EDUARDO CUELAR ORLANDI CASSIANO

Avaliação de anticorpos policlonais em bovinos adaptados ou não à dietas com alta proporção de carboidratos prontamente fermentescíveis após indução à acidose

PIRASSUNUNGA

2012

Eduardo Cuelar Orlandi Cassiano

Avaliação de anticorpos policlonais em bovinos adaptados ou não à dietas com alta proporção de carboidratos prontamente fermentescíveis após indução à acidose

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de Concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza
Rodrigues

Pirassununga

2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2680
FMVZ

Cassiano, Eduardo Cuelar Orlandi

Avaliação de anticorpos policlonais em bovinos adaptados ou não à dietas com alta proporção de carboidratos prontamente fermentescíveis após indução à acidose / Eduardo Cuelar Orlandi Cassiano. -- 2012.
69 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientadora: Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues.

1. Fermentação ruminal. 2. Haptoglobina. 3. Microbiologia ruminal. 4. Rúmen. 5. Ruminante. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do preparado de anticorpos policlonais em bovinos adaptados ou não a dietas com alta proporção de concentrados", protocolado sob o nº 1982/2010, utilizando 6 (seis) bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 11/08/2010.

We certify that the Research "Evaluation of the polyclonal antibody preparation in cattle adapted or not to the diets with a high proportion of concentrate", protocol number 1982/2010, utilizing 6 (six) bovines, under the responsibility Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 08/11/2010.

São Paulo, 12 de agosto de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
Fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Cassiano, Eduardo Cuelar Orlandi

Título: Avaliação de anticorpos policlonais em bovinos adaptados ou não à dietas com alta proporção de carboidratos prontamente fermentescíveis após indução à acidose

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Agradecimentos

Agradeço a minha mãe e meu pai que sempre me apoiaram e me ensinaram a crescer como ser humano e como profissional.

A minha irmã que sempre esteve ao meu lado, e a toda minha família que sempre me serviu de exemplo.

Agradeço ao meu orientador Professor Paulo Henrique Mazza Rodrigues, que confiou em mim, me aceitando como orientado mesmo sem me conhecer, me permitindo ter uma grande experiência que foi o mestrado.

À Carolina não tenho palavras para dizer o quanto sou grato por toda a ajuda e ensinamento, foi como uma irmã mais velha, me colocando sempre no rumo certo.

À Fernanda que fez muita falta após sua saída, e contribuiu muito para a minha formação pessoal e profissional.

Gilmar muito obrigado por toda ajuda durante o experimento e cuidados aos animais. Sem esse carinho que o senhor tem aos animais com certeza seria muito mais difícil o manuseio durante os dias de coletas.

Meus agradecimentos também aos meus amigos tanto de graduação como de mestrado que foram muito importantes na minha formação, tanto como pessoa como profissional.

Agradeço a todos os professores do Departamento de Nutrição Animal da FMVZ USP, por ter me aceitado no programa de pós graduação e contribuído para minha formação, o que eu aprendi com vocês carregarei pelo resto da vida e sou grato por isto, obrigado.

Agradeço também aos meus professores da graduação, na FMVZ/UNESP-Botucatu, que foram responsáveis pela minha formação.

Aos animais Lalá, Azeitona, Vermelhinha, 640, Pipoca e Jacira, o meu muito obrigado por vocês existirem, e terem sido muito compreensivas, apesar de terem passado muito bem, né?

Agradeço também a todos funcionários do VNP, ao secretário João Paulo que sempre foi muito prestativo, as meninas da limpeza que sempre deixavam o ambiente limpo e agradável para trabalhar.

Muito obrigado a todos.

RESUMO

CASSIANO, E. C. O. **Avaliação de anticorpos policlonais em bovinos adaptados ou não à dietas com alta proporção de carboidratos prontamente fermentescíveis após indução à acidose.** [Evaluation of polyclonal antibodies in cattle adapted or not to diets with a high proportion of readily fermentable carbohydrates after induction of acidosis]. 2012. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de um preparado de anticorpos policlonais (PAP) contra bactérias ruminais específicas, *Streptococcus bovis* e *Fusobacterium necrophorum*, em parâmetros ruminais da fermentação, em vacas canuladas, adaptadas ou não a uma dieta de alta proporção de carboidratos prontamente fermentescíveis, após indução à acidose. O delineamento experimental utilizado foi o quadrado latino 3X3 replicado em arranjo fatorial de tratamentos 3X2, sendo 2 aditivos alimentares (PAP na apresentação em pó - PAPP e PAP na apresentação líquida - PAPL) mais um grupo controle (CON) e dois manejos de adaptação à dieta, resultando em seis tratamentos. O primeiro quadrado latino foi submetido a um protocolo de adaptação à dieta do tipo gradual ou step-up: dos dias D0 a D4 os animais receberam 100% de forragem; do D5 ao D9, 30% de concentrados e do D10 ao D14, 60% de concentrados. O segundo quadrado latino recebeu 100% de forragem do D0 ao D14 (sem adaptação). Nos D15 e D16, todos os animais receberam dieta com 80% de concentrados. Para as análises foram coletadas amostras de líquido ruminal a cada 3 horas a partir da 0h antes da alimentação até as 36h (D15 e D16) durante o desafio com uma dieta de 80% de concentrados. Os dados foram analisados pelo procedimento Mixed do SAS com nível de significância de 0,05. Foi observada interação entre tempo e adaptação ($P < 0,05$) para pH ruminal com diferença entre método de adaptação nas 0, 3, 6, 9, 12 e 36 horas pós alimentação, quando o grupo não adaptado teve valores maiores que o grupo adaptado, sendo que na hora 24 ocorreu o contrário. Para a concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), nas horas 0, 3, 6, 9 e 36 pós alimentação o grupo adaptado obteve maiores valores comparado ao grupo não adaptado. Para proporção molar de acetato, a 0 hora o grupo sem adaptação obteve valores maiores comparado ao grupo adaptado. Já nas horas 24, 27 e 30 o grupo com adaptação que obteve maiores valores. Para a proporção molar de propionato o grupo sem adaptação teve valores mais altos em comparação ao outro grupo das 3 às 36 horas pós alimentação. Quanto à proporção acetato:propionato (Ac:Pr) às 6, 12, 24, 27, 30 e 36 horas pós

alimentação, o grupo de animais adaptados teve valores mais altos que o grupo não adaptado. Na proporção molar de butirato, o grupo de animais adaptados obteve maiores valores nas horas 0, 3, 6, 9, 12, 33 e 36. Para os valores de nitrogênio amoniacal (N-NH₃), às 6 horas pós alimentação, o grupo não adaptado obteve maiores valores que o grupo adaptado (26,1 vs. 19,3, respectivamente). Nas horas 9, 30, 33 e 36 ocorreu o contrário. Observou-se também interação entre tempo e aditivo ($P=0,0430$) para a proporção molar de butirato. Porém, quando a análise foi realizada por tempo, nenhum efeito foi observado. Para os valores relativos de protozoários mensurados (*Dasytricha*, *Isotricha*, *Epidinium*, *Diplodinium* e *Entodinium*) apenas o *Entodinium* apresentou efeito de adaptação ($P<0,0236$) tendo sua proporção maior no grupo adaptado. Os valores de haptoglobina também não foram influenciados nem por aditivo nem por adaptação. O preparado de anticorpos policlonais não foi tão eficaz quanto a adaptação gradual à dieta de alto concentrado para controlar alterações dos parâmetros ruminais.

Palavras-chave: Fermentação ruminal, haptoglobina, microbiologia ruminal, rúmen, ruminante.

ABSTRACT

CASSIANO, E. C. O. **Evaluation of polyclonal antibodies in cattle adapted or not to diets with a high proportion of readily fermentable carbohydrates after induction of acidosis.** [Avaliação de anticorpos policlonais em bovinos adaptados ou não à dietas com alta proporção de carboidratos prontamente fermentescíveis após indução à acidose]. 2012. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

The objective of this trial was to evaluate the effects of polyclonal antibodies preparation (PAP) against specific rumen bacteria *Streptococcus bovis* and *Fusobacterium necrophorum* on rumen fermentation parameters in ruminally cannulated cows adapted or not to highly fermentable carbohydrates diets (HFC) after an acidosis challenge. The experimental design was two 3X3 Latin squares in a factorial arrangement of treatments 3X2 regarding two feed additives (PAP in powder presentation - PAPP and PAP in liquid presentation - PAPL) plus control group (CON) and two managements of diets adaptation, resulting in six treatments. The first Latin square had a step-up diet adaptation: from D0 to D4 – 100% forage; D5 to D9 – 30% of concentrates and D10 to D14 – 60% of concentrates. The second Latin square received 100% forage from D0 to D14. On D15 and D16, all animals received a diet with 80% of concentrates. For analysis, rumen fluid was sampled at 0 and every 3 h postfeeding totaling 36 h (D15 and D16) of challenge with a diet with 80% of concentrates. Data were analyzed by MIXED procedure with a significance level of 0.05. An interaction between time and adaptation ($P<0,05$) was observed for ruminal pH. At 0, 3, 6, 9, 12 and 36 h postfeeding, the non-adapted group had higher values compared to the adapted group and at 24 h postfeeding, the inverse was observed. For total short-chain fatty acids concentration, at 0, 3, 6, 9 and 36 h postfeeding, the adapted group had higher values compared to non-adapted group. For molar proportion of acetate at 0h postfeeding, the non-adapted group had higher values than the adapted group, and at 24, 27 and 30h, the adapted group had greater values than the non-adapted group. For molar proportion of propionate the non-adapted group had greater values compared to the adapted group from 3 to 36h postfeeding. For acetate:propionate (Ac:Pr) ratio at 6, 12, 24, 27, 30 and 36 h postfeeding, the adapted group had greater values compared to the non-adapted group. For butyrate molar proportion at 0, 3, 6, 9, 12, 33 and 36h postfeeding the

adapted group had greater values than the non-adapted group. For ammonia nitrogen (NH₃-N) concentration at 6h, the non-adapted group had greater values than the adapted group (26.1 vs. 19.3, respectively), however at 9, 30, 33 and 36h postfeeding, the adapted group had higher values compared to the non-adapted group. It was also observed an interaction between time and additive ($P=0.0430$) for butyrate molar proportion, but when the analysis was performed by time no effect was observed. For the relative values of protozoa measured (*Dasytricha*, *Isotricha*, *Epidinium*, *Diplodinium* and *Entodinium*) only *Entodinium* presented adaptation effect ($P<0.0236$) with a higher proportion in the adapted group. Haptoglobin values was also not influenced ($P>0.05$) by additive or adaptation effect. Polyclonal antibodies preparation was not as effective as the gradual adaptation to the diet high concentrate to control changes of ruminal parameters.

Keywords: Haptoglobin, rumen, rumen microbiology, rumen fermentation, ruminant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do delineamento experimental em dois quadrados latinos 3 x 3 com arranjo fatorial de tratamentos 3 x 2.....	37
Figura 2 - Valores de pH dos grupos com e sem adaptação (a.); e dos grupos conforme o aditivo fornecido (b.), durante todo o período de coleta de dados.....	44
Figura 3 - Concentração de AGCCt dos grupos com e sem adaptação (a.); e dos grupos conforme o aditivo fornecido (b.), durante todo o período de coleta de dados.....	45
Figura 4 - Proporção molar de acetato dos grupos com e sem adaptação (a.); e dos grupos conforme o aditivo fornecido (b.); concentração molar de acetato dos grupos com e sem adaptação (c.); e dos grupos conforme o aditivo fornecido (d.) , durante todo o período de coleta de dados.....	47
Figura 5 - Proporção molar de propionato dos grupos com e sem adaptação (a.); e dos grupos conforme o aditivo fornecido (b.); concentração molar de propionato dos grupos com e sem adaptação (c.); e dos grupos conforme o aditivo fornecido (d.) , durante todo o período de coleta de dados.....	49
Figura 6 - Relação Ac:Pr dos grupos com e sem adaptação (a.) e dos grupos conforme o aditivo fornecido (b.), durante todo o período de coleta de dados.....	50
Figura 7 - Proporção molar de butirato dos grupos com e sem adaptação (a.); e dos grupos conforme o aditivo fornecido (b.); concentração molar de butirato dos grupos com e sem adaptação (c.); e dos grupos conforme o aditivo fornecido (d.) , durante todo o período de coleta de dados.....	52
Figura 8 - Proporção molar de lactato dos grupos com e sem adaptação (a.), e dos grupos conforme o aditivo fornecido (b.), durante todo o período de coleta de dados.....	53
Figura 9 - Proporção molar de nitrogênio amoniacal dos grupos com e sem adaptação (a.) e dos grupos conforme o aditivo fornecido (b.), durante todo o período de coleta de dados.....	54
Figura 10 - Contagem diferencial de protozoários em animais adaptados à dietas com alta proporção de carboidratos fermentescíveis (a.); em animais não adaptados à dieta com alta proporção de carboidratos fermentescíveis (b.); em animais que não receberam aditivo algum (c.); em animais que receberam o aditivo PAP líq (d.) e em animais que receberam o aditivo PAP pó.....	56
Figura 11 - Valor da concentração plasmática de haptoglobina em animais adaptados ou não à dietas com alta proporção de carboidratos fermentescíveis (a.) e para os fatores compostos por diferentes aditivos alimentares (b.).....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proporções de ingredientes e composição bromatológica estimada da dieta experimental, com base na matéria seca (%).....	39
--	----

LISTA DE ABREVIACÕES

μl – microlitro

AGCC – ácidos graxos de cadeia curta

Ca – Cálcio

CH₄ – Metano

CMS – Consumo de matéria seca

CON – Controle

Conc. – concentração

EE – Extrato etéreo

EPM – Erro padrão da média.

