinutricionais (CARVALHO et al., 2002). Uma vez ingeridos se complexam com a tripsina impedindo a degradação das proteínas e, conseqüentemente, a absorção de aminoácidos.

O inibidor de tripsina KTI, mais abundante na soja é uma proteína com peso molecular ao redor de 24.000, termolábil, (FELIX, 2005) e que, segundo Sgarbieri (1996), é composto por 181 resíduos de aminoácidos e duas pontes de dissulfeto. O inibidor se liga à tripsina estequiometricamente, praticamente irreversível e instantânea, formando complexo 1:1, através do centro de ligação presente nos resíduos arginina (63) e isoleucina (64).

Em plantas, encontram-se distribuídos em diversos órgãos e tecidos (paredes celulares, espaços intercelulares, no citossol e em vacúolos) (KAPUR et al., 1989) estando relacionados à regulação do processo de morte celular programada (apoptose), diretamente envolvidos nos processos de defesa de plantas contra o ataque de pragas e/ou patógenos, regulação da fotossíntese (ESTELLE, 2001), regulação da expressão gênica (ADAM, 2000), atuando ainda como proteínas de reserva e reguladores enzimáticos endógenos (PARK et al., 2000; CHEN et al., 2004).

Concentram-se na fração albumina do vegetal, correspondendo a 2,7% da proteína albuminosa do feijão Navy (GOMES et al., 1979) e a 1,69% do feijão Great Norther (RAYAS-DUARTE et al., 1992). Carvalho; Sgarbieri (1997) observaram que a fração albumina do feijão Carioca concentrou 2,3 vezes a atividade dos inibidores de tripsina.

No caso dos inibidores de tripsina presentes na soja, constituem resposta a ataques de pragas e patógenos (ROBY, et al., 1987) afetando o desenvolvimento de insetos lepidópteros e coleópteros (MACEDO et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2002) devido à diminuição da assimilação de nutrientes no intestino dos insetos (RYAN, 1990).

A sua presença no trato intestinal de animais, especialmente monogástricos, causa alterações metabólicas do pâncreas durante o período em que o animal está submetido à ingestão de alimentos que contenham inibidores, pois estes inibem a ação da tripsina, enzima responsável pela digestão de proteínas, levando a um aumento na produção enzimática pelo pâncreas e à hipertrofia e hiperplasia deste órgão (CARVALHO et al., 2002), além de redução da taxa de crescimento (AL-WESALI et al., 1995).

Estudos realizados com porcos da Índia, bezerros, cães e suínos não foi observada hipertrofia pancreática, porém houve perda de peso pelos animais levando a redução do ganho de peso e aumento da secreção das enzimas pancreáticas apenas durante o período de exposição aos inibidores (HASDAI et al., 1989).

A hipertrofia e hiperplasia pancreática ocorrem devido a hipersecreção das enzimas digestivas tripsina, quimotripsina e elastase, as quais são eliminadas nas fezes, ocasionando perda endógena de aminoácidos sulfurados (LIENER, 1994). Por retroalimentação negativa, controlou-se esta hipersecreção de tais enzimas, sendo a quantidade de tripsina presente no intestino inversamente proporcional à secreção enzimática segundo Green; Lyman (1972).

Conforme observado por Quigley et al. (1995a), devido a habilidade dos inibidores de tripsina em reduzir a ação enzimática, a sua introdução ao colostro indica aumento do potencial de proteção das imunoglobulinas contra a digestão, as quais

necessitam serem absorvidas intactas, como macromoléculas, para que desempenhem seu papel de proteção e desenvolvimento do sistema imune do animal.

Estudando a interferência da adição de inibidor de tripsina da soja na melhora da transferência da imunidade passiva em bezerros da raça Jersey, Quigley et al. (1995a) verificaram resultados satisfatórios, sem ter havido qualquer outra modificação na rotina de cuidados com os animais. Carlsson et al. (1980) no estudo com leitões concluíram que houve interferência da presença desta substância na preservação das imunoglobulinas durante a ação das enzimas pancreáticas, principalmente da tripsina, garantindo a absorção intacta das mesmas.

Por ser o inibidor de tripsina termolábil, o tratamento térmico dos grãos tem se mostrado efetivo para a inativação dos inibidores de tripsina, porém estes apresentam alta estabilidade quando aquecidos em sua forma purificada ou parcialmente purificada, como a fração albumina. A complexação com componentes do tecido do grão é que promove a inativação, o que diminui a eficiência do aquecimento de frações protéicas (CARVALHO; SGARBIERI, 1998). Assim, a fração albumina submetida a tratamento térmico foi o procedimento adotado para obtenção de inibidores de tripsina parcialmente purificados por Rayas-Duarte et al. (1992) e Carvalho; Sgarbieri (1998).

Em 2010, o Brasil foi o 5º maior produtor mundial de leite (31.667.600 t.) (EMBRAPA, 2012), demonstrando ser um país com importante representatividade neste setor. Por isso, é imprescindível a busca por soluções que possam otimizar a produção, melhorando a qualidade de vida dos animais e contribuindo com o desenvolvimento do setor.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Local e Material**

O experimento foi realizado em setembro de 2011 na Fazenda Santa Rita – Agrindus, localizada no município de Descalvado – SP. Foram utilizadas 18 bezerras recém-nascidas da raça Holandesa, alimentadas com colostro bovino adicionado de inibidor de tripsina purificado Sigma tipo I-S ou provenientes da fração albumina da soja cultivar BRS 232. Este estudo teve a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – protocolo nº 018957/11 (Anexo 1).

### **4.2. Obtenção da fração albumina da soja**

Os grãos de soja foram moídos em moinho de faca e a farinha integral obtida, mantida em temperatura de -20 °C.

O método utilizado para extração da fração albumina contendo os inibidores de tripsina foi o descrito por Whitaker; Sgarbieri (1981). A farinha integral de soja foi suspensa em solução 0,5 M de NaCl (1:10 p/v), com pH ajustado para 2,5 com HCl a 0,1N, e agitada continuamente por 2 horas, a temperatura ambiente. A suspensão foi então centrifugada a 10.300 xg a 4 °C por 40 minutos, obtendo-se o resíduo (descartado) e o sobrenadante (extrato bruto). Realizou-se diálise contra água destilada a 4 °C por, aproximadamente, 72 horas seguido de centrifugação (10.300 xg a 4 °C por 40 min.), resultando em uma fração insolúvel, constituída por globulinas, e uma fração solúvel, formada pelas albuminas.

A fração albumina foi submetida a tratamento térmico a fim de inativar as hemaglutininas, mantendo a atividade dos inibidores de tripsina (CARVALHO; SGARBIERI, 1997). Para isso, a fração albumina foi aquecida em banho de água fervente por 30 min. e, em seguida, resfriada em banho de gelo, e centrifugada (10.300



xg a 4 °C por 40 min.). A fração coagulada (resíduo) foi descartada e a fração não coagulada pelo calor (sobrenadante) foi liofilizada e utilizada no ensaio com os animais.

#### **4.3. Processamento do colostro**

O colostro foi proveniente de banco de estocagem da própria fazenda, sendo somente utilizado o de primeira ordenha de vacas recém-paridas e com densidade superior a 51 mg.mL<sup>-1</sup> de IgG. Após a ordenha, o colostro foi imediatamente congelado em garrafas plásticas de dois litros e mantido estocado por até um mês antes do uso.

Para a padronização das amostras e concentração de IgG realizou-se o descongelamento de 16 litros de colostro em água a 30 °C, seguido de homogeneização em recipiente de aço inoxidável. O material foi novamente envasado em porções de 1 litro e mantidos congelados a – 20 °C por até uma semana, sendo disponibilizados cinco litros para cada animal. Este procedimento foi repetido por seis vezes, constituindo os “pools” de colostro.

#### **4.4. Manejo dos animais**

Os animais foram selecionados imediatamente após o nascimento, sendo utilizadas somente fêmeas. Os partos ocorreram nas baias de parição, sendo observado o momento exato do nascimento das bezerras e impedido o acesso ao colostro materno. Cerca de meia hora depois de nascidas, as bezerras foram identificadas e alojadas por três dias na maternidade em baias individuais suspensas, localizadas no interior de barracão coberto com telhas de barro e laterais vazadas. Em seguida foram transferidas ao bezerreiro, estruturalmente idêntico à maternidade, onde permaneceram até o desmame com livre acesso à água e concentrado disponibilizados em baldes individualizados, seguindo-se o manejo usual da fazenda.

A distribuição dos 18 animais nos tratamentos ocorreu sequencialmente conforme a ordem de nascimento, com seis animais por tratamento, sendo que cada “pool” de colostro foi igualmente distribuído entre os tratamentos.

#### **4.5. Alimentação**

A alimentação inicial das bezerras ocorreu uma hora após o nascimento, sendo fornecido, uma única vez, um litro de colostro adicionado do inibidor de tripsina momento antes do uso, conforme os tratamentos (T):

T1 - Controle: colostro;

T2 - Colostro com adição de 50 mg inibidor de tripsina purificado;

T3 - Colostro com adição de 1,08 g da fração albumina (contendo inibidores de tripsina) com atividade inibitória 1,5 vezes superior ao T2.

As bezerras (peso médio 42 Kg) foram alimentadas até completarem 24 horas com mais quatro porções de um litro de colostro, totalizando cinco litros para cada animal, quando então passaram a ser alimentadas conforme o manejo adotado pela propriedade.

A quantidade de colostro fornecida seguiu a recomendação de Silva (2002), que considerada satisfatória a ingestão entre 10 a 15% do peso vivo.