FDA – Fibra em detergente ácido

FDN – Fibra em detergente neutro

FDNe – Fibra em detergente neutro efetiva

FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

g – gramas

h – horas

Hap - Haptoglobina

H₂ – hidrogênio

Kg – quilograms

L – litros

mg – miligramas

mg/mL – miligrama por mililitro

min – minutos

mL – mililitros

mM – miliMol

MS – Matéria seca

N₂ – nitrogênio

NDT – Nutrientes digestíveis totais

N-NH₃ – nitrogênio amoniacal

PAP – Preparado de Anticorpos Policlonais

P – Fósforo

PB – Proteína bruta

PDR – Proteína digestível no rúmen

PNDR – Proteína não digestível no rúmen

Trat. – Tratamento

USP – Universidade de São Paulo

VNP – Departamento de Nutrição e Produção Animal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	HIPÓTESE E OBJETIVO	20
3	REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1	RUMINAÇÃO	21
3.1.1	Manutenção do ambiental ruminal	21
3.1.2	pH ruminal	22
3.1.3	Taxa de passagem	23
3.2	MICROBIOLOGIA RUMINAL	25
3.2.1	Bactérias	26
3.2.2	Protozoários	27
3.3	ACIDOSE RUMINAL	28
3.4	MANIPULAÇÃO DA FERMENTAÇÃO RUMINAL	30
3.4.1	Ionóforos	31
3.4.2	Anticorpos policlonais aviários	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	ANIMAIS E INSTALAÇÕES	36
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E TRATAMENTOS	36
4.3	MANEJO NUTRICIONAL	38
4.4	PREPARADO DE ANTICORPOS POLICLONAIS	39
4.5	COLHEITA DE AMOSTRAS E MÉTODOS LABORATORIAIS	40
4.5.1	Contagem total e diferencial de protozoários ruminais	41
4.5.2	Determinação da concentração de haptoglobina (Hp)	42
5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	43
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
7	CONCLUSÕES	59
	REFERENCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

Atualmente é estimado, no mundo, em torno de 2 bilhões de pessoas subnutridas ou desnutridas. A principal causa da desnutrição é a falta de acesso a alimentos ricos em proteína, energia e fibras, presentes nas carnes, frutas e vegetais. A maior parcela das pessoas acometidas pela desnutrição é de mulheres e crianças de países subdesenvolvidos (FAO, 2011).

Associado à falta de acesso aos alimentos, ainda há a questão da escassez de terras agricultáveis no mundo, causada por condições edafoclimáticas, relações políticas, regiões de guerra e concorrência da terra para produção de energia.

Mesmo assim, tem havido uma rápida expansão na produção e consumo de produtos de origem animal, o que é esperado que continue ocorrendo. Um terço das terras agricultáveis no mundo é utilizada para produzir alimentos para animais. Um acréscimo na produtividade e qualidade animal é muito importante para minimizar os impactos ambientais e ainda suprir a demanda por alimentos (FAO, 2012).

O Brasil se destaca mundialmente como um dos maiores produtores de grãos e carne bovina. Isso graças a grandes áreas aptas à agricultura, tanto pela vastidão territorial quanto pelo solo e clima. O rebanho bovino brasileiro é estimado em 200 milhões de cabeças e a safra de grãos de 2011 em 159,9 milhões de toneladas, sendo a maior parte da soja, com 73,6 milhões de toneladas, e seguida pelo milho, com 56 milhões de toneladas. Estes cereais são a base da nutrição humana e animal (IBGE, 2007; CONAB, 2011).

O sistema de produção extensiva de gado sempre foi dominante no Brasil. Porém, nos últimos anos, com a incorporação de novas tecnologias visando o aumento da produtividade para atender a demanda mundial, cresceram os investimentos em sistemas intensivos de produção da carne bovina, aumentando o número de confinamentos e semi-confinamentos.

Com esses novos investimentos em tecnologia, o Brasil tem alcançado excelentes índices de produção e exportação de carne bovina. Isto se deve à qualidade do sistema produtivo nacional e à produção de carne de qualidade no país (ALVES, 2006).

Pelo Censo Agrícola Municipal do IBGE, realizado em 2009, o Brasil tinha um rebanho de 205.260.154 cabeças de bovinos. Com isso, o Brasil detém o segundo maior

rebanho de bovinos do mundo, ficando atrás apenas da Índia (CORREIO DO BRASIL, 2010).

Mesmo com crescimento e investimento na cadeia produtiva bovina brasileira, a criação extensiva ou intensiva em regime de pastejo, no Brasil, sofre impacto do clima sobre a produção e disponibilidade de forragem na época de inverno. As forrageiras utilizadas em território brasileiro são, em sua maioria, de espécies de clima tropical que apresentam estacionalidade de produção. De modo que, no inverno, com as baixas temperaturas, fotoperíodo curto e quase nenhuma disponibilidade de água, estas forrageiras têm seu crescimento quase ou totalmente cessado. As forrageiras de ciclo C4 (de clima tropical), com menor estacionalidade, apresentam 80% de sua produção de matéria seca no verão e apenas 20% no inverno (SANTOS; BALSALOBRE, 2000).

Uma alternativa que vem sendo utilizada cada vez com mais frequência no Brasil para contornar a sazonalidade de forrageiras é o uso de confinamentos. O emprego do confinamento em determinada fase de desenvolvimento do animal também auxilia no maior ganho de peso em menos tempo, o que se traduz na diminuição na idade de abate e em melhor aproveitamento das pastagens. Isso faz com que se tenha mais quilo de carne em um espaço reduzido em relação ao sistema extensivo de pastejo, além de o mercado não sofrer tanta oscilação durante a entressafra, já que, no confinamento, o alimento utilizado são, em sua maioria, grãos, além do melhor aproveitamento das pastagens para outras categorias animais.

No Brasil, o sistema de confinamento é caracterizado por períodos mais curtos (70-120 dias), menores pesos de abate, com carcaças de 17 arrobas e menor grau de acabamento quando comparados aos animais confinados em outros países, ocorrência da terminação de diferentes lotes no mesmo curral, com predominância de animais zebuínos inteiros e também por não utilizar anabolizantes (MILLEN et al., 2009).

Segundo Eduardo Moura, presidente da Associação Nacional dos Confinadores (ASSOCON), outros fatores que estimulam o confinamento no Brasil são a restrição ambiental, como os desmatamentos, e a destinação de parte da área de pastagem à agricultura, graças à forte alta do preço dos grãos (PECUÁRIA, 2011).

Um indicativo do aumento do interesse em se confinar é o comparativo do número de animais confinados em 2006, que foi de 933.967 animais, e o número estimado por Millen et al. (2009), de 3.163.750 de cabeças em 2009. Considerando estes valores, houve aumento de 338,75% no total de animais confinados em apenas três anos.

O aumento na capacidade operante dos confinamentos resulta em um problema logístico e de área quanto à produção e fornecimento de volumoso para um rebanho tão grande. Este motivo, associado à necessidade de engordar o animal mais rapidamente e a boa disponibilidade de grãos, faz com que os confinadores sejam estimulados a aumentar o teor de inclusão de concentrados nas dietas de terminação.

Essa maior inclusão de concentrados nas dietas de bovinos adaptados anteriormente a uma alimentação exclusivamente de volumoso requer certo tempo de adaptação por parte da população microbiana ruminal, já que essa mudança causa efeitos marcantes no ambiente ruminal (BEVANS et al., 2005).

A adição de carboidratos prontamente fermentescíveis à dieta de um animal vindo de uma dieta à base de forragem deve ser feita aos poucos. Pois uma mudança desse tipo na dieta causa aumento na população de bactérias amilolíticas, aumento nos níveis de ácido lático e AGCC, bem como diminuição do pH ruminal, causando acidose, podendo até levar o animal a óbito.

Animais de origem zebuína têm mais sensibilidade ao aumento na proporção de concentrados na dieta que animais taurinos. Um meio de acrescentar concentrado à dieta mais rapidamente e com menor incidência de enfermidades, como a acidose, seria o uso de antibióticos ionóforos misturados na dieta (MACHADO; MADEIRA, 1990).

O ionóforo age como modulador da fermentação ruminal, reduzindo os riscos de acidose, sendo utilizado em conjunto a uma adaptação do animal à nova dieta, com maior proporção de carboidratos prontamente fermentescíveis.

Porém, a utilização de antibióticos na alimentação animal vem sendo contestada com uma teoria de que haja resíduos desse produto em alimentos de origem animal que, quando ingeridos pelo homem, se torne uma forma de promover resistência de microrganismos patogênicos pela subdosagem. Porém, Donoho (1984) não evidenciou acúmulo tecidual de antibiótico quando os animais o ingeriram oralmente seguindo as recomendações técnicas.

Mesmo sem a evidência de seu acúmulo tecidual em produtos de origem de animais que ingeriram algum produto antibiótico ou cocidiostático, a Comunidade Européia decidiu, por precaução, proibir o uso destes produtos como aditivos alimentares para bovinos, de acordo com o regulamento (EC) N° 1831/2003.

Uma alternativa ao uso destes antibióticos que está sendo estudada é imunidade passiva contra microrganismos específicos. Isto é, anticorpos policlonais de origem aviária

são administrados a bovinos recebendo dietas com alta proporção de concentrados. Estes anticorpos agem contra bactérias ruminais específicas precursoras de distúrbios nutricionais, como a acidose.

Como a ação dos anticorpos não é diretamente na modificação de DNA ou RNA do microrganismo alvo (KELLEY; LEWIS, 1986), não contribuem para o aparecimento de resistência por parte do microrganismo e, caso ocorra, é possível criar novos anticorpos a partir dos resistentes.

Pesquisadores vêm testando o preparado de anticorpos policlonais (PAP) em duas formas, a líquida (PAPl) e a pó (PAPp). Em apresentação líquida o produto obteve alguns resultados positivos nas pesquisas de Marino (2008), que relatou efeito positivo em evitar a redução do pH ruminal, e Millen (2007), que relatou redução de rumenite e abscessos hepáticos em animais de corte, assim como ganho de peso diária semelhante a animais tratados com monensina. Em apresentação em pó, alguns pesquisadores (DAHLEN et al., 2003; BASTOS, 2009; PACHECO, 2010), não conseguiram demonstrar efeito significativo em seu uso. Já Barducci et al. (2009) relataram piores eficiência alimentar, ganho de peso diário e peso de carcaça quente, comparados aos animais tratados com monensina.

Estes resultados geram a discussão se o processo de secagem do produto interfere na sua eficácia. Essa dúvida levou Pacheco (2010) a levantar a questão de que seria interessante fazer a comparação dos dois tipos de apresentação do produto, que foi a finalidade deste trabalho.

2 HIPÓTESE E OBJETIVO

A hipótese do presente trabalho é que o preparado de anticorpos policlonais (PAP) na apresentação líquida apresente melhor desempenho para as variáveis de fermentação ruminal, digestibilidade aparente total e contagem ruminal de protozoários, quando comparado ao PAP na apresentação em pó, por não ter sido submetido ao processo de secagem, que provavelmente reduziria seu potencial de ação.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos de um preparado de anticorpos policlonais (PAP) produzido contra as bactérias alvo *Streptococcus bovis* e *Fusobacterium necrophorum*, na apresentação pó ou líquida, sobre as variáveis de fermentação ruminal em fêmeas bovinas adaptadas ou não à dieta com alta proporção de carboidratos prontamente fermentescíveis.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 RUMINAÇÃO

A ruminação é uma peculiaridade do processo digestivo dos ruminantes que divide o ato da mastigação em duas etapas. A primeira tem a função apenas da deglutição e a segunda a de conferir ao bolo alimentar tamanho adequado para a fermentação ruminal. Ela começa entre meia hora e uma hora e meia após a alimentação, com a regurgitação do alimento para o início da segunda etapa da mastigação (FURLAN; MACARI; FARIA NETO, 2011).

Isso é possível, pois os ruminantes possuem um estômago composto e a fermentação ruminal precede a digestão enzimática. Essa câmara de fermentação é denominada proventrículo, que é constituído de três compartimentos: o rúmen e o retículo, que operam como uma unidade funcional conjugada, onde ocorre a fermentação microbiana, onde bactérias, protozoários e fungos produzem enzimas capazes de hidrolisar proteínas, lipídeos e carboidratos, inclusive a celulose, e o omaso, onde os alimentos chegam quando atingem o tamanho para passarem pelo orifício reticulo-omasal este órgão tem uma superfície de absorção aproximadamente de 10% em relação ao rúmen. Após sair do omaso, o alimento passa ao abomaso, que possui características similares à dos monogátricos, onde se dá início à digestão pela secreção do suco gástrico (SILVA; LEÃO, 1979). Os ruminantes que consomem alimentos mais concentrados apresentam uma porção glandular, no abomaso, maior para secreção de ácido clorídrico (FURLAN; MACARY; FARIA NETO, 2011).

3.1.1 Manutenção do ambiental ruminal

Para que a fermentação ruminal aconteça corretamente e a saúde do animal seja mantida, o ambiente ruminal deve se manter dentro de alguns parâmetros, mantendo

algumas características dentro de um padrão. Características essas que promovam o crescimento de bactérias, fungos e protozoários que favoreçam a fermentação ruminal.

A anaerobiose é importante para a maioria dos microrganismos presentes no rúmen que são anaeróbios estritos. O oxigênio que entra no rúmen, seja pela ingestão de alimento ou água, seja pela difusão através dos vasos sanguíneos, é utilizado pelas bactérias anaeróbias facultativas ou eliminado pela eructação (FURLAN; MACARY; FARIA NETO, 2011).

O pH é importante para contribuir com um ambiente favorável ao desenvolvimento de microrganismos. Enquanto protozoários e bactérias celulolíticas necessitam de um pH de 6,2 ou maior, as bactérias aminolíticas ainda são ativas com pH em torno de 5,8. Assim, o valor ideal de pH fica em torno de 5,5 a 7,0. A saliva é o meio de o ruminante manter o pH do rúmen em níveis adequados (FURLAN; MACARY; FARIA NETO, 2011).

Outra característica que se faz importante para a manutenção da saúde ruminal é a osmolaridade, que deve ser em torno de 260 – 340 mOsm. Dietas com maior proporção de concentrados aumentam a osmolaridade. Esta, se alcançar o nível de 350 mOsm, inibirá tanto microrganismos celulolíticos como amilolíticos (OWENS; GOETSCH, 1993; VALADARES FILHO; PINA, 2006).

A motilidade do trato também é importante, pois é o que faz com que o alimento fique ou passe de um lugar para outro, além de misturá-lo com secreções digestivas.

Estas são algumas características que são essenciais para que se tenha um ambiente ruminal favorável para a colonização de microrganismos benéficos à ruminação, fazendo com que a digestibilidade pelo animal seja a máxima possível.

3.1.2 pH ruminal

Como dito anteriormente, o pH exerce uma função de extrema importância no rúmen, isso por determinar o crescimento ou diminuição no número de microrganismos ruminais, exercendo grande impacto sobre o perfil de fermentação ruminal, além de outras influências, como motilidade e absorção ruminal (NAGARAJA; TITGEMEYER, 2007).

Quando o pH atinge valores inferiores a 6,2 a taxa de digestão é inibida e o tempo de colonização para a degradação da parede celular aumenta (VAN SOEST, 1994).

Em dietas em que é restrita a fibra dietética e a taxa de fermentação de carboidratos é rápida, o pH pode declinar, sendo que estudos indicam um baixo crescimento microbiano quando a dieta do animal contém menos de 40% de forragem (VALADARES FILHO; PINA, 2011). Quando valores de pH decrescem de 7,0 para 5,5 a 5,0, muitos microrganismos ruminais, principalmente protozoários e bactérias celulolíticas, cessam seu crescimento por serem sensíveis a concentrações altas de H^+ (GOAD; GOAD; NAGARAJA, 1998).

Valores baixos de pH podem retardar a adesão dos microrganismos à celulose, isso porque o rúmen fica deficiente em compostos, como bicarbonato, que favorecem sua adesão, ou pelo aumento de substâncias, como o amido, que inibem essa adesão (OWENS; GOESTCH, 1993). Além da degradação de celulose, o pH também afeta a degradação de proteína em virtude das alterações ocorridas na atividade microbiana (RUSSELL; WILSON, 1996).

Os valores de pH ruminal geralmente baixam, principalmente, após rápida ingestão de alimento com alta taxa de fermentação (ORSKOV, 1986). Em dietas predominantemente de fibras ou carboidratos estruturais, o pH ruminal é mais alcalino, predominando bactérias celulolíticas. Ao elevar os teores de concentrado ou carboidratos não estruturais, o pH tende a ficar mais ácido. Quando o pH chega a valores abaixo de 6 o crescimento de microrganismos celulolíticos é inibido, tendo uma prevalência de microrganismos amilolíticos (SCHWARTZKOPF-GENSWEIN et al., 2003; NUSSIO; CAMPOS; LIMA, 2006; VALADARES FILHO; PINA, 2006).

3.1.3 Taxa de passagem

A taxa de passagem também exerce papel importante na manutenção da fermentação ruminal. Isso porque os fragmentos gerados a partir do alimento consumido pelo animal diferem entre si em massa, tamanho, formato, composição química, solubilidade, dentre outros. Fazendo com que eles se comportem de formas diferentes uns dos outros tanto pela passagem pelo rúmen quanto pelo trato gastrintestinal (TGI). Certos

componentes, como algumas proteínas, podem ser rapidamente solubilizadas pela saliva ou pelos fluidos ruminais. Outros compostos como, por exemplo, o amido, só serão solubilizados pela digestão por apresentarem estruturas que servem como barreira física à colonização microbiana. Estas são algumas características que determinam a velocidade com que o alimento será digerido e, assim, disponibilizar seus nutrientes para absorção (SILVA, 2006; VALADARES FILHO; PINA, 2006).

A taxa de desaparecimento da digesta do rúmen é um dos principais fatores que, junto com alguns sinais metabólicos, determinam quando o animal deverá começar ou parar de comer (WESTON, 1996).

A ingestão voluntária de matéria seca (IVMS) pode ser um fator limitante para ruminantes alimentados com dietas à base de forragem, isso porque sua produtividade depende da ingestão de alimentos e a extração dos nutrientes desse alimento. Essa limitação do fluxo de alimento pode ser resultante da distensão de um ou mais segmentos do TGI que inibe o consumo (ALLEN, 1996).

Segundo Silva (2006), a IVMS tem uma relação maior com o teor de fibra em detergente neutro (FDN) do que com outros parâmetros químicos. Porém, de acordo com Mertens (1994), apenas a FDN como parâmetro é inadequado, pois a saciedade do animal, pelo enchimento ruminal ou do TGI, varia de acordo com o tamanho e fragilidade da partícula ingerida, bem como da taxa e extensão da digestão da FDN.

Quando há aumento na ingestão de matéria seca, há também aumento no volume ruminal, pois o animal também aumenta a ingestão de água e a secreção salivar. Com isso, há o aumento da porcentagem de matéria seca do conteúdo ruminal e na taxa de passagem de partículas de alimento. Os efeitos da ingestão sobre a taxa de passagem de fluídos são maiores do que sobre a taxa de passagem de partículas. Outros fatores que também podem afetar a taxa de passagem são: estado fisiológico do animal, como gestação e exercícios, temperatura ambiente, frequência alimentar e período do dia (OWENS; GOETSCH, 1993).

De acordo com Allen (1996), a IVMS de alimentos de baixa digestibilidade está limitada fisicamente pela distensão do trato gastrointestinal. Porém, a taxa de passagem pode ser aumentada pela maior digestibilidade da dieta até certo ponto, onde a limitação da IVMS é determinada pelo teor de energia fornecida pela dieta e não mais pela capacidade física do trato (CONRAD; PRATT; HIBBS, 1964).

Os alimentos apresentam taxas de passagem variáveis de acordo com o teor de concentrados e volumosos da dieta. Quanto maior a participação de concentrados e líquidos na dieta, maior a taxa de passagem de partículas em relação à dietas ricas em volumosos, possibilitando a maior IMS e fornecendo maior quantidade de substrato para a fermentação (OWENS; GOETSCH, 1993).

Portanto, a taxa de passagem da dieta sofre influências do nível de consumo de matéria seca, composição química ou física da dieta, ingestão de água e da presença de sais ou tamponantes presentes na dieta.

3.2 MICROBIOLOGIA RUMINAL

O processo de fermentação ruminal é dependente de interações entre diversos microrganismos, tais como bactérias, fungos e protozoários, na sua maioria anaeróbios (YOKOYAMA; JOHNSON, 1993). Porém, o número total desses microrganismos, assim como suas proporções, é dependente de diversos fatores, como, por exemplo, a dieta.

Além da interação entre microrganismos e hospedeiro, onde o ruminante fornece o ambiente favorável para a proliferação dos microrganismos, há também interação entre os diferentes microrganismos, onde uma espécie cresce utilizando o substrato de outra, ou com a predação, por exemplo, com protozoários ingerindo bactérias (LONDOÑO et al., 1997).

A colonização do rúmen pelos microrganismos se dá logo após o nascimento, aumentando durante as primeiras semanas de vida, até se tornar predominantemente colonizado por microrganismos anaeróbios. Quantitativamente, a massa microbiana ruminal é composta por 60-90% de bactérias, 10-40% por protozoários ciliados e o restante, 5-10%, por fungos (VAN SOEST, 1994).

3.2.1 Bactérias

As bactérias são classificadas de acordo com o tipo de substrato que utilizam e os produtos oriundos de sua fermentação em celulolíticas (bactérias fermentadoras de carboidratos estruturais), amilolíticas e pectinolíticas (fermentadoras de carboidratos não estruturais), lipolíticas, proteolíticas, metanogênicas ou láticas (ARCURI; LOPES; CARNEIRO, 2006).

Dentre as bactérias celulolíticas estão *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* e *R. flavefaciens*, que são as espécies com maior importância para degradação de celulose, fazendo com que seja um grupo de bactéria considerado o mais decisivo para a evolução dos ruminantes, já que conferem a esses animais a degradação de fibra, o que não ocorre com os monogástricos (ORSKOV; REID; KAY, 1988).

Entre as principais bactérias amilolíticas estão *Bacteroides amilophilus*, que utiliza amido, mas é incapaz de utilizar glicose ou outros monossacarídeos (CALDWELL; KEENEY; VAN SOEST, 1969; MIURA; HORIGUCHI; MATSUMOTO, 1980), *Streptococcus bovis* (MANTOVANI; RUSSELL, 2001) e *Selenomonas ruminantium* (FLINT; BISSET, 1990), que fermentam amido e açúcares solúveis, produzindo, principalmente, acetato.

As proteínas dietéticas são degradadas por ação de enzimas de microrganismos, como *Bacteroides*, *Selenomonas* e *Butyrivibrio*, formando peptídeos e aminoácidos, que serão utilizados na síntese microbiana ou sofrerão desaminação oxidativa, formando amônia e AGCC. Logo, se a taxa de desaminação for maior que a taxa de utilização de amônia para síntese microbiana perde-se eficiência alimentar (TEDESCHI; FOX; RUSSELL, 2000).

Bactérias, como *Methanobrevibacter ruminantium* e *Methanosacina barkeri*, são metanogênicas e utilizam H₂, CO₂, formato e acetato para seu desenvolvimento, produzindo metano ao final.

Em dietas com alto concentrado tem-se o crescimento de bactérias láticas (*Megasphaera elsdenii* e *Selenomonas ruminantium*), que utilizam produtos de degradação das bactérias primárias, convertendo ácido láctico em propionato (VAN SOEST, 1994).

Normalmente não há microrganismos patógenos no rúmen. Porém, o *Aspergillus* spp. ou *Fusobacterium necrophorum* podem invadir o epitélio ruminal e causar rumenites,

se as condições forem favoráveis. Dentre as bactérias mais frequentemente encontradas nas ruminantes e abscessos hepáticos está o *Fusobacterium necrophorum*.

3.2.2 Protozoários

Os protozoários são microrganismos anaeróbios, unicelulares, não patogênicos com tamanho variando de 20-200 μm (DEHORITY, 1993). Sua população varia de acordo com o tipo de substrato, variando sua concentração entre 10^4 - 10^6 protozoários/mL de conteúdo ruminal. Em consequência de seu tamanho, essa concentração pode representar 40-60% do total da biomassa ruminal (ARCURI; LOPES; CARNEIRO, 2006).

Os protozoários desempenham papel tamponante no rúmen, pois tem maior acesso a uma quantidade excessiva de substratos prontamente fermentescíveis, diferentemente das bactérias, reduzindo assim o risco de acidose em animais submetidos a dietas com alto concentrado (Lopes et al., 2002). Além disso, utilizam as próprias bactérias ruminantes como fonte de substrato, contribuindo com o ecossistema ruminal (ORSKOV; REID; KAY, 1988).

Além do pH ruminal (FRANZOLIN; DEHORITY, 1996), o tipo de dieta (Nogueira Filho et al., 2001), tempo decorrido após a alimentação, consumo alimentar, produção de saliva, taxa de fermentação e concentração de seus produtos finais (RUSSELL; RYCHLIK, 2001) são fatores relacionados ao número de protozoários no rúmen. Sendo que a faixa ideal de pH ruminal para sobrevivência de protozoários ciliados fica entre 7,8 e 5,0 (CLARKE, 1977).