#### **4.6. Colheita e preparo das amostras de sangue**

As amostras de sangue foram colhidas por venopunção da jugular, com uso de agulhas 25 x 0,7 mm, em frasco vacuolizados de 10 mL (COSTA et al., 2008), após 1, 12, 24, 36 e 48 h do nascimento, sendo a primeira colheita realizada antes do fornecimento do colostro. O sangue foi centrifugado a 1500 xg a 4 °C por 15 min. (PAIVA et al., 2006), sendo o soro fracionado em tubos de 2 mL (tipo “eppendorf”) devidamente identificados e congelados a -20 °C (KINDLEIN et al., 2007).

#### **4.7. Preparo das amostras de colostro**

As amostras de colostro foram preparadas com a adição de coagulante líquido para queijos (Estrela<sup>®</sup>) na proporção de 5% para o volume total. Em seguida, as

amostras foram colocadas em banho-maria a 37 °C por 20 minutos, para a formação e retração do coágulo, e centrifugadas a 1.500 xg por 15 min. em centrífuga refrigerada.

A fração intermediária da solução trifásica foi aspirada e congelada a -20 °C por até 2 meses, para análises de IgG, GGT e PT.

## **4.8. Análises laboratoriais**

### **4.8.1. Composição centesimal dos grãos de soja**

Os teores de umidade, extrato etéreo, proteína bruta e cinzas foram determinados, em triplicata, nas amostras da farinha dos grãos de soja, conforme as normas da Association of Official Analytical Chemist (AOAC, 2000).

O teor de umidade foi obtido pela secagem das amostras em estufa a 105 °C, até peso constante. O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método semi-micro Kjeldhal, utilizando-se o fator 6,25 para a obtenção do teor de proteína total. A determinação do extrato etéreo foi realizada pela técnica de Soxhlet usando-se éter de petróleo (p.e. 65 °C) como material extrator. O conteúdo de cinzas foi determinado pela incineração em mufla a 550 °C, até peso constante. A porcentagem de carboidratos foi estimada, diminuindo-se de 100% a somatória das porcentagens de umidade, proteína, cinzas e extrato etéreo.

### **4.8.2. Determinação da atividade dos inibidores de tripsina**

A atividade dos inibidores de tripsina do grão de soja, da fração albumina não coagulada pelo calor, do inibidor purificado e do colostro foi determinada utilizando-se o N $\alpha$ -benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) como substrato para a tripsina, conforme o procedimento descrito por Kakade et al. (1969).

Amostras da farinha de grãos de soja e da fração albumina foram submetidas à agitação com solução de HCl 0,025 N, por 60 min. para obtenção do extrato. O inibidor purificado (Sigma) foi diluído na solução extratora e o colostro foi preparado diluindo-se

0,5 mL de amostra em 4,5 mL de água destilada e centrifugação a 9.500 xg a 4 °C por 30 min (SOARES FILHO, 2000). Alíquotas de 1,0 mL dos extratos foram pipetadas em triplicata em tubos de ensaio, e o volume final ajustado para 1,0 mL com tampão Tris 50mM, pH 8,2, contendo CaCl<sub>2</sub> 20 mM. A cada tubo, previamente acondicionado em banho-maria a 37 °C, foi adicionado 1 mL da solução de tripsina (0,11 mg.mL<sup>-1</sup> de HCl 0,001N) e após 10 minutos, 7,0 mL de BAPNA (0,3 mg.mL<sup>-1</sup> de tampão Tris 50 mM, pH 8,2 contendo CaCl<sub>2</sub> 20 mM), previamente aquecidos a 37 °C. A reação foi interrompida após 10 minutos pela adição de 1,0 mL de ácido acético a 30%. A absorvância foi determinada a 410 nm, contra o branco, ao qual foi adicionado o ácido acético antes do BAPNA. Uma Unidade de Tripsina (UT) foi definida como o aumento de 0,01 unidade de absorvância a 410 nm por 100 mL do meio de reação, e os resultados foram expressos como Unidades de Tripsina Inibida (UTI) por miligrama de amostra (UTI.mg<sup>-1</sup> de amostra) para os inibidores de tripsina da soja.

Para o colostro utilizou-se 0,019 como fator de tripsina, que representa a absorvância do produto da atuação de 1µg de tripsina ativa sobre o substrato BAPNA a um comprimento de onda de 410 nm, e os resultados expressos em mg tripsina inibida.mL<sup>-1</sup> de colostro.

#### **4.8.3. Análises do colostro**

As análises de acidez, densidade e gordura foram realizadas, em triplicata, de amostras obtidas do “pool” de colostro, segundo a determinação do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985).

A acidez (determinada pelo método Dornic) e densidade (pela leitura em colostrômetro) foram realizadas imediatamente após o processamento do colostro. Para os teores de gordura (método butirométrico) as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e diluídas 2:1 (leite:água), no Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Departamento de Tecnologia – FCAV/Unesp.

O nitrogênio total (NT) e o N obtido das frações protéicas foram determinados pelo método semi-micro Kjeldahl, utilizando-se a metodologia padronizada pela IDF

(1962) e o fator 6,38 para obtenção dos teores de proteína correspondentes (IDF, 1964).

O teor de nitrogênio não proteico (NNP) foi determinado pela dosagem de nitrogênio no filtrado após a precipitação das proteínas em ácido tricloroacético a 12%. O nitrogênio não caseico (NNC) foi obtido pela dosagem do nitrogênio no filtrado obtido após a precipitação das caseínas com ácido acético 10% e acetato de sódio 1N. O teor de nitrogênio caseico (NC) foi estimado pela diferença entre o nitrogênio total (NT) e NNC. O nitrogênio verdadeiro (NV) foi obtido por diferença entre o NT e NNP. O teor de nitrogênio do soro (NS) correspondeu à diferença entre NV e NC.

As amostras de soro lácteo foram analisadas quanto à concentração de imunoglobulina G (IgG) por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de acordo com o proposto por Laemmli (1970), que permite a quantificação e identificação de diversas frações proteicas (ROCHA, 2010). Após fracionamento, o gel foi corado por 10 min. em solução "coomassie blue" 0,2% e o excesso de corante foi removido com solução de ácido acético 7%, até que as frações proteicas se apresentassem nítidas. As concentrações dessas proteínas foram determinadas em densitômetro computadorizado (Shimadzu<sup>2</sup> CS9301, Tóquio). Como referência utilizou-se uma solução marcadora (Sigma) com diferentes pesos moleculares, além de IgG bovina purificada (Sigma).

Determinou-se a atividade sérica de gamaglutamiltransferase (GGT) no soro lácteo pelo método de Szasz modificado e os teores de proteína total (PT) (método do biureto), utilizando-se reagentes comerciais LABTEST<sup>1</sup> específicos (SILVA et al., 2007). As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro semi-automático (LABQUEST<sup>3</sup>), com luz de comprimento de onda apropriado para cada teste.

---

<sup>1</sup>Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil.

<sup>2</sup>Shimadzu CS9301, Tóquio, Japão

<sup>3</sup>Labquest, Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil

#### **4.8.4. Análises do soro sanguíneo**

As amostras de soro sanguíneo foram analisadas quanto à concentração de imunoglobulina G (IgG) em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e de proteína total (PT), pelo método do biureto, utilizando-se kits enzimáticos LABTEST<sup>1</sup>. A atividade da gamaglutamiltransferase (GGT) foi determinada pelo método de Szasz, modificado por meio de reagentes comerciais LABTEST<sup>1</sup> (SILVA et al., 2007), seguindo-se o procedimento descrito para as amostras de colostro.

#### **4.9. Análise estatística**

Os resultados obtidos para os parâmetros sanguíneos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados com parcelas subdivididas (“split-plot”), considerando-se os efeitos principais dos tratamentos (duas fontes em concentrações diferentes de inibidores de tripsina) e secundários os períodos de colheita do sangue, bem como a interação entre os efeitos principais e período. As análises estatísticas foram executadas através do “software” AgroEstat - Sistema para Análises Estatísticas de Ensaio Agrônomico (BARBOSA; MALDONADO, 2011).

As variáveis IgG e GGT foram submetidas à transformação logarítmica  $\ln(x+1)$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Composição centesimal da soja

Na Tabela 1 constam os valores da composição centesimal dos grãos de soja, e por serem destinados ao consumo humano apresentam altos teores em proteínas (40,43%), extrato etéreo (15,2%) e carboidratos (31,58%), os quais evidenciaram composição similar em relação à determinação realizada por Maia et al.(2006).

**Tabela 1.** Composição centesimal da soja

<b>Nutrientes</b>	<b>%</b>
Umidade	8,34
Extrato etéreo	15,20
Proteína	40,43
Cinzas	4,45
Carboidrato	31,58

### 5.2. Atividade do inibidor de tripsina da soja

Os resultados obtidos para a atividade dos inibidores de tripsina da soja (grão, fração albumina não coagulada e inibidor purificado) estão apresentados na Tabela 2. A atividade do inibidor de tripsina dos grãos de soja ( $151,56 \text{ UTI.mg}^{-1}$  amostra) encontra-se entre os valores obtidos por Carvalho et al. (2002). Na fração albumina os inibidores se apresentaram estáveis ao calor e 2,1 mais ativos ( $324,50 \text{ UTI.mg}^{-1}$ ) do que no grão de soja. Para o inibidor purificado a atividade ( $4.683,30 \text{ UTI.mg}^{-1}$ ) foi 31 vezes mais concentrada em relação ao grão.