Em dietas com 60% ou mais de concentrados, o pH tende a diminuir a 6, o que causa a diminuição da porcentagem de *Entodinium*, podendo chegar a sua completa eliminação (DEHORITY; ORPIN, 1997). Em experimento, Dehority (2005) evidenciou que o gênero *Epidinium caudatum* sobrevive até um pH mínimo de 5,4 e para *Entodinium caudatum* e *Entodinium exiguum* o pH mínimo foi de 4,37 e 4,34, respectivamente.

Segundo Carvalho et al. (2011), a diminuição no número de protozoários ruminantes pode estar também relacionada com a redução no teor de nutrientes digestíveis totais e aumento no teor de fibra em detergente neutro (FDN), já que o gênero predominante

(*Entodinium*) não utiliza FDN no seu metabolismo, refletindo a necessidade de energia pelos microrganismos para sua sobrevivência e crescimento.

A redução na população de protozoários pode ser um bom indicativo de acidose aguda e sub-aguda, devido ao acúmulo de ácido lático ou ácidos graxos de cadeia curta, respectivamente.

3.3 ACIDOSE RUMINAL

Com a alta demanda de carne bovina, a pressão de produção está cada vez mais alta, fazendo com que produtores confinem cada vez mais seus animais, ofertando a eles, que estavam em sistema de pastejo, alimentos com altas proporções de concentrados. Essa mudança de dieta, de forragem para carboidratos mais facilmente fermentáveis, visa maximizar a produção, porém, se torna perigosa se não forem tomados certos cuidados, podendo levar os animais a certos distúrbios metabólicos, como, por exemplo, a acidose ruminal.

Owens et al. (1997), citado por Carvalho et al. (descrevem a acidose ruminal como uma alteração aguda ou crônica proveniente de excessiva ingestão de carboidratos altamente fermentescíveis, sendo problema frequente em ruminantes consumindo dietas ricas em concentrados. É um distúrbio que pode se manifestar em vários graus, podendo ser crônica ou aguda (STOCK; BRITTON, 1991).

Com a busca de se alcançar as exigências nutricionais dos animais, os nutricionistas têm utilizado dietas altamente palatáveis, com ingredientes de alta digestibilidade e altos níveis de energia (KLEEN et al., 2003). Porém, o ambiente ruminal desses animais acaba sendo bem diferente daquele no qual tanto os microrganismos como o próprio animal evoluíram (RODE, 2000). Essa mudança na dieta, de forma que os animais não tenham uma adaptação apropriada, propicia o aparecimento da acidose clínica (KLEEN et al., 2003).

Na acidose clínica, animais que consumiram alimentos com grande quantidade de carboidratos não fibrosos apresentam maiores produções de AGCC (GALYEAN; RIVERA, 2003). Com isso, a concentração de ácido lático também é abruptamente aumentada, resultando em queda significativa no pH ruminal. Concentrações maiores que

40mM de ácido láctico no rúmen são consideradas reflexos de acidose clínica (OWENS et al., 1998). De acordo com alguns autores (SLYTER, 1976; NAGARAJA, 2003), o pH de 5,5 para menos é a faixa onde bactérias como *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus spp.*, produtora de lactato, se proliferam. Ao mesmo tempo, há inibição do crescimento de bactérias utilizadoras de lactato, como a *Megasphaera elsdenii* e *Selenomonas ruminantium* (RUSSELL; HINO, 1985). Portanto, quando o pH fica abaixo de 5,5, independentemente da dieta, é esperado o acúmulo de ácido láctico.

A glicose ruminal é elevada devido à hidrólise do amido até que sua concentração exceda a da glicose sanguínea (GALYEAN; RIVERA, 2003). Esse aumento na concentração de glicose ruminal leva a várias consequências negativas no rúmen como: 1) o aumento na população de microrganismos produtores de lactato, como *Streptococcus bovis* (DAWSON; RASMUSSEN; ALLISON, 1997); 2) a inibição da absorção de AGCC do rúmen pelo aumento da osmolaridade e acidez ruminal (OWENS et al., 1998); e 3) desenvolvimento de laminites causadas por endotoxinas produzidas por microrganismos coliformes e aminoácido descarboxilantes, que encontram um ambiente mais favorável (GALYEAN; RIVERA, 2003).

Pelos sinais clínicos da acidose subaguda não serem tão evidentes como nos casos clínicos, Nocek (1997) considera que as perdas econômicas são mais acentuadas em casos de acidose subaguda. Na Universidade de Nebraska, pesquisadores calcularam que as perdas econômicas devido a esse tipo de acidose, resultando na redução do desempenho animal causada pela redução da ingestão de matéria seca nos confinamentos, são entre US\$10 e US\$13 por cabeça. Se ainda fossem adicionados a esses valores, perdas por abscessos de fígado, os valores atingiriam US\$16 por animal, considerando a incidência de 15% de abscesso hepático (Stock e Britton, 1996).

Estratégias, como alterar gradativamente a dieta, podem evitar ou minimizar as perdas por acidose. A sintomatologia de animais com acidose é: diminuição de apetite pelo animal, diarreia, muco nas fezes, desidratação, falta de coordenação motora e frequentemente morte. Também ocorre a diminuição da motilidade ruminal, aceleração dos batimentos cardíacos e a queda da temperatura da pele. Costuma ocorrer também aumento dos sais e ácidos no sangue, além da expulsão de uma taxa maior de proteína e glicose pela urina. Os sintomas costumam ocorrer de 12 a 24 horas após a ingestão do alimento, sendo que o animal pode chegar a óbito em três dias (QUADROS, 2002).

Atualmente, com essa intensificação no sistema produtivo de ruminantes, é preciso, cada vez mais, fazer pequenos ajustes na dieta dos animais para que se possa explorar ao máximo sua eficiência, sem acarretar riscos à saúde. Para isso, também se pode fazer o uso de manipuladores da fermentação ruminal, como antibióticos e ionóforos.

3.4 MANIPULAÇÃO DA FERMENTAÇÃO RUMINAL

Atualmente, a principal preocupação dos nutricionistas tem sido modular e controlar a fermentação ruminal para maximizar a produtividade tanto da carne como de leite. Graças ao grande avanço na área de nutrição animal, tanto na parte de exigência animal como dos valores nutricionais dos alimentos, os nutricionistas hoje tem à sua disposição informações necessárias para o balanceamento de dietas precisas de acordo com cada categoria animal e seu nível máximo desejado de produção.

Com isso, a utilização de substâncias introduzidas na ração ou presentes, naturalmente, no alimento, para manipular o processo fermentativo do rúmen, tem oferecido alternativas para aumentar a eficiência de utilização das dietas ingeridas pelos ruminantes (MORAIS; BERCHIELLI; REIS, 2011).

Essa modificação na fermentação ruminal pode ocorrer em três níveis: dietético, animal e microbiano. Simplificadamente, os principais objetivos da manipulação ruminal seriam: melhorar os processos benéficos; minimizar, deletar ou alterar os processos ineficientes; minimizar, deletar ou alterar os processos prejudiciais para o animal (MORAIS; BERCHIELLI; REIS, 2011).

Alguns processos que devem ser maximizados são a degradação da fibra, utilização do lactato e conversão de compostos nitrogenados não-proteicos em proteína microbiana, enquanto que a produção de metano, degradação da proteína e absorção de amônia devem ser minimizados (NAGARAJA et al., 1997).

Seguindo estes avanços, deram-se as descobertas de compostos que auxiliam no controle do metabolismo ruminal, aumentando a eficiência de utilização de alimentos e proporcionando aumento na produtividade. Esses compostos são denominados aditivos alimentares.

Segundo DiCostanzo; Cassady; Zehnder (1996), o termo aditivo alimentar é aplicado a compostos de várias origens, geralmente incluído em pequenas proporções na dieta, com a finalidade de melhorar o desempenho e saúde em bovinos, suínos e aves.

Em dietas de animais confinados, os aditivos são usados principalmente para melhorar a conversão alimentar e/ou ganho de peso, podendo ter benefícios secundários, como a melhoria na sanidade geral do animal.

3.4.1 Ionóforos

Dentre os muitos ionóforos existentes, apenas três são registrados no Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA), sendo eles: Lasalocida, Monensina Sódica e a Salinomycin Sódica. Ionóforos são antibióticos bacteriostáticos produzidos a partir, principalmente, de bactérias do gênero *Streptomyces*.

Os ionóforos atuam contra bactérias gram-positivas, que são produtoras de ácido acético, ácido butírico, ácido láctico e H_2 , não apresentando nenhuma atividade contra bactérias gram-negativas, produtoras de ácido succínico, ácido propiônico ou que fermentam ácido láctico, pois possuem uma membrana externa que contém porinas (canais de proteínas) com um tamanho de aproximadamente 600 daltons (Da). Já que a maioria dos ionóforos apresentam tamanhos maiores que 600 Da, eles não são capazes de atravessar as porinas (NAGARAJA et al., 1997). As bactérias gram-positivas não apresentam essa camada externa, ficando desprotegidas dos ionóforos (RUSSEL, 1997).

Sua ação inicia-se pela ligação da monensina à parede celular dos microrganismos, facilitando a passagem de Na^+ e K^+ intracelular para o meio extracelular, tornando assim, a membrana permeável ao íon H^+ , fazendo com que o pH celular tenha queda. O microrganismo, então, ativa a ATPase para remover o H^+ da célula, para tentar manter o pH estável, gerando um grande consumo de energia, reduzindo assim a capacidade de multiplicação celular, podendo ocorrer a morte do microrganismo. Este efeito seletivo é dose dependente. Porém, doses excessivas também podem levar à inibição de microrganismos gram-negativos, protozoários e fungos (Morais; Berchielli e Reis, 2006).

Os ionóforos atuam aumentando a eficiência produtiva por aumentar a eficiência do metabolismo energético e de nitrogênio no ambiente ruminal, reduzindo a incidência de

desordens digestivas, como a acidose ruminal e o timpanismo, por exemplo (BERGEN; BATES, 1984).

A ação da monensina para o aumento da eficiência energética no rúmen se dá pelo aumento na proporção de propionato e redução das proporções de acetato e butirato, que estão associados à produção de metano ruminal, que consiste num dreno energético. Com isso, há uma maior retenção de íons de hidrogênio, aumentando a produção de propionato e tornando a fermentação ruminal mais eficiente (Joyner et al., 1979; Thornton; Owens, 1981).

Porém, a ação de ionóforos sobre a produção de metano explica somente 3% do ganho na eficiência energética, por reduzir cerca de 30% de metano ruminal. O que não compromete mais que 12% da energia bruta da dieta (BLAXTER, 1962; RUSSELL; STROBEL, 1989).

3.4.2 Anticorpos policlonais aviários

Uma ferramenta que vem sendo testada ultimamente para auxiliar na modulação da fermentação ruminal são os anticorpos policlonais aviários. Os princípios da imunização específica ao antígeno são a ativação das células B, que são responsáveis pela produção de anticorpos, a ativação de células T, responsáveis pelas resposta citotóxica ao antígeno, e a ativação das células T_h (T helper), responsáveis pela estimulação das células B e T (HAU; COENRAAD, 2005).

Segundo Marino (2011), diConstanzo afirma, em comunicação pessoal, que imunoglobulinas Y, produzidas em ovos de galinha, possuem resistência às condições extremas presentes no rúmen, tais como pH até 4,5, temperatura de 120°C, à proteólise e mesmo após a sua quebra continuam com seu sítio de ligação.

DiLorenzo; Diez-Gonzalez; DiCostanzo (2006) e DiLorenzo et al. (2008) observaram que os preparados de anticorpos policlonais se mostram com alta especificidade ao microrganismo aos quais foram desenvolvidos para agir, já que a adição dos PAPs contra *Streptococcus bovis* (PAP-Sb) ou *Fusobacterium necrophorum* (PAP-Fn) foram eficazes em reduzir as concentrações das bactérias alvo e, ainda, não alteraram as concentrações da outra bactéria. Porém, Blanch et al. (2009) não encontraram diferenças

entre o grupo tratado com PAP-Sb e o grupo controle quando avaliados pela técnica de PCR em tempo real. Numericamente, encontraram uma maior concentração de DNA da bactéria *Streptococcus bovis* no grupo controle em relação ao grupo recebendo PAP-Sb. Porém, essa diferença não foi significativa devido à variação entre os animais.

O uso de PAP contra *Streptococcus bovis*, *Fusobacterium necrophorum* e cepas de bactérias proteolíticas aumentou em 93,65% a contagem relativa de *Isotricha* em relação ao grupo controle, após 4 horas da alimentação, independentemente da fonte de energia utilizada na dieta (OTERO, 2008).

Já em estudo conduzido por Blanch et al. (2009), o uso do PAP-Sb não mostrou efeito significativo sobre a contagem de protozoários em relação ao grupo controle. Sendo o mesmo observado por Bastos (2009), ao testar diferentes dosagens de PAP-Sb e PAP-Fn.

O impacto da retirada de uma ou mais espécies de microrganismo do ambiente ruminal não é conhecida, pois, além das características como temperatura, pressão osmótica e pH, o ambiente ruminal também conta com interações, como: predação, mutualismo e antibiose, que ocorrem entre os microrganismos ruminais (ARCURI; LOPES; CARNEIRO, 2006).

O uso do PAP na alimentação não teve efeito algum sobre o pH ruminal, a concentração de AGCCt, a proporção molar de ácido acético, propiônico ou butírico, bem como sobre o nitrogênio amoniacal (DAHLEN et al., 2003; DILORENZO et al., 2008; BASTOS, 2009; BLANCH et al., 2009). Em trabalho realizado por Marino (2008), os resultados foram os mesmos. Porém, para pH, o PAP foi tão eficaz quanto a monensina em manter o pH ruminal às 4 h pós alimentação. Para o ácido lático também não houve efeito do PAP em sua concentração nos experimentos citados acima. Isto pode ter sido causado pelos valores observados de pH ruminal (5,70 – 6,27). Segundo Nagaraja e Titgemeyer (2007), o ácido lático apenas começa a se acumular em pH abaixo de 5,5, quando as bactérias que utilizam o lactato são inibidas.

Em estudo em que Otero (2008) estudou a adição de PAP em comparação a monensina em três tipos de dietas, segundo o principal ingrediente energético das mesmas (milho seco moido, silagem de grão úmido ou polpa cítrica), e avaliou que a degradabilidade potencial (Dp) da FDN da cana-de-açúcar, observou-se interação entre os fatores modificador e tipo de dieta ($P=0,00174$), sendo que nas dietas com silagem de grão úmido, a Dp da FDN da cana-de-açúcar foi três vezes maior para os animais que receberam PAP em relação ao grupo de animais que receberam a monensina. Porém, para os outros

dois tipos de dietas a Dp da cana foi semelhante entre os dois modificadores. Sendo assim, a utilização do PAP pode ser uma alternativa ao uso de monensina em dietas com silagem de grão úmido, já que a monensina pode estar associada à queda de degradabilidade da FDN em alimentos fibrosos (NEWBOLD; WALLACE; MCKAIN, 1990; KATSUKI et al., 2006; RODRIGUES et al., 2007).

Uma diminuição na digestibilidade da FDN, FDA e do amido, além do NDT, com a utilização do PAP foi observada por Marino (2008). Como o PAP atua contra as bactérias proteolíticas, isso pode acarretar numa menor disponibilidade de nitrogênio amoniacal, que é necessário para as bactérias celulolíticas degradarem a fibra, causando, assim, a diminuição da digestibilidade destas frações (MARINO et al., 2011).

Em animais suplementados com PAP, a incidência de rumenites foi menor quando comparado a um grupo suplementado com monensina, sem apresentar diferença significativa em relação ao desempenho em confinamento (MILLEN et al., 2007). A manutenção da saúde das papilas ruminais é importante para que ocorra a absorção de AGCC, promovendo a saúde e desempenho animal com menores riscos de acidose e abscesso hepáticos. Em estudo, DiLorenzo et al. (2008) afirmam que o uso de um PAP contra *F. necrophorum* (bactéria envolvida no processo de abscessos) diminuiu a severidade dos abscessos, porém diminuiu o rendimento de carcaça. Já o uso de um PAP contra *S. bovis* elevou a eficiência alimentar.

Em relação à superfície de absorção da parede ruminal, a inclusão do PAP contra as bactérias *S. bovis*, *F. necrophorum*, *Lactobacillus spp.*, *E. coli* e endotoxinas na dieta não surtiu efeito. No entanto, a suplementação com monensina aumentou a superfície de absorção da parede ruminal quando comparado ao grupo que não recebeu monensina (SARTI et al., 2009).

Em estudo com adaptação de novilhos a dietas com alto teor de concentrado, Blanch; Calsamiglia; DiLorenzo (2006) relataram a efetividade do PAP em reduzir o risco a acidose, pois, mesmo os animais tendo apresentado valor mais elevado na concentração de AGCCt, apresentaram valor mais elevado de pH ruminal e maior concentração de acetato.

Menor aumento no volume de células do sangue foi relatado por Shu et al. (2000), ao testar anticorpos policlonais em animais recebendo 90% de concentrado. Isto representa menor perda de fluido intravascular, o que é associado a pH sanguíneo mais elevado, o qual reflete em maiores excessos de bases e bicarbonatos no sangue, que implica em controle homeostático mais eficiente e menor risco de acidose ruminal e metabólica.

Corroborando com o estudo anterior, Millen (2008) conclui que os preparados de anticorpos são eficientes em controlar a acidose metabólica em bovinos jovens recebendo dietas com alta proporção de grãos, levando em conta que os valores de perfil metabólico sanguíneo ficaram dentro dos níveis normais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E INSTALAÇÕES

O projeto de pesquisa foi conduzido na Faculdade de Medicina e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP), Campus de Pirassununga, São Paulo. O mesmo foi realizado seguindo os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética no Uso de Animais”, aprovado em reunião de 11/08/2010, sob o número de protocolo 1982/2010.

Foram utilizadas seis fêmeas bovinas, não gestantes e não lactantes com peso vivo médio de $746,7 \pm 87,4$ kg e portadoras de cânula ruminal com 10 cm de diâmetro e 7,5 cm de espessura. Os animais foram mantidos em galpão coberto, com piso de concreto, baias individuais providas com cama de areia para descanso, com cochos de cimento e bebedouros automáticos comuns a cada duas baias.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E TRATAMENTOS

O delineamento experimental utilizado foi o quadrado latino 3x3 duplicado, num arranjo fatorial 3x2, contendo dois aditivos (PAP em apresentação em pó - PAPP e PAP em apresentação líquida - PAPL) e mais um grupo controle (CON) e dois manejos de adaptação à dieta, resultando em seis tratamentos.

O primeiro quadrado latino foi submetido a um protocolo de adaptação à dieta do tipo gradual ou “step-up”: dos dias D0 a D4 os animais receberam 100% de forragem; do D5 ao D9 receberam 30% de concentrados e do D10 a D14 60% de concentrados. O segundo quadrado latino recebeu 100% de forragem do D0 ao D14 (sem adaptação). No D15 e D16, todos os animais receberam dieta com 80% de concentrado.

O experimento consistiu de três períodos, com 23 dias cada, com duas fases de descanso, com 10 dias cada, totalizando 89 dias de experimento.

Em cada quadrado foi fornecido, via cânula ruminal, duas vezes por dia, o aditivo, sendo um grupo controle, outro com PAPP (CAMAS Inc®) na dose de 7 g/animal/dia e outro com PAPL (CAMAS Inc®) na dose de 21 mL/animal/dia. O preparado em pó foi acondicionado em envelopes confeccionados em papel absorvente, com 3,5g para cada dose. Já o preparado líquido foi administrado diretamente com o auxílio de uma seringa de 20 mL BD® graduada em 10,5 mL para cada dose. Este volume de 21 mL/animal/dia corresponde aos 7 g diárias do PAPP, já que a matéria seca da forma líquida é de 30%.

O preparado de anticorpos policlonais (CAMAS Inc®) utilizado foi uma mistura de anticorpos contra bactérias ruminais específicas *S. bovis*, *F. necrophorum* e *Lactobacillus* sp.

Os esquemas abaixo representam os tratamentos experimentais adotados:

Tratamento 1: controle (sem adição do preparado de anticorpos policlonais).

Tratamento 2: adição do preparado de anticorpos policlonais na apresentação pó (CAMAS Inc®) na dose de 7g/animal/dia.

Tratamento 3: adição do preparado de anticorpos policlonais na apresentação líquida (CAMAS Inc®) na dose de 21 mL/animal/dia.

Quadro 1 - Esquema do delineamento experimental em dois quadrados latinos 3 x 3 com arranjo fatorial de tratamentos 3 x 2

ANIMAL	Dietas de alto concentrado					
	Com adaptação			Sem adaptação		
	1	2	3	4	5	6
Período I	C	PP	PL	PL	PP	C
Período II	PP	PL	C	PP	C	PL
Período III	PL	C	PP	C	PL	PP

Modificadores: C: controle, PP: PAP apresentação pó, PL: PAP apresentação líquida.

O programa de alimentação (com adaptação) do 1º quadrado foi:

O programa de alimentação (sem adaptação) do 2º quadrado foi:

4.3 MANEJO NUTRICIONAL

Os animais foram alimentados duas vezes ao dia, às 08:00h e às 16:00h, com dieta na forma de ração completa. No primeiro quadrado os animais passaram por um protocolo de adaptação, onde a cada 5 dias a proporção de concentrados era aumentada. Desta forma, nos primeiros cinco dias era fornecida alimentação com 100% forragem, nos cinco dias seguintes a proporção volumoso:concentrado passava para 70:30, nos próximos cinco dias a proporção passava para 40:60 e nos dias seguintes os animais recebiam a dieta desafio que consistia de um proporção de volumoso:concentrado de 20:80.

Em todas as dietas, a fonte de volumoso utilizada foi a cana-de-açúcar fresca e picada, com tamanho médio de partícula de 1,18 cm, sendo este determinado pela Penn State Particle Size Separator, conforme metodologia proposta por Lammers; Buckmaster; Heinrich (1996). O concentrado era constituído por milho moído, farelo de soja, uréia, sal branco e mistura mineral. As proporções dos diversos ingredientes da dieta e a composição bromatológica da mesma está descrita na Tabela 1. A dieta foi formulada segundo o software Spartan (1992) e avaliada com o programa NRC (2001).

Tabela 1 - Proporções de ingredientes e composição bromatológica estimada da dieta experimental, com base na matéria seca (%)

	Dietas (% de concentrado)			
	0 ¹	30 ¹	60 ¹	80 ¹
Ingredientes				
Cana de açúcar	93,4	70,0	40,0	20,0
Milho Fubá	-	12,5	46,9	70,2
Farelo soja	-	13,5	9,1	5,8
Uréia	4,1	1,5	1,5	1,5
Sal branco	0,5	0,5	0,5	0,5
Mistura mineral ²	2,0	2,0	2,0	2,0
Composição química				
Matéria seca (%)	33,2	46,8	64,6	76,3
Proteína bruta (%MS)	14,0	14,0	14,0	14,0
Proteína degradável no rúmen (% PB)	95,0	76,4	75,4	76,4
Proteína não-degradável no rúmen (%PB)	5,0	23,8	24,6	23,6
Fibra em detergente neutro (% MS)	54,1	44,4	31,2	22,3
FDN de forragem (% FDN)	54,1	40,7	23,3	11,6
Carboidratos não estruturais (% MS)	26,1	35,3	48,2	57,0
NDT (%)	54,8	62,7	71,6	77,2
Cálcio (% MS)	0,84	0,78	0,63	0,53
Fósforo (% MS)	0,40	0,47	0,43	0,45

¹Formuladas pelo Spartan (1992) e avaliadas e ajustadas no NRC (2001).

²Mistura mineral e vitamínica, quantidade por kg de produto: 180 g de cálcio, 130 g de fósforo, 100 mg de cobalto, 1.250 mg de cobre, 2.200 mg de ferro, 90 mg de iodo, 2.000 mg de manganês, 15 mg de selênio, 5.270 mg de zinco e 1.300 mg de flúor (máximo).

4.4 PREPARADO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

Foram utilizados procedimentos similares aos descritos por DiLorenzo; Diez-Gonzalez; DiCostanzo (2006) para a geração dos PAPs, com a exceção de que um PAP multivalente foi testado, ao invés de preparados específicos, como descrito anteriormente. Os anticorpos policlonais foram produzidos pela CAMAS Inc. (Le Center, MN, USA). O produto comercial contém 46,0% de imunoglobulinas contra *Streptococcus bovis* (ATCC 9809), 23,0% contra *Fusobacterium necrophorum* (ATCC 27852), 15,4% contra *E. coli* O157:H7 e o restante 15,4% contra endotoxinas.

Durante um processo de acidose, *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus SSP* são as espécies bacterianas que mais produzem ácido láctico, *Fusobacterium necrophorum* é o causador de abscessos hepáticos. A *E. coli* é um patógeno para humanos que habita o

rúmen e as endotoxinas são polissacarídeos presentes em paredes bacterianas ruminais gram-negativas, que são liberadas quando há morte bacteriana, podendo debilitar o sistema imune do animal hospedeiro.

O PAPP foi obtido do mesmo produto que originou o PAPL, diferindo deste somente pelo fato de ter sido submetido à secagem pelo processo de SPRAY-DRYER, sendo mantido em embalagens hermeticamente fechadas durante todo o período experimental, ficando protegido de luz solar e calor. Já o PAPL foi mantido sempre resfriado entre 2 e 8 graus centígrados, ao abrigo de luz solar.

4.5 COLHEITA DE AMOSTRAS E MÉTODOS LABORATORIAIS

Amostras de fluido ruminal foram coletadas durante os dias 15 e 16 de cada período, via cânula ruminal, com auxílio de bomba a vácuo nas horas 0, 3, 6, 9, 12, 24, 27, 30 e 36, sendo a hora 0 imediatamente anterior ao fornecimento de alimento. Durante esse período, o fornecimento de alimento foi realizado às 7 horas e 19 horas. A cada coleta foi coletado fluido ruminal de 3 diferentes regiões do rúmen, sendo homogeneizado para que se obtivesse aproximadamente 500 mL que representassem todo conteúdo ruminal. O excedente era devolvido imediatamente ao pró-ventrículo.

Imediatamente após a coleta, 100 mL do fluido ruminal eram usados para determinação de pH, com um medidor digital de pH portátil (HANNA instruments HI8424), calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e pH 7,0.