A fração albumina das leguminosas corresponde a cerca de 8 a 20 % do total proteico, enquanto que a globulina é a fração majoritária, com 40 a 60% (NEVES et al.,

2006). Apesar de em menor proporção as albuminas são, principalmente, enzimas e proteínas ligadas ao metabolismo celular e contém, praticamente, todos os inibidores de proteases e hemaglutininas (PEARSON, 1983). Inibidores mais ativos na fração albumina de grãos de feijão também foram observados por Wu; Whitaker (1990); Carvalho; Sgarbieri (1997).

**Tabela 2.** Atividade dos inibidores de tripsina (UTI.mg<sup>-1</sup> amostra) da farinha de grãos de soja, da fração albumina não coagulada pelo calor e do inibidor purificado.

<b>Amostras</b>	<b>(UTI.mg<sup>-1</sup> amostra)</b>
Grãos de soja	151,56
Fração albumina não coagulada	324,50
Inibidor purificado (Sigma)	4.683,30

UTI = Unidades de tripsina inibida

Considerando a atividade do inibidor de tripsina purificado, estabeleceu-se a quantidade de 50 mg por animal, com atividade total de 234.165 UTI. Definiu-se que o tratamento coma dição de fração albumina (T3) teria 1,5 vezes mais capacidade de inibição da enzima tripsina que o tratamento com adição do inibidor purificado (T2). Por isso, determinou-se o uso de 1,08 g da fração albumina para cada animal (T3), o que resultou em uma capacidade de inibição da tripsina da ordem de 350.460,00 UTI. Estudo realizado por Quigley et al. (1995b) demonstrou que houve proteção da IgG contra a degradação das enzimas proteolíticas devido a adição de 1g de inibidor comercial a um litro de colostro de vacas da raça Jersey.

### **5.3. Características do colostro**

Os valores de acidez, densidade, gordura e atividade dos inibidores de tripsina para cada “pool” de colostro analisado estão dispostos na Tabela 3.

A acidez do colostro variou de 45 e 57 °D, valor próximo ao determinado por Couto et al. (2010) de 46,5 °D. Porém, os valores apresentam-se mais elevados que os



encontrados para o leite normal (15 a 18 °D), o que pode ser devido à alta concentração de caseína (4,8%) em comparação com o leite normal (2,5%) (FERREIRA, 2011), que por conter aminoácidos com características anfotéricas, agem como ácido na titulação (NADER FILHO et al., 1996).

**Tabela 3.** Médias e desvios-padrão dos valores de acidez (°D), densidade (mg.mL<sup>-1</sup>), gordura (%) e inibidores de tripsina (mg.mL<sup>-1</sup>) de cada “pool” de colostro de vacas da raça Holandesa armazenado sob congelamento.

“Pool” de colostro	Acidez (°D)	Densidade (mg.mL <sup>-1</sup> )	Gordura (%)	Inibidor de tripsina (mg.mL <sup>-1</sup> )
1	46 ± 0,0	71 ± 0,12	3,2 ± 0,4	0,945 ± 0,04
2	56 ± 1,2	75 ± 0,10	3,5 ± 0,5	0,789 ± 0,02
3	52 ± 0,0	70 ± 0,12	5,0 ± 0,4	0,876 ± 0,00
4	57 ± 1,5	72 ± 1,00	5,5 ± 0,4	0,921 ± 0,04
5	45 ± 0,0	82 ± 1,15	6,4 ± 0,4	0,797 ± 0,02
6	54 ± 2,0	75 ± 1,70	7,6 ± 0,3	0,766 ± 0,01

A densidade do colostro, estimada pelo colostrômetro, avalia indiretamente a concentração de IgG, as quais são responsáveis por 69,9 % da variação observada em resultados de análise (FLEENOR; STOTT, 1980). De acordo com a escala do aparelho, os colostros são classificados como: ruim com até 20 mg.mL<sup>-1</sup> de IgG; intermediário variando de 21 a 50 mg.mL<sup>-1</sup> e de alta qualidade, com mais de 51 mg.mL<sup>-1</sup> de IgG, (COELHO; SILPER, 2008; JUNQUEIRA et al. , 2011). Os resultados obtidos para a densidade (70 a 82 mg.mL<sup>-1</sup>), portanto, classificam o colostro como de alta qualidade.

Os teores de gordura variaram de 3,2 a 7,2 % entre os “pools” analisados. Conforme Foley; Otterby (1978) o teor de gordura varia com as ordenhas pós-parto com valor inicial de 6,7% (colostro) a 4,3% na 5ª ordenha (leite de transição). A gordura é um dos componentes mais susceptíveis as variações, podendo estar relacionado à alimentação, condição corporal, idade ao primeiro parto, número de lactação e época

do ano, fatores estes não controlados na obtenção do colostro para compor o banco de estocagem pela propriedade.

O congelamento do colostro não altera a sua composição nutricional (FOLEY; OTTERBY, 1978) e nem ocasiona variações no pH e acidez (CARLSON; MILLER, 1977). No entanto, para ser usado como fonte de imunoglobulina, recomenda-se o armazenamento por um período máximo de um ano (FERREIRA, 2011).

A atividade dos inibidores de tripsina determinadas nos “pools” de colostro variou de 0,766 a 0,945 mg de tripsina inibida.mL<sup>-1</sup>, valor próximo (0,798 mg.mL<sup>-1</sup>) ao obtido por Piñeiro et al. (1978) em colostro de vacas da raça Holandesas, obtido na primeira ordenha pós-parto. Em animais mestiços, holandês-zebu com diferentes composições genéticas, Soares Filho (2000) obteve valor médio de 0,958 mg. mL<sup>-1</sup>. De acordo com Quigley et al. (1995a) o colostro bovino contem 100 vezes a quantidade de inibidor presente no leite.

O perfil proteico do “pool” de colostro utilizado no aleitamento das bezerras está apresentado na Tabela 4.

**Tabela 4.** Perfil proteico (%) dos “pool” de colostro de vacas da raça Holandesa armazenados sob congelamento.

“Pool” colostro	PT	PV	C	PS	NNP
1	14,10	13,83	5,99	7,84	0,27
2	17,18	16,87	7,69	9,18	0,30
3	16,82	16,57	7,17	9,40	0,26
4	16,50	16,20	6,78	9,42	0,29
5	19,52	19,28	10,88	8,40	0,23
6	16,88	16,59	7,15	9,44	0,28

PT = proteína total; PV =proteína verdadeira; C = caseína; PS = proteína do soro; NNP = nitrogênio não proteico.

Foram encontrados valores de 14,10 a 19,52 % para proteína total (PT), 13,83 a 19,28 % para proteína verdadeira (PV), 5,99 a 10,88 para caseína (C), 7,84 a 9,44 %

para proteína do soro (PS), 0,23 a 0,30 % para nitrogênio não proteico (NNP). Foley; Otterby (1978) citaram para o colostro, valores de proteína total e caseína de 14,0 % e 4,8 %, respectivamente, com diminuição das porcentagens conforme as ordenhas pós-parto. Quigley et al. (1995a) obtiveram para o colostro de vacas da raça Jersey concentrações de 22,12 % para proteína verdadeira, 7,39 % para caseína e 0,67 % para NNP. Considerando o leite de vaca as porcentagens são bem inferiores, conforme resultados obtidos por Sancanari (2002) para PV de 2,49 %, caseína 2,11 % e proteínas do soro 0,38 %.

As variações nos teores de proteína observadas entre as amostras de colostro podem estar relacionadas a fatores que afetam a composição do leite, os quais não foram monitorados na obtenção do colostro para compor o banco de estocagem pela propriedade, conforme anteriormente mencionado.

A elevada concentração das imunoglobulinas (IgG e IgA) no soro do colostro é muito importante pois essas são responsáveis por transferir a imunidade passiva ao recém-nascido. As demais proteínas do soro têm a função de desenvolver e maturar os tecidos epiteliais do sistema gastrointestinal, ainda não completamente desenvolvido funcionalmente. Além disso, estimulam a síntese de proteínas sanguíneas e teciduais e por serem altamente digeríveis são rapidamente absorvidas pelo organismo (SGARBIERI, 2004).

As concentrações de IgG e de proteína total ( $\text{g.Dl}^{-1}$ ), e a atividade da enzima gamaglutamiltransferase ( $\text{U.L}^{-1}$ ) no soro lácteo, foram determinadas por testes bioquímicos e seus valores estão expressos na Tabela 5.

A concentração de IgG nos "pools" de colostro variou de de 8,0 a 10,0  $\text{g.dL}^{-1}$ , valor superior ao descrito por Baroza (2007) de 5,36  $\text{g.dL}^{-1}$  no soro lácteo de vacas no dia do parto. Segundo este mesmo autor, as concentrações de IgG apresentam-se elevadas na primeira ordenha (dia do parto) e sofrem declínio no dia seguinte ao parto. Tal fato pode estar relacionado a permeabilidade intestinal do recém-nascido, que é elevada nas primeiras horas de vida e declina após pico de absorção, com cerca de 24 horas pós parto, tornando fundamental a administração do colostro nas primeiras horas de vida do bezerro.

**Tabela 5.** Concentração de imunoglobulina G (IgG) e de proteína total (PT) e atividade de gamaglutamiltransferase (GGT) no soro lácteo de colostro bovino.