Para determinação de ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato) aproximadamente 100 mL de fluido ruminal foi centrifugado a 2000 rotações por minuto por 20 minutos. 2 mL do sobrenadante foi colocado em tubo de ensaio arrolhado, sendo acondicionado com 0,4 mL de ácido fórmico e mantido em congelador (-20 °C) até o momento da análise. Esta foi realizada através de cromatografia gasosa, segundo método descrito por Erwin; Marco; Emery (1961). Foi utilizado cromatógrafo a gás (Thermo Scientific®, modelo Focus GC) com injetor automático de amostras (Thermo Electron Corporation®, modelo AS-3000) equipado com coluna de vidro de 2 m de comprimento e 1/5 de polegada (5,08 mm) de diâmetro externo, empacotada com fase estacionária 80/120

Carbopack[®] B-DA/4% Carbowax[®] 20M (Supelco[®]) e detetor de ionização de chama (FID) mantido à 270°C. O forno do cromatógrafo a gás foi mantido a 190°C durante as análises e a temperatura do injetor foi de 220 °C. O gás de arraste foi o H₂ de alta pureza, mantido em fluxo de 30 mL/min. O número de repetições por amostra foi aquele necessário para que a diferença entre leituras fosse inferior a 5%.

A concentração de ácido láctico total foi mensurada pela técnica colorimétrica, segundo Pryce (1969).

Para determinação da concentração de nitrogênio amoniacal (NH₃-N), 2 mL do sobrenadante foi adicionado a solução 1 N de H₂SO₄ e imediatamente congelados até análise calorimétricas, de acordo com as descritas por Kulasek (1972) e adaptadas por Foldager (1977).

4.5.1 Contagem total e diferencial de protozoários ruminais

Para determinação da contagem total e diferencial de protozoários do rúmen, a coleta de conteúdo ruminal ocorreu no dia 16 de cada período, sempre às 3h após a alimentação. 10 mL do material coletado do rúmen foram armazenados em frascos com 20 mL de formaldeído 50% (v/v). Foi utilizado 1 mL de amostra diluída em formol e adicionadas 2 gotas de verde brilhante a 2%, deixando repousar por 4 h. Em seguida, foram adicionados 9 mL de glicerol a 30% e, então, homogeneizada a mistura, tornando a alíquota do líquido ruminal diluída 30 vezes.

Utilizou-se câmara de contagem “Sedgwick-Rafte” composta por retículo de 0,5 mm X 0,5 mm de área, com subdivisões de 25 quadrículos. Esta câmara foi acoplada à ocular de microscópio da marca Olympus modelo CH2, conforme técnica descrita por Dehority (1993).

Com a câmara acoplada ao microscópio foram contados 100 campos óticos, através do retículo, com aumento de 100 X. Do total de protozoários, foram diferenciados cinco gêneros: *Isotricha*, *Dasytricha*, *Epidinium*, *Entodinium* e *Diplodinium*.

4.5.2 Determinação da concentração de haptoglobina (Hp)

As amostras de sangue foram colhidas com a utilização do Vacutainer[®] (BD-Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ USA) (sistema de coleta de sangue por vácuo), contendo heparina sódica como anticoagulante. A veia utilizada para a colheita foi a veia caudal. As amostras foram colhidas uma vez ao dia, às 0800 h da manhã, antes da alimentação, no dia 17 de cada período experimental. Foi colhida uma amostra de sangue com 10 mL cada e mantida em gelo até ser centrifugada a 3000 x g e 4 °C por 20 min para separar o plasma. As amostras de plasma foram armazenadas a -20 °C até o momento das análises.

A Hp foi determinada por meio da utilização do teste de ELISA ALPCO IMUMUNOASSAYS; números de catálogo 41-HAPBO-E01. O plasma foi diluído na concentração de 1:10 com solução tampão fosfato salina e centrifugado. Uma alíquota (100 µL) de plasma diluído foi colocado em duplicata na placa de microtitulação. O conjugado enzima-anticorpo foi adicionado em 100 µL à amostra já no poço da placa. Foi pipetado 100 µL da solução de substrato cromogênico em temperatura ambiente.

A absorbância foi lida após 10 min. em 450nm usando uma leitora de microplacas (Multiskan FC - marca: Thermo Scientific).

5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram analisados pelo programa Statistical Analysis Systems (SAS Inst., Inc., Cary, NC), após a normalidade ser verificada pelo teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE). O modelo inclui os efeitos de aditivo alimentar, adaptação e interação entre aditivo e adaptação como efeitos fixos. Os efeitos de período e animais dentro de quadrado foram considerados efeitos aleatórios. As variáveis pH ruminal, concentração total e proporção molar de AGCC, lactato e concentração de $\text{NH}_3\text{-N}$ foram analisados pelo procedimento MIXED do SAS como medidas repetidas. O modelo representou os mesmos efeitos descritos acima mais o tempo e suas interações com aditivo e adaptação. Os efeitos de animal dentro de quadrado, período, interação entre período e tempo, bem como a interação entre tempo e animal dentro de quadrado foram considerados efeitos aleatórios. A seleção da melhor matriz que se ajustava aos dados foi realizada pelo método AICC. O nível de significância adotado para os resultados das variáveis estudadas foi de 5%. Os efeitos foram separados pelo teste de Tukey.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para pH ruminal, houve interação entre tempo de coleta e tipo de adaptação ($P<0,0001$). Nas horas 0, 3, 6, 9, 12 e 36 pós-alimentação, o grupo sem adaptação teve valores mais altos em relação ao grupo com adaptação (7,13 vs. 6,45; 6,92 vs. 6,30; 6,78 vs. 6,22; 6,57 vs. 6,06; 5,95 vs. 5,78 e 6,08 vs. 5,94, respectivamente). Às 24 horas pós-alimentação, o inverso foi observado (5,97 vs. 6,26, respectivamente).

Figura 2 - Valores de pH dos grupos com e sem adaptação (a.) e dos grupos conforme o aditivo fornecido (b.), durante todo o período de coleta de dados

Não foi observado efeito de aditivo para essa variável. O fornecimento de dietas com alta proporção de carboidratos fermentescíveis à animais que vinham de uma dieta de forragem aumenta a disponibilidade de glicose livre no rúmen e estimulam o crescimento de bactérias ruminais, aumentando, assim, a produção de AGCC e diminuindo o pH, porém essa mudança não é imediata (OWENS et al., 1998).

No atual experimento, o grupo sem adaptação apresentou valores maiores de pH ($P<0,05$) nas primeiras 12 horas. Isto pode ter ocorrido devido ao outro grupo estar em uma dieta com adição gradual de concentrado. Portanto, já estariam com o pH diminuído pela dieta. Na coleta das 24 horas, o grupo sem adaptação obteve valores de pH menores ($P<0,05$). Isto indica uma queda mais brusca do pH por parte deste grupo. Nas coletas

subsequentes, os valores de pH foram mais próximos entre os dois grupos. Segundo Nagaraja e Titgemeyer (2007), um animal é considerado com acidose aguda, entre outros parâmetros, quando seu pH ruminal chega a 5,0, ou menores níveis, e com acidose subaguda quando seu pH ruminal fica entre 5,0 e 5,5. No caso do presente experimento, o menor pH mensurado foi de 5,71 na coleta das 12 horas nos animais submetidos à adaptação e que não receberam aditivo algum. Portanto, conclui-se que não houve qualquer caso de acidose no presente experimento, levando em conta o pH.

Para concentração total dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCCt), foi observado interação entre tempo e adaptação ($P<0,0001$). O grupo que recebeu adaptação obteve valores maiores que o grupo sem adaptação nas horas 0, 3, 6, 9 e 36 (105,72 vs. 68,07; 107,25 vs. 80,75; 106,83 vs. 85,35; 117,71 vs. 94,53 e 121,11 vs. 107,62, respectivamente). Nas horas 24 e 27 ocorreu o contrário (121,60 vs. 133,67 e 107,89 vs. 121,13).

Figura 3 - Concentração de AGCCt dos grupos com e sem adaptação (a.) e dos grupos conforme o aditivo fornecido (b.), durante todo o período de coleta de dados

De acordo com alguns autores (FULTON; KLOPFENSTEIN; BRITTON, 1979; GOAD; GOAD; NAGARAJA, 1998; BEVANS et al., 2005), a concentração de AGCCt esperada em animais recebendo dietas com alta proporção de carboidratos prontamente fermentescíveis (70-90% de concentrados) é em torno de 100 a 160 mM. No presente estudo, o grupo adaptado obteve maiores valores de concentração de AGCCt no início do

desafio, provavelmente resultado da prévia introdução de carboidratos prontamente fermentescível na dieta desses animais. No entanto, depois de 12 horas do início do desafio, os resultados foram invertidos até as 33 horas quando, a situação volta a ficar como no início. Enquanto o grupo de animais adaptados apresentou valores mais estáveis, o grupo sem adaptação apresentou um rápido aumento na concentração total de AGCC.

Para a concentração molar de acetato também foi verificada interação entre tempo e adaptação ($P < 0,0001$). Os animais adaptados tiveram valores maiores que os não adaptados nas horas 0, 3, 6, 9 e 36 (68,70 vs. 45,87; 66,41 vs. 50,27; 66,27 vs. 52,91; 69,99 vs. 57,00; 72,01 vs. 63,55 respectivamente). Para proporção molar de acetato foi verificada interação entre tempo e adaptação ($P < 0,0001$). Na hora 0 pós-alimentação, o grupo não adaptado teve maiores valores que o grupo adaptado (67,22 vs. 65,06, respectivamente). Nas horas 24, 27 e 30, o grupo adaptado obteve maiores valores que o grupo não adaptado (64,25 vs. 58,59; 62,51 vs. 58,79; 61,42 vs. 59,34 respectivamente).

Quanto ao efeito de aditivo, não foi verificada interação de nenhum tipo, nem na proporção e nem na concentração desse ácido.

Figura 4 - Concentração molar de acetato dos grupos com e sem adaptação (a.) e dos grupos conforme o aditivo fornecido (b.); proporção molar de acetato dos grupos com e sem adaptação (c.) e dos grupos conforme o aditivo fornecido (d.), durante todo o período de coleta de dados

Ao analisarmos as concentrações juntamente à proporção molar do acetato, podemos observar uma inversão de valores. A proporção diminui com o passar do tempo enquanto a concentração aumenta, no geral, sendo que a concentração de acetato no grupo de animais adaptado se mantém mais estável. Essa diminuição na proporção molar de acetato é reflexo do substancial aumento da concentração de ácido propiônico.

Goad; Goad; Nagaraja (1998) compararam animais adaptados a duas condições de dieta, uma dieta com alta proporção de forragens (20% de concentrados) e outra com alta

proporção de concentrados (80%) e ambos os grupos desafiados com uma dieta com 100% de concentrados. Os autores observaram que a proporção de acetato em ambos os tratamentos diminuiu, o que corrobora com o presente estudo, onde se observou o decréscimo na proporção de acetato em ambos os grupos.

Para concentração de propionato também houve efeito de adaptação ($P<0,0001$), onde nas primeiras horas (horas 0 e 3) o grupo adaptado obteve valores mais altos (20,73 vs. 14,85; 23,31 vs. 19,88) e nas horas 12, 24, 27 e 30, foi o grupo sem adaptação que apresentou maiores valores (33,60 vs. 27,27; 31,90 vs. 21,38; 28,31 vs. 20,08; 25,94 vs. 21,17).

Interação entre tempo e adaptação ($P<0,0001$) foi verificada para proporção molar de propionato. O grupo sem adaptação obteve maiores valores quando comparado ao grupo adaptado das 3 horas pós-alimentação até as 36 horas pós-alimentação (24,66 vs. 21,80; 24,26 vs. 21,25; 25,17 vs. 22,63; 26,29 vs. 21,46; 23,92 vs. 17,61; 23,48 vs. 18,53; 23,03 vs. 19,15; 22,97 vs. 20,28; 23,47 vs. 20,48, respectivamente).

Figura 5 - Concentração molar de propionato dos grupos com e sem adaptação (a.) e dos grupos conforme o aditivo fornecido (b.); Proporção molar de propionato dos grupos com e sem adaptação (c.) e dos grupos conforme o aditivo fornecido (d.), durante todo o período de coleta de dados

Para o efeito de aditivo não foi encontrada interação de qualquer tipo. Em estudo com dietas de adaptação, Bevans et al. (2005) observaram que a proporção molar de propionato aumentou quando os animais receberam uma dieta intermediária, com 65% de concentrados. O aumento na proporção desse AGCC melhora a eficiência energética do processo digestivo, já que o propionato tem mais ligações carbono-hidrogênio na composição, quando comparado ao acetato e butirato (NUSSIO et al., 2006). O aumento na

proporção de propionato em animais consumindo dietas com alta proporção de concentrados também pode ser explicado pelo aumento na população de *Selenomonas ruminantium* que foi de 7 vezes maior em estudo de Brown; Ponce; Pulicanti (2006) e de 30 vezes maior em estudo de Fernando et al. (2010). Este microrganismo, juntamente com *Megasphaera elsdenii*, são os maiores produtores de propionato e usam tanto carboidratos fermentáveis como lactato como substrato e, assim, podem controlar a acidose.

Interação significativa ($P<0,0001$) entre tempo e adaptação foi verificada para relação acetato:propionato (Ac:Pr), com diferenças nas horas 6, 12, 24, 27, 30 e 36 pós-alimentação, quando o grupo adaptado obteve valores maiores quando comparado ao grupo sem adaptação (2,97 vs. 2,56; 2,84 vs. 2,25; 3,72 vs. 2,46; 3,42 vs. 2,51; 3,24 vs. 2,59 e 2,95 vs. 2,53).

Figura 6 - Relação Ac:Pr dos grupos com e sem adaptação (a.) e dos grupos conforme o aditivo fornecido (b.), durante todo o período de coleta de dados

Goad; Goad; Nagaraja (1998) observaram que animais adaptados a dieta de forragem que sofre um abrupto aumento na concentração de concentrados, tiveram uma queda na relação de Ac:Pr de 5,5 na hora 0 do desafio para 1,4 após 72 horas em dietas com 100% de concentrados. Entretanto, em animais adaptados a dietas com alta proporção de concentrados, a relação Ac:Pr decresceu de 3,8 na hora 0 para 0,9 na hora 72 depois de uma dieta desafio com 100% de concentrados. Este valor de 0,9 na relação Ac:Pr ocorreu quando o pH ruminal estava abaixo de 5,5, um indicativo de que as vias metabólicas de

produção de propionato são estimuladas quando o pH está abaixo de 5,6. No presente estudo, a relação de Ac:Pr não chegou a valores tão baixos, provavelmente devido ao curto período de amostragem adotado e pelos valores de pH que não decresceram de 5,7. É interessante observar que para os animais não adaptados, a relação ac:pr caiu de 3 para próximo de 2 e assim se manteve, enquanto que nos adaptados a relação caiu nas primeiras 12 horas, mas se recuperou nas horas subsequentes.

Para a concentração de butirato houve interação ($P<0,0001$) entre tempo e adaptação, onde o grupo de animais com adaptação teve valores superiores ao grupo sem adaptação nas horas 0, 3, 6, 9, 12, 33 e 36 (16,29 vs. 7,69; 17,52 vs. 10,60; 17,88 vs. 11,75; 21,11 vs. 13,72; 23,01 vs. 18,75; 22,57 vs. 19,14; 24,18 vs. 18,81, respectivamente).

Uma significativa interação ($P=0,0081$) entre tempo e adaptação foi verificada para a variável proporção molar de butirato, com diferenças nas horas 0, 3, 6, 9, 12, 33 e 36 pós início da coleta, sendo que o grupo adaptado teve maiores valores que o outro grupo (15,29 vs. 11,24; 16,33 vs. 13,06; 16,70 vs. 13,70; 17,93 vs. 14,49; 18,09 vs. 14,61; 19,88 vs. 17,42; 19,81 vs. 17,27, respectivamente).

Figura 7 - Concentração molar de butirato dos grupos com e sem adaptação (a.) e dos grupos conforme o aditivo fornecido (b.); proporção molar de butirato dos grupos com e sem adaptação (c.) e dos grupos conforme o aditivo fornecido (d.), durante todo o período de coleta de dados

Também foi observada interação entre tempo e aditivo ($P=0,0430$) para proporção molar de butirato. Porém, quando a análise foi feita por tempo, nenhum efeito de aditivo foi observado. O aumento na proporção molar de butirato em animais recebendo dietas com alta proporção de concentrados está associado com o crescimento de bactérias utilizadoras de lactato, principalmente *Megasphaera elsdenii*, principal produtor de butirato a partir do lactato. O protozoário *Butyivibrio fibrisolvens* é um produtor de butirato

durante a fermentação primária e é considerado um dos prevalentes durante a adaptação a dietas ricas em concentrados (HUNGATE, 1978). Por isso, animais recebendo dieta com 100% de forragem apresentam menores valores ao início do desafio.

Para o lactato não foi observado efeito ($P>0,05$) de interação entre tempo e aditivo alimentar, tempo e adaptação ou aditivo e adaptação.

Figura 8 - Proporção molar de lactato dos grupos com e sem adaptação (a.), e dos grupos conforme o aditivo fornecido (b.), durante todo o período de coleta de dados

O pH de 5,5 é considerado, por alguns autores (SLYTER, 1976; NAGARAJA, 2003), o limiar acima do qual bactérias produtoras de lactato, como *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus ssp.*, se proliferam. Simultaneamente, o crescimento de bactérias utilizadoras de lactato (*Megasphaera elsdenii* e *Selenomonas ruminantium*) é inibido (RUSSELL; HINO, 1985). Portanto, independente da dieta, quando o pH ruminal decresce abaixo de 5,5 é esperado um aumento no nível de lactato. Como no atual experimento não houve pH ruminal abaixo de 5,5, o nível de lactato não foi aumentado.

Interação significativa ($P<0,0001$) entre tempo e adaptação foi observada para a concentração ruminal de nitrogênio amoniacal ($\text{NH}_3\text{-N}$). O grupo sem adaptação obteve valores maiores que o grupo com adaptação às 6 horas pós-alimentação (26,11 vs. 19,27, respectivamente). Nas horas 9, 30, 33 e 36 pós-alimentação, foi o grupo adaptado que teve os maiores valores (31,31 vs. 24,20; 19,42 vs. 12,67; 23,41 vs. 14,52; 22,20 vs. 12,15, respectivamente).

Figura 9 - Proporção molar de nitrogênio amoniacal dos grupos com e sem adaptação (a.) e dos grupos conforme o aditivo fornecido (b.), durante todo o período de coleta de dados

Não foi observado efeito de aditivo ($P>0,05$) para essa variável, o que corrobora com estudos de Bastos (2009) e Blanch et al. (2009). A concentração de nitrogênio amoniacal encontrada no rúmen, tanto dos animais adaptados como nos não adaptados, foi de 18,92 mg/dL, concentração, esta, acima da preconizada por Santos (2006) para maximizar a síntese microbiana em dietas com alto teor de carboidratos de alta degradabilidade, que varia de 3,3 a 8 mg/dL.

Para a contagem diferencial de protozoários houve efeito de adaptação ($P=0,0236$) para o *Entodinium*, onde o grupo com adaptação obteve valor de 92,39% em relação ao total dos protozoários mensurados, enquanto o grupo sem adaptação apresentou o valor de 75,50%. Este achado corrobora com Arcuri; Lopes; Carneiro (2006), que também relataram aumento na população de *Entodinium* quando os animais são submetidos à dietas ricas em amido.

Esses resultados também corroboram com os achados de Carvalho (2011), onde a espécie *Entodinium* apresentou correlação positiva e negativa com o NDT e FDN, respectivamente. Os animais com adaptação vinham, no período imediatamente anterior ao desafio, com uma dieta com maior NDT e menor FDN, o que pode ter promovido o crescimento dessa espécie mais precocemente.

Não foi observado efeito de aditivos ($P>0,05$) para a contagem total ou diferencial dos protozoários. Otero (2008), comparando o efeito do PAP e da monensina, observou efeito do PAP sobre a população de *Isotricha*, onde o grupo recebendo o PAP apresentou maior contagem relativa deste gênero em relação a um grupo controle. O grupo tratado com monensina não diferiu dos outros dois grupos. O autor explica que este efeito pode ter sido causado pelo fato de o PAP ter diminuído o número de bactérias acidificadoras do meio, tornando o ambiente favorável ao crescimento de bactérias e também destes protozoários que possuem elevada taxa de crescimento.

Figura 10 - Contagem diferencial de protozoários em animais adaptados à dietas com alta proporção de carboidratos fermentescíveis (a.); em animais não adaptados à dieta com alta proporção de carboidratos fermentescíveis (b.); em animais que não receberam aditivo algum (c.); em animais que receberam o aditivo PAP líq (d.) e em animais que receberam o aditivo PAP pó

a.

População de protozoários em animais adaptados

b.

População de protozoários em animais não adaptados

c.

População de protozoários em animais que não receberam aditivo

d.

População de protozoários em animais que receberam PAP líq

e.

População de protozoários em animais que receberam PAP pó

Para a mensuração de haptoglobina não houve efeito de aditivo ($P=0,9700$) ou de adaptação ($P=0,8573$). Os valores ficaram dentro da normalidade (menos que 50ug/mL), não apresentando valores que indicassem qualquer tipo de distúrbio metabólico, como, por exemplo, acidose.

Figura 11 - Valor da concentração plasmática de haptoglobina em animais adaptados ou não à dietas com alta proporção de carboidratos fermentescíveis (a.) e para os fatores compostos por diferentes aditivos alimentares (b.)

a.

b.

As proteínas de fase aguda, como a haptoglobina (Hp), podem ser indicadores de inflamação causada em animais (ALSEMGEEST et al., 1994). O valor basal de haptoglobina em bovinos é <50ug/mL (HUMBLET et al., 2006), sendo esta proteína não

detectada em alguns casos. Concentrações acima de 200 ug/mL sugerem infecção precoce ou leve em bovinos (SKINNER et al.,1991).

Em estudo conduzido por Ghozo et al. (2005), os valores de Hp em novilhos, previamente adaptados à dieta de forragem, recebendo dietas com 47 a 56% de MS, variaram de 430 ug/mL a 790 ug/mL. Em estudo posterior do mesmo grupo, no qual os animais foram adaptados a uma dieta com 60% de concentrados por 4 semanas, o valor de Hp foi de 540 ug/mL a 2.390 ug/mL. Nos dois casos, a dieta consistia em trigo e cevada em peletes e feno de alfafa picada afim de causar um distúrbio ruminal.

Emmanuel et al. (2008) ,ao utilizar em quatro dietas, sendo uma apenas com feno de alfafa e outros três níveis crescentes de cevada, com máximo de 45%, não obtiveram efeito de tratamento, sendo que, em todos, os níveis de Hp ficaram acima do valor preconizado por Skinner et al. (1991), para se considerar infecção.

No atual experimento, os valores de haptoglobina ficaram bem abaixo dos quais se espera para animais com inflamação proveniente de acidose. Isso pode ter ocorrido pela dieta fornecida, que, apesar de chegar a ter 80% de concentrados, seus ingredientes não foram efetivos em produzir AGCC suficientes para agredir o trato digestivo do animal, isto também pode ser explicado por causa do volumoso empregado, que foi a cana-de-açúcar, que contém alto teor de fibra efetiva.

7 CONCLUSÕES

Sob as condições experimentais do presente estudo, foi possível concluir que os anticorpos policlonais não alteraram os parâmetros ruminais estudados quando os animais foram submetidos à mudança abrupta de uma dieta rica em forragem para uma dieta de alto teor de concentrados ou quando os animais sofreram uma adaptação gradual a essa dieta rica em concentrados. Entretanto, foi possível demonstrar a importância de uma adaptação adequada à dietas com alta proporção de carboidratos altamente fermentescíveis, como uma ferramenta de controle para distúrbios ruminais provenientes de mudanças de dietas muito rápidas por manter as condições do ambiente ruminal mais estáveis.

REFERENCIAS

- ALLEN, M. S. Physical constraints on voluntary intake of forages by ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 12, p. 3063-3075, 1996.
- ALSEMGEEST, S. P.; KALSBECK, H. C.; WENSING, T.; KOEMAN, J. P.; VAN EDEREN, A. M.; GRUYS, E. Concentrations of serum amyloid-A (SAA) and haptoglobin (HP) as parameters of inflammatory diseases in cattle. **Vet Q Journal**, v. 16, p. 21-23. 1994.
- ALVES, R. G. O.; Apresentação. Boas práticas agropecuárias – bovinos de corte / Editor técnico Ezequiel Rodrigues do Valle. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2007. 86 p.
- ARCURI, P. B.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. C. microbiologia do rúmem. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. p. 111-140.
- BARDUCCI, R. S.; SARTI, L. M. N.; ARRIGONI, M. D. B.; PACHECO, R. D. L.; MILLEN, D. D.; MARTINS, C. L.; BALDIN, S. R.; PARRA, F. S.; RONCHESEL, J. R.; TOMAZELLA, D.; LEIVA, T.; H. D. ROSA¹, MARIANI, T. M.; BASTOS, J. P. S. T.; PUTAROV, T. C. Feedlot performance of Brangus cattle fed monensin or polyclonal antibody preparation against lactate- producing rumen bacteria. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, p. 283- 284, 2009. Supplement, 2.
- BASTOS, J. P. S. T. **Efeito de diferentes dosagens do preparado de anticorpos policlonais específicos sobre as variáveis ruminais, degradabilidade in situ e digestibilidade in vivo de bovinos alimentados com dieta de alto concentrado**. 2009. 112 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Botucatu, 2009.
- BERGEN, W. G.; BATES, D. B. Ionophers: their effect on production efficiency and mode of action. **Journal of Animal Science**, v. 58, n. 61, p. 1465-1483, 1984.
- BEVANS, D. W.; BEAUCHEMIN, K. A.; SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K. S.; MCKINNON, J. J.; MCALLISTER, T. A. Effect of rapid or gradual grain adaptation on subacute acidosis and feed intake by feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 5, p. 1116-1132, 2005.
- BLANCH, M.; CALSAMIGLIA, S.; DILORENZO, N. Effects of feeding a polyclonal antibody preparation against *Streptococcus* Boris on rumen fermentation of heifers switched from a high forage to a high concentrate diet. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 128, 2006. Supplement 1.