“Pool” colostro	IgG (g.dL <sup>-1</sup> )	PT (g.dL <sup>-1</sup> )	GGT (U.L <sup>-1</sup> )
1	8,0	14,00	26.400
2	8,7	17,43	27.540
3	10,0	17,49	34.425
4	9,2	21,15	27.540
5	8,4	25,50	29.835
6	8,8	22,77	36.720

A enzima GGT, assim como a proteína total, está relacionada com a transferência adequada das imunoglobulinas colostrais (FAGLIARI et al., 1996), tendo sido encontrado variação na concentração de GGT de 26.400 a 36.720 U.L<sup>-1</sup> e de 14,00 a 25,50 g.dl<sup>-1</sup> para proteína total. Os valores aproximaram-se dos 25.751 a 29.097 UI.L<sup>-1</sup> para GGT e 15,8 g.dL<sup>-1</sup> para proteína total obtidos por Baroza (2007) e por Franciosi (2010), em secreção láctea de vacas no dia do parto.

#### 5.4. Características do soro sanguíneo

Na Tabela 6 está apresentada a análise estatística e os valores médios obtidos para os parâmetros avaliados no soro sanguíneo.

Os resultados mostraram que os efeitos observados para os tratamentos (T) não afetaram a concentração de IgG, GGT e PT sérica, porém houve efeito das horas de colheita (H). Não foram observadas interações significativas entre os fatores inibidores de tripsina adicionados ao colostro e horas de colheita de sangue, para os parâmetros avaliados.

Quigley (2001) considera que a transferência de imunidade passiva foi realizada de forma adequada quando o bezerro apresentar valor superior a 5,0 g.dL<sup>-1</sup> de proteína

total, o que equivale a cerca de 1 g.dL<sup>-1</sup> de concentração de imunoglobulinas (IgG) no sangue, valores considerados ótimos e equivalentes a colostragem adequada.

**Tabela 6.** Análise de variância (teste F) dos parâmetros do soro sanguíneo de bezerras alimentadas com colostro adicionado de inibidor de tripsina da soja, durante as primeiras 48 horas pós-parto.

Fatores	Valores de F		
	IgG	GGT	PT
Tratamentos (T)	1,00 <sup>NS</sup>	0,27 <sup>NS</sup>	0,92 <sup>NS</sup>
Hora de colheita (H)	160,31 <sup>**</sup>	330,72 <sup>**</sup>	51,71 <sup>**</sup>
Interação T x H	0,77 <sup>NS</sup>	0,92 <sup>NS</sup>	0,70 <sup>NS</sup>

Tratamentos	IgG (g.dL <sup>-1</sup> )*				
	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h
T1	0,69	2,38	3,28	3,16	3,07
T2	0,70	2,39	3,18	3,27	3,23
T3	0,64	2,15	2,71	2,61	2,34
Média	0,68 <sup>c</sup>	2,31 <sup>b</sup>	3,06 <sup>a</sup>	3,01 <sup>a</sup>	2,88 <sup>a</sup>

Tratamentos	GGT (U.L <sup>-1</sup> )*				
	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h
T1	13,83	2.091	2.881	1.989	998
T2	15,16	2.142	3.034	2.639	1.594
T3	16,50	2.116	2.422	1.262	879
Média	15,17 <sup>c</sup>	2.116 <sup>a</sup>	2779 <sup>a</sup>	1.963 <sup>a</sup>	1157 <sup>b</sup>

Tratamentos	PT (g.dL <sup>-1</sup> )				
	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h
T1	4,31	6,79	7,93	7,81	7,58
T2	4,71	6,64	7,65	7,92	7,45
T3	4,28	6,65	7,03	7,07	6,54
Média	4,43 <sup>c</sup>	6,69 <sup>b</sup>	7,54 <sup>a</sup>	7,60 <sup>a</sup>	7,19 <sup>ab</sup>

<sup>NS</sup> – não significativo - <sup>\*\*</sup> significativo a 1%. Médias seguidas de letras diferentes nas linhas indicam diferenças estatísticas pelo teste de Tukey (<0,05). T1 = Controle; T2 = inibidor purificado; T3 = fração albumina não coagulada pelo calor. \*Valores transformados ln (x+1).

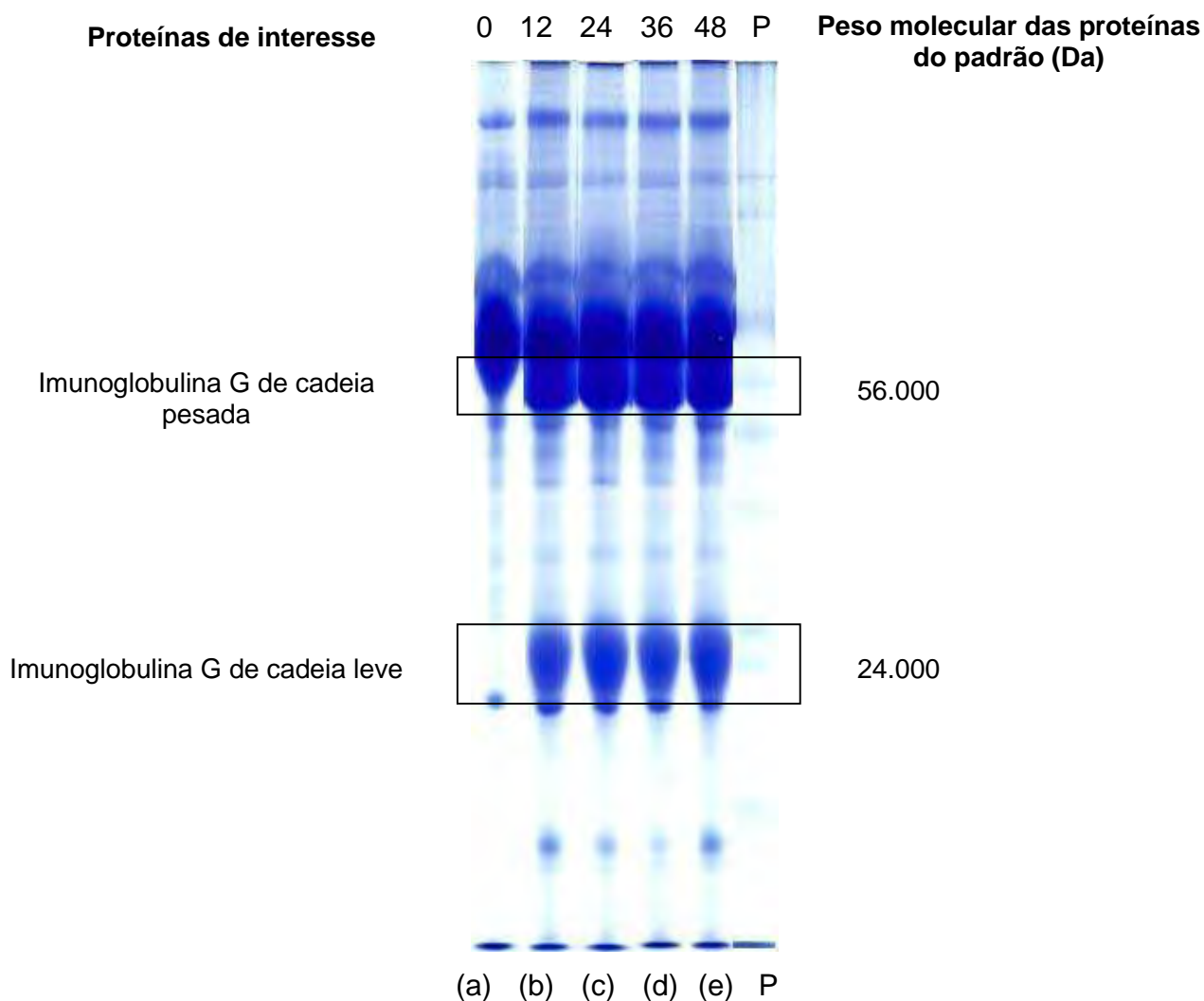
Deste modo, somente antes de os animais ingerirem o colostro ocorreram valores considerados inadequados como esperado, e para os demais as concentrações

de IgG, GGT e PT não diferiram entre os tratamentos, porém com alterações significativas nas medidas repetidas no tempo. Estes resultados demonstraram que o fornecimento de colostro ocorreu no momento adequado após o parto e que a quantidade ingerida foi suficiente, em volume e em concentração de imunoglobulinas. Observação semelhante foi obtida por Franciosi (2010).

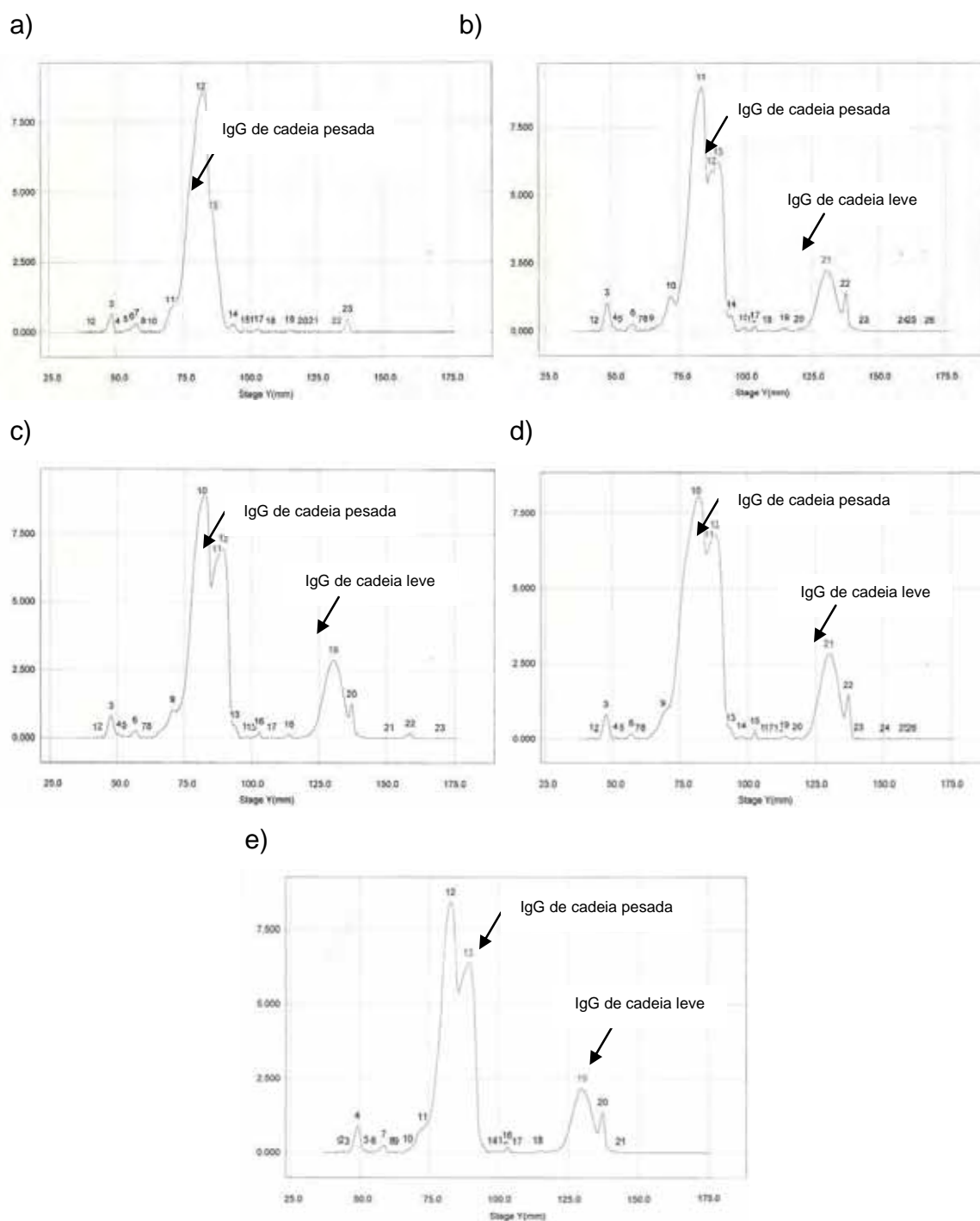
De acordo com Feitosa et al. (2010) considera-se que houve falha na transferência de imunidade passiva quando a concentração de IgG for inferior a  $0,8 \text{ g.dL}^{-1}$ . A atividade da enzima gamaglutamiltransferase indica deficiência na absorção das imunoglobulinas quando observados valores inferiores a  $50 \text{ U.L}^{-1}$ . Para Costa et al. (2007), os teores máximos de proteína total ocorreram na 24<sup>a</sup> hora após o nascimento com valor médio de  $8,1 \text{ g.dL}^{-1}$  sendo que Feitosa et al. (2010) afirmam que bezerros com teores menores de  $4,5 \text{ g.dL}^{-1}$  apresentam alto risco de mortalidade.

O perfil e os traçados eletroforéticos de amostras de sangue de uma bezerra da raça Holandesa, submetida ao tratamento 3 (colostro e fração albumina), estão apresentados nas Figuras 1 e 2, respectivamente, onde é possível observar a distribuição das frações proteicas ao longo dos períodos de colheita de sangue.

Observações de Quigley et al. (1995a) referentes à adição de 1 g de inibidor de tripsina da soja em 1 L de colostro nas duas primeiras alimentações de bezerros da raça Jersey neonatos, revelaram que a absorção de IgG foi melhorada, avaliada pelas maiores concentrações séricas às 12, 24 e 48 h de idade. Porém, o inibidor de tripsina da soja (1,5 g a 3,5 g) não foram tão eficazes como o inibidor colostrado para o aumento na concentração de IgG, uma vez que os incrementos foram apenas de 6 % a 24 %. Atribuíram essas diferenças à reduzida eficiência dos inibidores de tripsina da soja, quando adicionado ao colostro já contendo inibidor de tripsina materno.



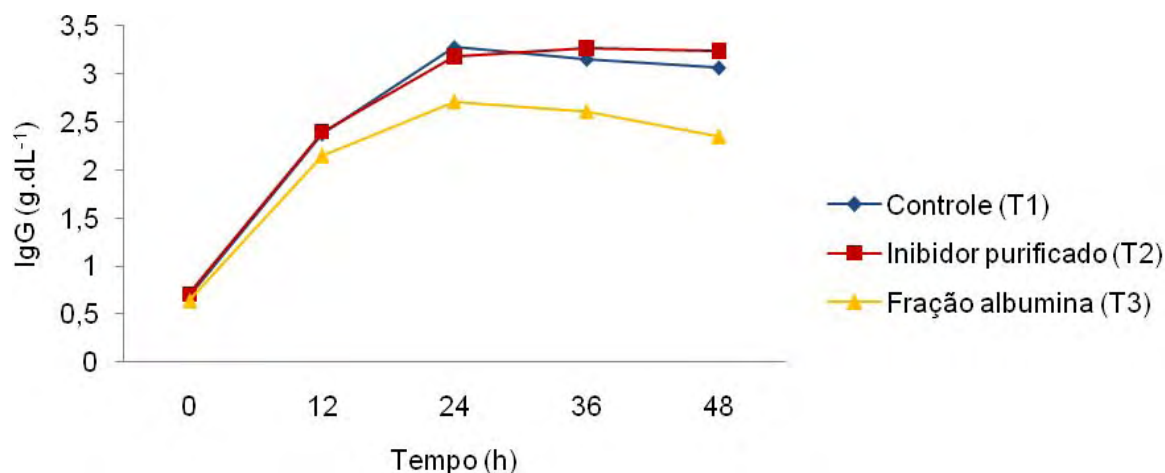
**Figura 1.** Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de amostras de soro sanguíneo de bezerra da raça Holandesa (T3) antes da ingestão de colostro (a) e 12 (b), 24 (c), 36 (d) e 48 horas (e) após a ingestão de colostro e solução marcadora (Sigma) (P).



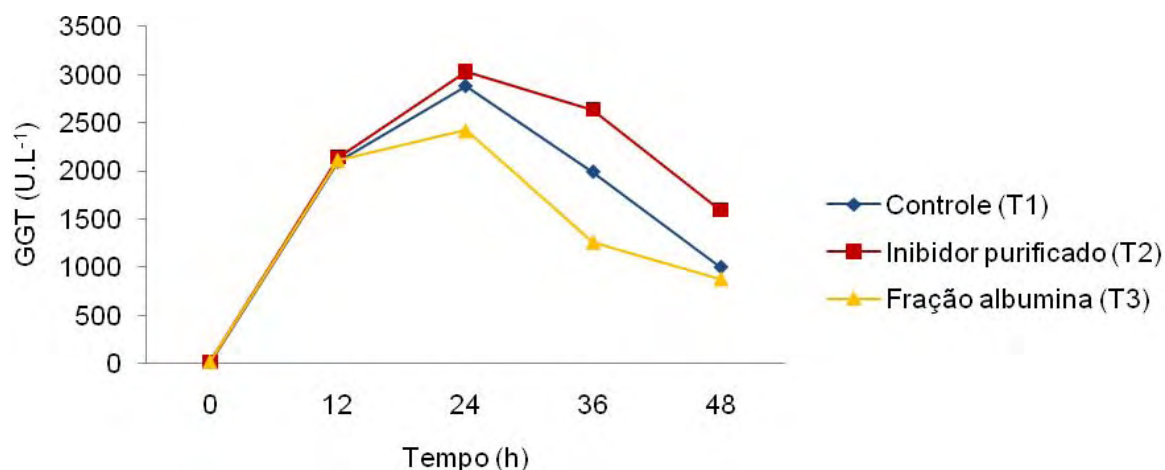
**Figura 2.** Sequencia de traçados eletroforéticos de amostras de soro sanguíneo de bezerra da raça Holandesa (T3) antes da ingestão de colostro (a) e 12 (b), 24 (c), 36 (d) e 48 horas (e) após o nascimento e ingestão de colostro.



As Figuras 3, 4 e 5 representam, respectivamente, as distribuições das concentrações de IgG, GGT e PT do soro sanguíneo durante o período de colheita (48 horas).



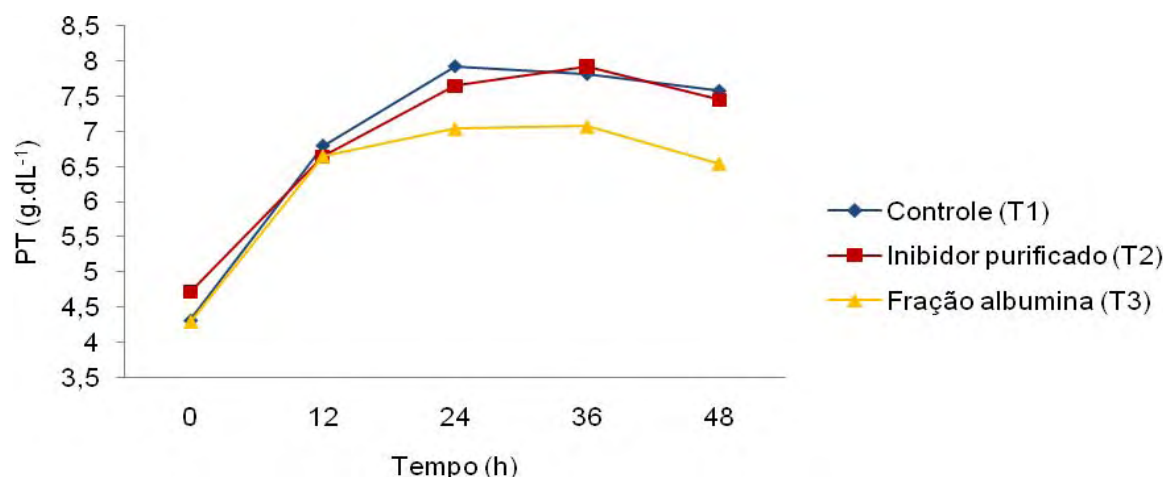
**Figura 3.** Concentrações de IgG (g.dL<sup>-1</sup>) no soro sanguíneo de bezerras alimentadas com colostro adicionado de inibidor de tripsina da soja, durante as primeiras 48 horas pós-parto.



**Figura 4.** Concentrações de GGT (U.L<sup>-1</sup>) no soro sanguíneo de bezerras alimentadas com colostro adicionado de inibidor de tripsina da soja, durante as primeiras 48 horas pós-parto.

Observou-se aumento nas concentrações das substâncias analisadas a partir da primeira colheita (sem fornecimento do colostro) até as 24 h quando houve pico na

absorção de IgG, seguindo de leve declínio devido a queda na capacidade absorptiva do epitélio intestinal dos bezerros (BAROZA, 2007) e, ainda pela meia vida curta da GGT (FAGLIARI et al., 1996), o que porém, não impede o uso de tal análise como método alternativo, rápido e de baixo custo, para avaliação da transferência de imunidade passiva (SILVA et al., 2007).



**Figura 5.** Concentrações proteína total (g.dL<sup>-1</sup>) no soro sanguíneo de bezerras alimentadas com colostro adicionado de inibidor de tripsina da soja, durante as primeiras 48 horas pós-parto.

De acordo com Quigley et al. (1995a), colostro com baixa concentração de IgG também contem menor quantidade de inibidores de tripsina, o que pode reduzir ainda mais a transferência de imunidade passiva em bezerros recém-nascidos. Neste contexto, a adição de inibidor de tripsina da soja pode melhorar a absorção de IgG, e provavelmente proteger outros componentes do sistema imunológico (lisozima, lactoferrina, lactoperoxidase) da degradação proteolítica. Porém, deve ser considerado o custo operacional da inclusão de inibidores de tripsina purificados, o que no presente trabalho foi proposto a obtenção e inclusão da fração albumina obtida em laboratório.

Apesar de não ter havido diferença estatística entre os tratamentos para os parâmetros sanguíneos avaliados foi possível observar a menor absorção de IgG, GGT e PT para os animais submetidos ao tratamento 3 (adição da fração albumina), o que pode ser considerado um fator biológico inerente aos animais, uma vez que esses

foram escolhidos aleatoriamente e mantidos sobre as mesmas condições climáticas, ambientais e de manejo em relação aos demais.

A partir da observação do quadro clínico e acompanhamento do desenvolvimento das bezerras até o desmame, constatou-se menor incidência de diarreia e hipertemia nos animais do tratamento controle, não tendo sido registrado nenhum óbito até o desmame.

Deve-se considerar que a alimentação diferenciada dos animais somente ocorreu no primeiro alimento fornecido, seguindo-se o mesmo manejo alimentar para todos os animais até o desmame. A função dos inibidores é proteger a imunoglobulina contra o ataque da enzima digestiva tripsina, o que disponibiliza maior concentração para ser absorvida. Porém, apesar das quantidades de inibidores adicionadas não terem interferido significativamente, as quantidades absorvidas de IgG foram suficientes para prevenir a diarreia nos primeiros dias, uma vez que até o 10<sup>o</sup> dia não foi registrado qualquer ocorrência.

## **6. CONCLUSÕES**

Nas condições em que o trabalho foi desenvolvido permite-se concluir que a transferência de imunidade passiva às bezerras ocorreu de maneira adequada e que a adição dos inibidores de tripsina da soja ao colostro, não interferiu nos parâmetros séricos analisados. Tal fato provavelmente se deve a qualidade do colostro utilizado e a elevada atividade dos inibidores de tripsina nele naturalmente presente.

## 7. IMPLICAÇÕES

A importância dos inibidores de tripsina na transferência de imunidade passiva aos neo-natos se dá pela manutenção da integridade das imunoglobulinas, uma vez que impede a ação das enzimas pancreáticas sobre as proteínas do colostro.

O colostro de primeira ordenha contém naturalmente inibidores ativos e estes são responsáveis pela diminuição dos danos causados às imunoglobulinas, porém a atividade é diminuída com as ordenhas. Por serem escassos os trabalhos na área, para novos estudos propõe-se a adição de inibidores de tripsina em colostro com menor concentração de imunoglobulina, o que pode ser capaz de protegê-la da degradação e promover expressiva melhora no desenvolvimento do sistema imune.

Outra situação a ser considerada é que a adição de inibidores de tripsina deve acontecer no volume total de colostro a ser fornecido ao bezerro nas primeiras 24 horas após o nascimento, e não somente na primeira hora de vida, uma vez que se adicionado ao volume total pode melhorar a absorção das imunoglobulinas.

A quantidade de inibidores de tripsina isolados de leguminosas em laboratório ou comercialmente purificados, também pode interferir na resposta imunológica, porém deve ser levando em conta o custo da obtenção dos inibidores purificados. Uma alternativa a ser avaliada é a utilização de inibidor de tripsina proveniente de extrato hidrossolúvel (“leite”) de soja, por ser de fácil preparo e praticamente sem ônus para a obtenção. Neste caso, deve-se considerar a capacidade de ingestão de líquido pelo animal, substituindo apenas parcialmente o colostro pelo “leite” de soja a fim de não diluir a concentração de IgG e levando em conta a necessidade de fornecer de 10 a 15 % do peso vivo dos animais sob a forma de colostro.

## 8. REFERÊNCIAS

ABBAS A. K., LICHTMAN A. H., POBER, J. S. **General properties of immune response:** cellular and molecular immunology. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Abbas, AK; 1997. p. 4-33.

ADAM, Z. Chloroplas Proteases: possible regulators of gene expression? **Biochimie**, Paris, v. 82, n. 6-7, p. 647-654, jun. 2000.

AL-WESALI, M.; LAMBERT, N.; WELHAM, T.; DOMONEY, C. The influence of pea seed trypsin inhibitors on the *in vitro* digestibility of casein. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 68, n. 4, p. 431-437, 1995.

ANDERSON-HAFERMANN, J. C.; ZHANG, Y.; PARSONS, C. M. Effect of heating on nutritional quality of conventional and kunitz trypsin inhibitor-free soybeans. **Poultry Science**, Champaign, v. 71, n. 10, p. 1700-1709, 1992.

ANDREWS, A. H.; BLOWEY, R. W.; EDDY, R. G. Medicina Bovina: doenças e criação de bovinos. In. SCOTT, P. R. et al. **Diarreia dos Bezerros**. São Paulo: Roca, 2008. Cap. 14, p. 162-188.

ANDREWS, A. H.; LYONS, T. P. Colostrum-part of nature's survival kit. Biotechnology in the feed industry. In: SYMPOSIUM OF ALTECH, 6. Nicholasville. **Proceedings...** Nicholasville: Altech Technical Publication, p.277-293, 1990.

ANDRIGUETTO, J. M. et al. Digestão: Processos Gerais e Particularidades por Espécie Animal. In.\_\_\_\_**Nutrição Animal**. São Paulo: Nobel, 2002. v. 1. cap. 3, p. 41-63.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official Methods of Analysis, 17<sup>th</sup> ed. Gaithersburg, MD. 2000.

BANKS, K. L.; McGUIRE, T. C. Neonatal immunology. **Veterinary clinical immunology**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1989. 193 p.

BARBOSA, J. C.; MALDONADO JR, W. AgroEstat - Sistema para Análises Estatísticas de Ensaio Agrônomicos. Versão 1.1.0.695, 2011.

BAROZA, P. F. J. **Proteínas, enzimas e minerais na secreção láctea de cabras e vacas, nos primeiros 30 dias pós-parto, congelada ou não**. 2007. 90f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2007.

BATISTA, I. F. C. et al. Primary structure of a kunitz-type trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisliquum* seeds. **Phytochemistry**, Oxford, v. 41, n. 4, p. 1017-1022, 1996.

BENESI, F. J. Síndrome diarreia dos bezerros. **Revista CRMV-ES**, Vitória, v. 2, n. 3, p. 10-13, 1999.

BESSI, R. Estudo da absorção de anticorpos do colostro em bezerros recém-nascidos. Tese de doutorado em Agronomia. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo. Piracicaba – SP. 2001.

BORGES, A. S. et al. Influência da forma de administração e da quantidade fornecida de colostro sobre a concentração de proteína total e de suas frações eletroforéticas no soro sanguíneo de bezerros da raça Holandesa. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, Belo Horizonte. v. 53, n. 5, 2001. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352001000500020](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352001000500020)>. Acessado em: 21/04/2010.

BORGES, A. S. **Avaliação da eficácia da administração de plasma, por via intravenosa, como tratamento da falência de transferência de imunidade passiva em bezerros da raça Holandesa**. 1997. 84 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Pirassununga-SP. 1997.

BRANDON, D. L.; BATES, A. H.; FRIEDMAN, M. Antigenicity of soybean protease inhibitors. In: TROLL, W.; KENNEDY, A. R. (Ed.). **Proteinase inhibitors as cancer chemopreventive agents**. New York: Plenum, 1993. p. 107-129.

CARLSON, S. M. A.; MULLER, L. D. Compositional and metabolic evaluation of colostrum preserved by four methods during warm ambient temperature. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 60, p. 566 - 571, 1997.

CARLSSON, L. C. T; WESTRIJM, B. R.; KARLSSON, B. W. Intestinal absorption of proteins by the neonatal piglet fed on sow's colostrum with either natural or experimentally eliminated trypsin-inhibiting activity. **Biol. Neonate**, v. 38, n.5 - 6, p. 309-314, 1980.

CARVALHO, M. R. B.; KIRSCHNIK, P. G.; PAIVA, K. C.; AIURA, F. S. Avaliação da atividade dos inibidores de tripsina após digestão enzimática em grãos de soja tratados termicamente. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 15, n. 3, p. 267-272, 2002.

CARVALHO, M. R. B.; SGARBIERI, V. C. Heat treatment and inactivation of trypsin-chymotrypsin inhibitors and lectins from beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **J. Food Biochem**, Westport, v. 21, n. 3, p. 219-233, 1997.

CARVALHO, M. R. B.; SGARBIERI, V. Relative importance of phytohemagglutinin (lectin) and trypsin-chymotrypsin inhibitor on bean (*Phaseolus vulgaris* L) protein absorption and utilization by the rat. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, v. 44, n. 5, p. 685-696. 1998.

CHEN, T. E.; HUANG, D. J.; LIN, Y. H. Isolation and characterization of a serine proteinase from the storage roots of sweet potato (*Ipomea batatas* [L.] Lam). **Plant Science**, Shannon, v. 166, n. 4, p. 1019-1026, apr. 2004.

COELHO, S. G. Criação de Bezerros. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE BUIATRIA, 2. 2005, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Associação de Buiatria de Minas Gerais, 2005.

COELHO, S. G.; SILPER, B. F. Conheça as necessidades de fornecimento de colostro de acordo com a qualidade e com as diferentes raças. **Colostro: quanto fornecer aos seus bezerros?** Recursos Humanos no Agronegócio. ReHAgro. 9 dez. 2008. Artigo técnico. Disponível em < <http://www.rehagro.com.br/plus/modulos/noticias/ler.php?cdnoticia=1811>>. Acessado em: 20/10/2010.

COSTA, D. W.; CASTRO, M. E. F.; HARTMANN, W.; BENESI, F. J. Proteína total, proteinograma eletroforético e gama-glutamyltransferase de bezerras com 30 horas de vida no município de Campo Largo, Paraná. **Ver. Acad.**, Curitiba-PR, v. 5, n. 3, p. 295-301, jul./set. 2007.

COSTA, J. N. et al. Influência do desenvolvimento etário e da suplementação com vitamina E (acetato de DL-alfa-tocoferol) no metabolismo oxidativo dos neutrófilos de bovinos da raça Holandesa (*Bos taurus*). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v. 41, n. 5, p. 293-298, 2008. ISSN 1413-9596. 2008. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/bjvras/v41n5/25252.pdf>>. Acessado em: 17/04/2010.

COUTO, S. V.; FREITAS, D. Z.; SAALFELD, M. H.; GANDRA, E. A.; GULARTE, M. A. Avaliação da Acidez e pH de Colostro in Natura e de Silagem de Colostro. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 19; ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 12. 2010, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2010.



EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Produção - Gado de Leite. Disponível em: [www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/.../producao/producao.php](http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/.../producao/producao.php). Acesso em fevereiro de 2012.

ESTELLE, M. Proteases an cellular regulation in plants. **Curr. Opin. Plant Biol.**, London, v. 4, n. 3, p. 252-260, jun. 2001.

FAGLIARI, J. J. et al. Relação entre o nível sérico de gamaglobulinas e as atividades de gamaglutamiltransferase, fosfatase alcalina e aspartato aminotransferase de bezerros recém-nascidos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 48, n. 2, p. 105-112, 1996.

FEITOSA, F. L. F. et al. Índices de falhas de transferência de imunidade passiva (FTIP) em bezerros holandeses e nelores, às 24 e 48 horas de vida: valores de proteína total, gamaglobulina, de imunoglobulina G e da atividade sérica de gamaglutamiltransferase, para o diagnóstico de FTIP. **Pesq. Vet. Bras.** v. 30, n. 8, p. 696-704, ago. 2010.

FELIX, M. A. **Análise química e sensorial dos grãos de soja (*Glycine Max. (L.) Merril*) tostados por diferentes tratamentos.** 2005. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Universidade Estadual Paulista. Piracicaba - SP. 2005.

FERREIRA, L. S. **Silagem de colostro: caracterização do perfil de fermentação anaeróbica e desempenho de bezerros leiteiros.** 2011. 163 f. Tese (Doutorado Ciências) – Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Universidade Estadual Paulista. Piracicaba - SP. 2011.

FLEENOR, W. A.; STOTT, G. H. Hydrometer test for estimation of immunoglobulin concentration in bovine colostrum. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 63, n. 6, p. 973-977, Jun. 1980.

FOLEY, J. A.; OTTERBY, D. E. J. DAIRY SCI. Availability, storage, treatment, composition, and feeding value of surplus colostrums: a review. **Journal of Dair Science**, New York, v. 61, n. 8, p.1033-1060, 1978.

FONTANELI, R. E.; FONTANELI, R. Cadeia forrageira para a produção de leite no Rio Grande do Sul. In: FONTANELI, R. E; DÜRR, J. W.; FONTANELI, R. (Ed.) **Sistemas de produção de leite.** Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2000. p. 59-85.

FRANCIOSI, C. **Hemograma e perfil bioquímico de bezerros neonatos da raça Holandesa tratados com ferro suplementar**. 2010. 102 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal – SP, 2010.

GAY, C. C.; BESSER, T. E. Colostrum and feeding management of dairy calf during the first two days of life. In: NAYLOR, J. M., RALSTON, S. L. (Ed.). **Large animal clinical nutrition**. St. Louis: Mosby Year Book, 1991. p. 243-247.

GOMES, J. C.; KOCH, U.; BRUNNER, J. R. Isolation of a trypsin inhibitor from navy beans by affinity chromatography. **Cereal Chem.**, East Lansing, v. 56, n. 6, p. 525-529, 1979.

GREEN, G. M.; LYMAN, R. L. Feedback regulation of pancreatic enzyme secretion as a mechanism for trypsin-induced hypersecretion in the rat. **The Proceedings of the society for experimental biology and medicine**, Maywood, n. 140, p. 6, 1972.

GUY, M. A. et al. Regulation of colostrums formation in beef and dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 10, p. 3002-3007, 1994.

HASDAI, A.; NITSAN, Z.; VOLCANI, R. Growth, digestibility, and enzyme activities in the pancreas and intestines of guinea-pigs fed on raw and heated soya-bean flour. **Brit. J. Nutr.**, Cambridge, v. 62, n. 3, p. 529-537, 1989.

HONKANEN-BUZALSKI, T.; SANDHOLM, M. Trypsin-inhibitors in mastitic milk and colostrums: correlation between trypsin-inhibitor capacity, bovine serum albumin and somatic cell contents. **Journal of Dairy Research**, New York, v. 48, n. 2, p. 213-233, 1981.

HOUSE, J. A. Economic impact of rotavirus and other neonatal disease agents of animals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 173, p. 118-124, 1978.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Determination of the total nitrogen content of milk by the Kjeldahl method. International **Standard FIL-IDF 20**. 1962.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Determination of the water content of dried milk. International **Standard FIL-IDF 26**. 1964.

**Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos.** 3<sup>ed</sup>. São Paulo: Instituto Adolf Lutz, 1985. v. 1.

JENSEN, P. T.; PEDERSEN, K. B. The influence of sow colostrum trypsin inhibitor on the immunoglobulin absorption in newborn piglets. **Acta Vet. Scand.** London, v. 23, n. 161. 1982.

JUNQUEIRA, J. R. C. et al. Associação entre a densidade do colostro e a transferência de imunidade passiva em bezerros neonatos nascidos de fêmeas multíparas. **Colloquium Agrariae**, v. 7, p. 214 - 220, jul. /dez. 2011. Especial.

KAKADE, M. L.; SIMONS, N.; LIENER, I. E. An evaluation of natural vs. Synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. **Cereal Chem.** St. Paul, v. 46, p. 518-526, 1969.

KAUP, F. J.; DORMMER, W.; JPCHIMS, K. et al. Ultra structure of pre-and postcolostral enterocytes of the newborn calf. **Anatomia Histologia Embriologia**, Berlin, v. 25, n. 4, p. 249 - 255, 1996.

KAPUR, R.; TAN-WILSON, A. L.; WILSON, K. A. Isolation and partial characterization of a subtilisin inhibitor from the mung bean (*Vigna-radiata*). **Plant Physiology**, Rockville, v. 91, n. 1, p. 106 - 112, Sep. 1989

KINDLEIN, L. et al. Efeito do fornecimento adicional de colostro sobre as concentrações séricas de IgG, PT e IGF-I de bezerros neonatos. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, Salvador, v. 8, n. 4, p. 375 - 385. 2007

KRUSE, P. E. The importance of colostral immunoglobulin and their absorption from the intestine of the newborn animals. **An. Rech. Veter.**, v. 14, p. 349-53, 1983.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680 - 685, 1970.

LIENER, I. E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 34, n. 1, p. 31-67, 1994.

MACEDO, M. L. R. et al. Effect of a Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds on the development of *Callosobruchus maculatus*. **Plant Physiol. Biochem.** v. 40, p. 891-898. 2002.

MAIA, M. J. L.; ROSSI, E. A.; CARVALHO, M. R. B. Quality and yield of the soymilk of the production unit of soy derivatives - UNISOJA – Faculdade de Ciências Farmaceuticas, Araraquara, Universidade Estadual Paulista. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 17, n.1, p.65 - 72, jan./mar. 2006.

MARCHESAN, I. Q. Avaliação e terapia dos problemas da respiração. In:\_\_\_\_\_ **Fundamentos em Fonoaudiologia – Aspectos clínicos da Motricidade Oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p. 23-36

MORAES, M. P. et al. Evolução da imunidade passiva em fêmeas bovinas da raça Holandesa. **Cienc. Rural**, v. 27, n. 3, 1997. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v27n3/a12v27n3.pdf>. Acessado em: 26/04/2010

MOTA, R. A. et al. Eficácia do Nuflor no tratamento de diarreias em bezerros e leitões. **Hora Vet.**, Porto Alegre, v. 118, p. 21-24, 2000.

NADER FILHO, A. et al. Variação das características físico-químicas do leite de búfala, durante os diferentes meses do período de lactação. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 12, n. 2, p. 148-153,1996.

NEVES, V. A.; SILVA Jr, S. I.; SILVA, M. A. Isolamento da globulina majoritária, digestibilidade *in vivo* e *in vitro* das proteínas do tremoço-doce (*lupinus albus l.*), var. Multolupa. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 832 - 840, out.-dez. 2006.

NOCEK, J. E.; BRAUND, D. G.; WARNER, R. G. Influence of neonatal colostrum administration, immunoglobulin, and continued feeding of colostrum on calf gain, health and serum protein. **J. Dairy Sci.**, New York, v. 67, n. 2, p. 319 - 333, 1984.

OLIVEIRA, A. S. et al. Acitivity toward Bruchid pest of a Kunitz-Typ inhibitor from seeds of the Algaroba tree (*Prosopis juliflora* d.c.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Maryland Heigths, n. 72, p. 122 - 132. 2002.

PAIVA, F. A. et al. Efeito do manejo de fornecimento de colostro na imunidade passiva, cortisol e metabólitos plasmáticos de bezerros Holandeses. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 58, n. 5, p. 739 - 743. 2006.

PARK, K. S. et al. A novel proteinase inhibitor gene transiently induced by Tobacco mosaic virus infection. **Biophys. et Biochim. Acta**. Amsterdam. 1942. p. 509 - 512. 2000.

PEARSON, A. M. Soy proteins. In: HUDSON, B. J. F. **Developments in food proteins - 2**. London: Applied Science Publishers, 1983. v. 1.

PERINO, L. J. A guide to colostrum management in beef cows and calves. **Vet. Med.**, v. 92, p. 75 - 82, 1997.

PIÑEIRO, A.; BROCK, J. H.; ESPERANZA, I. Isolation and properties of bovine colostrum trypsin inhibitor. **Annales de Recherche Vétérinaire**, v. 9, n. 2, p. 281 - 286, 1978.

QUIGLEY, J. **Using a refractometer**. Calf notes, v. 39, 2001. Disponível em: <[www.calfnotes.com](http://www.calfnotes.com)>. Acessado em: 18/08/2011.

QUIGLEY, J. D.; MARTIN, K. R.; DOWLEN, H. H. Concentrations of trypsin inhibitor and immunoglobulins in colostrum of jersey cows. **J. Dairy Sci.**, New York, v. 78, p. 1573 - 1577, 1995a.

QUIGLEY, J. D. et al. Addition of soybean trypsin inhibitor to bovine colostrum: effects on serum immunoglobulin concentrations in jersey calves. **J. Dairy Sci.**, New York, v. 78, n. 4, p. 886 - 892. 1995b.

RADOSTITS, O. M. et al. **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle sheep, pigs, goats and horses**. 9<sup>th</sup>. ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 2007.

RAYAS-DUARTE, P.; BERGERON, D.; NIELSEN, S.S. Screening of heat-stable trypsin inhibitor in dry beans and their partial purification from great Northern beans (*Phaseolus vulgaris*) using anhydrotrypsin sepharose affinity chromatography. **J. Agric. Food Chem.**, v. 40, n. 1, p. 32 - 42, 1992.

RECK, M. V. M. **Diarreia neonatal bovina**. 2009. 36 f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, 2009.

RIET-CORREA, F. et al. Doenças de Ruminantes e Equínos. In: SCHUCH, L. F. D. **Diarreia dos Bezerros**. São Paulo: Livraria. Varela, 2001. v. I. p. 408 - 420.

ROBY, D.; TOPPAN, A.; ESQUERRE-TUGAYE, M. T. Cell surfaces in plant-microorganism interactions. VII. Increased proteinase inhibitor activity in melon plants in response to infection by *Colletotrichum lagenarium* or to treatment with an elicitor fraction of this fungus. **Mol. Plant Physiol.** v. 30. p. 453 - 460. 1987.

ROCHA, T. G. Avaliação da transferência de imunidade passiva em bezerros de vacas da raça Canchim. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

RYAN, C. A. Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annu. Rev. Phytopathol.** v. 28, p. 425 - 449. 1990.

SANCANARI, J. B. D. **Produção e composição do leite de vacas Holandesa alimentadas com diferentes níveis de proteína suplementadas com metionina.** 2002. 161 f. Dissertação (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

SANDHOLM, M.; T. HONKANEN-BUZALSKI. Colostral trypsin-inhibitor capacity in different animal species. **Acta Vet. Scand.**, Vanloese, v. 20, p. 469 - 474. 1979.

SANT'ANA, V. A. C.; BIRGEL, E. H. Obtenção de soro lácteo para fracionamento das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida. In: Congresso LATINOAMERICANO DE BUIATRIA, 2. 2005. Salvador. **Anais...** Salvador, 2005.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos proteicos: propriedades-degradações-modificações.** São Paulo: Varela; 1996. 517p.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Rev. Nutr.**, v. 17, n. 4, p. 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rn/v17n4/22889.pdf>>. Acessado em: 20/02/2010.

SILVA, S. L. et al. Avaliação da imunidade passiva em caprinos recém-nascidos alimentados com colostro de cabras ou colostro de vacas. **Ars veterinaria**, Jaboticabal, SP, v. 23, n. 2, p. 081 - 088, 2007.

SILVA, R. W. S. M. **Importância do Correto Fornecimento do Colostro na Sobrevivência dos Terneiros Leiteiros.** Comunicado Técnico. 51. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Bagé, RS. 2002. ISSN 0100-8919

SILVA, J. A. R. **Avaliação do estresse térmico em búfalas Murrah criadas em dois diferentes sistemas de manejo nas condições climáticas da amazônia oriental.** Tese. Disponível em: <[http://www.zootecnia.ufc.br/cariboost\\_files/tese2010\\_jamile\\_20andrea\\_20rodrigues\\_20da\\_20silva.pdf](http://www.zootecnia.ufc.br/cariboost_files/tese2010_jamile_20andrea_20rodrigues_20da_20silva.pdf)>. Acessado em: 19/10/2010.

SMEATON, T. C.; SIMPSON, M. W. Epithelial cell renewal and antibody transfer in the intestine of the fetal and neonatal lamb. **Austr. J. Experim. Biol. Sci.**, v. 63, n. 1, p. 41 - 51, 1985.

SOARES FILHO, P. M. **Determinações de imunoglobulinas G, inibidores de tripsina e lactoferrina em colostros de vacas mestiças Holandês-Zebu.** 2000. 60 f. Mestrado em Medicina Veterinária – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

STAHLHUT, R. W.; HYMOWITZ, T. Variation in the low molecular weight proteinase inhibitors of soybeans. **Crop Science**, Madison, v. 23, p. 766 - 769, 1983.

TAN-WILSON, A. L. et al. Bowman- Birk proteinase isoinhibitors complements of soybean strains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, n. 33, p. 389 - 393, 1985.

TIZARD, I. R. **Veterinary Immunology. An. Introduction.** 7 ed. London: Saunders Company, 2003. 482 p.

TIZARD, I. R. **Veterinary Immunology: An introduction.** 6 ed. London: Saunders Company, 2002. 482 p.

WHITAKER, J. R.; SGARBIERI, V. C. Purification and composition of the trypsin – chymotrypsin inhibitors of *Phaseolus vulgaris* L. var. Rosinha G2. **J. Food Biochem.**, v. 5, p. 197-213, 1981.

ZANETTI, M. A.; LUCCI, C. S.; LOBO, R. B. Duração do período de absorção de imunoglobulinas do colostro por bezerros recém-nascidos. **Rev. Soc. Bras. Zootec.**, Viçosa, v. 11, p. 612-622, 1982.

WU, C.; WHITAKER, J. R. Purification and partial characterization of four trypsin/chymotrypsin inhibitors from red Kidney beans (*Phaseolus vulgaris*, var. Linden). **Journal of Agriculture an Food Chemistry**, Washington, v. 38, n. 7, p. 1523 - 1529. 1990.