BLANCH, M.; CALSAMIGLIA, S.; DILORENZO, N.; DICOSTANZO, A.; MUETZEL, S.; WALLACE, R. J. Physiological changes in rumen fermentation during acidosis induction and its control using a multivalent polyclonal antibody preparation in heifers. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 5, p. 1722-1730, 2009.

BLAXTER, K. L. **Energy metabolism of ruminants**. Springfield: Charles C. Thomas, 1962. 329 p.

BROWN, M. S.; PONCE, C. H.; PULIKANTI, R. Adaptation of beef cattle to high-concentrate diets: Performance and ruminal metabolism. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 13, p. E25-E33, 2006. Supplement.

CARVALHO, L. F. P. B.; AMORIM, G. L.; MATOS, D. S.; BATISTA, A. M. V.; MORAES, A. C. A.; CABRAL, A. M. D. Protozoários do rúmen de caprinos submetidos a dietas com casca de soja. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 12, n. 1, p. 244-253, 2011.

CALDWELL, D. R.; KEENEY, M.; VAN SOEST, P. J. Effects of carbon dioxide on growth and maltose fermentation by *Bacteroides amylophilus*. **Journal of Bacteriology**, v. 98, p. 668, 1969.

CLARKE, R. T. J. Protozoa in the rumen ecosystem. In: CLARKE, T. T. J.; BAUCHOP, T. (Ed.). **Microbial ecology of the gut**. New York: Academic Press, 1977. p. 251-275.

CONRAD, H. R.; PRATT, A. D.; HIBBS, J. W. Regulation of Feed Intake in Dairy Cows. I. Change in Importance of Physical and Physiological Factors with Increasing Digestibility¹. **Journal of Dairy Science**, v. 47, n. 1, p. 54-62, 1964.

CORREIO DO BRASIL. Rebanho Brasileiro é o segundo maior do mundo. Correio do Brasil, ano, 11, n. 4694, 2010. Disponível em: <http://correiodobrasil.com.br/rebanho-bovino-brasileiro-e-o-segundo-maior-do-mundo/192661/#.UI64ZpSZkU8>. Acesso em: 20 jun. 2011.

DAHLEN, C. R.; DICOSTANZO, A.; MITTENESS, B. M.; NASH, P.; LARSON, J. E.; DILORENZO, N.; MARX, G. D. Influence of a polyclonal antibody preparation against rumen proteolytic bacteria on rumen fermentation and yield of milk and milk components. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 58, 2003. Supplement, 1.

DAWSON, K. A.; RASMUSSEN, M. A.; ALLISON, M. J. Digestive disorders and nutritional toxicity. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. New York: Blackie Academic and Professional, 1997. p. 633-660.

DEHORITY, B. A. **Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa**. Florida: CRC Press Inc., 1993. 96 p.

DEHORITY, B. A.; ORPIN, C. G. Development of, and natural fluctuation in, rumen microbial population. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. 2nd ed. London: Chapman e Hall, 1997. p. 196-245.

DEHORITY, B. A. Effect of pH on viability of *Entodinium caudatum*, *Entodinium exiguum*, *Epidinium caudatum*, and *Ophryoscolex purkynjei* in vitro. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 339-342, 2005.

DICOSTANZO, A.; CASSADY, J. M.; ZEHNDER, C. M. Utilization of approved feed additives in growing, finishing and replacement beef cattle diets. In: MINNESOTA NUTRITION CONFERENCE, 57., 1996, Bloomington, MN. **Proceeding...** Bloomington: University of Minnesota, 1996. p. 81-96.

DILorenzo, N.; Diez-Gonzalez, F.; Dicostanzo, A. Effects of feeding polyclonal antibody preparations on ruminal bacterial populations and ruminal pH of steers fed high-grain diets. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 8, p. 2178-2185, 2006.

DILorenzo, N.; Dahlen, C. R.; Diez-Gonzalez, F.; Lamb, G. C.; Larson, J. E.; Dicostanzo, A. Effects of feeding polyclonal antibody preparations on rumen fermentation patterns, performance, and carcass characteristics of feedlot steers. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 11, p. 3023-3032, 2008.

DONOHU, A. L. Biochemical Studies on the Fate of Monensin in Animals and in the Environment. **Journal of Animal Science**, v. 58, n. 6, p. 1528-1539, 1984.

ERWIN, E. S.; MARCO, G. J.; EMERY, E. M. Volatile fatty acids analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 44, n. 9, p. 1768- 1771, 1961.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. The State of Food Insecurity in the World 2004: monitoring progress towards the World Food Summit and Millennium Development Goals. Summary report. 2004. 43 p. Disponível em: < <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5650e/y5650e00.pdf> >. Acesso em: 20 abr. 2011.

FAO FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Produção pecuária e animal. 2012. Disponível em: < http://translate.google.com/translate?hl=pt-BR&prev=/search%3Fq%3Dfao%26hl%3DptBR%26biw%3D1280%26bih%3D675%26prmd%3Divns&rurl=translate.google.com&sl=en&u=http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/animal_production.html >. Acesso em: 25 set. 2012.

FERNANDO, S. C.; PURVIS II, H. T.; NAJAR, F. Z.; SUKHARNIKOV, L. O.; KREHBIEL, C. R.; NAGARAJA, T. G.; ROE, B. A.; DESILVA, U. Rumen Microbial Population Dynamics during Adaptation to a High-Grain Diet. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 22, p. 7482-7490, 2010.

FLINT, H. J.; BISSET, J. Genetic diversity in *Selenomonas ruminantium* isolated from the rumen. **FEMS Microbiology and Ecology**, v. 73, p. 351, 1990.

FOLDAGER, J. **Protein requirement and non protein nitrogen for high producing cow in early lactation**. 1997. Xx p.Tese (Doutorado). Michigan State University, East Lasing, MI 1977.

FRANZOLIN, R.; DEHORITY, B. A. Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 11, p. 2803-2809, 1996.

FULTON, W. R.; KLOPFENSTEIN, T. J.; BRITTON, R. A. Adaptation to High Concentrate Diets by Beef Cattle. II. Effect of Ruminal pH Alteration on Ruminal Fermentation and Voluntary Intake of Wheat Diets. **Journal of Animal Science**, v. 49, n. 3, p. 785-789, 1979.

FURLAN, R. L.; MACARI, M.; FARIA FILHO, D. E. Anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal. Nutrição de ruminantes. 2. ed. Jaboticabal: Funep: editorial, 2011. p. 1-25.

GALYEAN, M. L.; RIVERA, J. D. Nutritionally related disorders affecting feedlot cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 83, n. 1, p. 13-20, 2003.

GOAD, D. W.; GOAD, C. L.; NAGARAJA, T. G. Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 1, p. 234-241, 1998.

GOZHO, G. N.; PLAIZIER, J. C.; KRAUSE, D. O.;KENNEDY, A. D.; WITTENBERG, K. M. Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin released and triggers an inflammatory response. **Journal Dairy Science**, v. 88, p. 1399-1403, 2005.

HAU, J.; COENRAAD, F. M. H. Refinement of polyclonal antibody production by combining oral immunization of chickens with harvest of antibodies from the egg yolk. **ILAR Journal**, v. 46, n. 3, p. 294-299, 2005.

HUMBLET, M. F.; GUYOT, H.; BOUDRY, B.; MBAYAHI, F.; HANZEN, C.; ROLLIN, F.; GODEAU, J. M. Relationship between haptoglobin, serum amyloid A, and clinical status in a survey of dairy herds during a 6-month period. 2006. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 35, p. 188-193, 2006.

HUNGATE, R. E. The rumen protozoa. In: KREIER, J. P. (Ed.). **Parasitic protozoa**. New York: Academic Rea, 1978. v. 2, p. 65-95.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Rebanho bovino cai para 205,9 milhões de cabeças em 2006**. Brasília: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2007. Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1053>. Acesso em: 23 ago. 2010.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **No 1º trimestre de 2011, abate de frango cresce 3,4% em relação ao 4º trimestre de 2010.** Brasília: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1915&id_pagina=1&titulo=No-1%BA-trimestre-de-2011,-abate-de-frango-cresce-3,4%25-em-relacao-ao-4%BA-trimestre-de-2010>. Acesso em: 25 set. 2012.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Dez municípios com maior rebanho bovino.** Brasília: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2011. Disponível em: <<http://stravaganzastravaganza.blogspot.com.br/2011/06/dez-municipios-brasileiros-de-maior.html>>. Acesso em: 25 set. 2012.

JOYNER JR., A. E.; BROWN, L. J.; FOGG, T. J.; ROSSI, R. T. Effect of Monensin on Growth, Feed Efficiency and Energy Metabolism of Lambs. **Journal of Animal Science**, v. 48, n. 5, p. 1065-1069, 1979.

KATSUKI, P. A.; MIZUBUTI, I. Y.; PEREIRA, E. S.; RAMOS, B. M. O.; RIBEIRO, E. L. A.; MOREIRA, F. R.; ROCHA, M. A.; PINTO, A.; ALVES, T. C. Cinética ruminal de degradação de nutrientes da silagem de milho em ambiente ruminal inoculado com diferentes aditivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 6, p. 2421-2426, 2006.

KELLEY, K. W.; LEWIS, H. A. Monoclonal antibodies: pragmatic application of immunology and cell biology. **Journal Animal Science**, v. 63, p. 288-309, 1986.

KLEEN, J. L.; HOOIJER, G. A.; REHAGE, J.; NOORDHUIZEN, J. P. T. M. Subacute Ruminant Acidosis (SARA): a review. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 50, n. 8, p. 406-414, 2003.

KULASEK, G. A. A micromethod for determination of urea in plasma, whole blood cells using urease and phenol reagent. **Polskie Archiwum Weterynaryjne**, v. 15, n. 4, p. 801-810, 1972.

LAMMERS, B. P.; BUCKMASTER, D. R.; HEINRICH, E. A. J. S. A simple method for the analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 5, p. 922-928, 1996.

LONDOÑO, A. A. S.; VALADARES FILHO, S. C.; SILVA, J. F. C.; CECON, P. B.; CALAZANS, A.; GIOLO, R. A. Somatotropina bovina para vacas em lactação 2. Consumo, digestibilidade aparente e concentrações ruminiais de amônia, pH e taxa de passagem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 26, n. 6, p. 1234-1242, 1997. Paulo Roberto Cecon, Andre Calazans, Roberto de Almeida Giolo

LOPES, F. C. F.; AROEIRA, L. J. M.; ARCURI, P. B.; DAYRELL, M. S.; VITTORI, A. Efeitos da defaunação em ovinos alimentados com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*. L.) adicionada de uréia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, p. 180, 2002.

MACHADO, P. F.; MADEIRA, H. M. F. Manipulação de nutrientes em nível de rúmen – efeitos do uso de ionóforos. In: Sociedade Brasileira de Zootecnia. Bovinocultura de corte. Piracicaba: Fealq, 1990. p.79-96.

MANTOVANI, H. C.; RUSSELL, J. B. Nisin Resistance of *Streptococcus bovis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 808, 2001.

MARINO, C. T. **Efeito do preparado de anticorpos policlonais sobre o consumo alimentar, fermentação ruminal e digestibilidade in vivo de bovinos suplementados com três fontes energéticas**. 2008. 107 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Botucatu, 2008.

MARINO, C. T.; OTERO, W. G.; RODRIGUES, P. H. M.; DICOSTANZO, A.; MILLEN, D. D.; PACHECO, R. D. L.; DILORENZO, N.; MARTINS, C. L.; ARRIGONI, M. D. B. Effects of adding polyclonal antibody preparations on ruminal fermentation patterns and digestibility of cows fed different energy sources. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 10, p. 3228-3235, 2011.

MERTENS, D. R. **Regulation of forage intake**: secondary title. Lincoln, Nebraska: American Society of Agronomy 1994. p. 450-493.

MILLEN, D. D.; PACHECO, R. D. L.; ARRIGONI, M. D. B.; PARRILI, M.; MATSUHARA, S. A.; FOSSA, M. V.; SARTI, L. M. N.; MARTINS, C. L.; BASTOS, J. P. S. T.; MARIANI, T. M. Feedlot performance and rumen parakeratosis incidence in *Bos indicus* type bullocks fed high-grain diets and monensin or polyclonal antibodies preparations against rumen bacteria. In: 2007 Joint Annual Meeting, San Antonio, Texas. ABSTRACT - **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 552, 2007.

MILLEN, D. D. **Desempenho, avaliação ruminal e perfil metabólico sanguíneo de bovinos jovens confinados suplementados com monensina sódica ou anticorpos policlonais**. 2008. 131 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade do Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

MILLEN, D. D.; PACHECO, R. D. L.; ARRIGONI, M. D. B.; GALYEAN, M. L.; VASCONCELOS, J. T. A snapshot of management practices and nutritional recommendations used by feedlot nutritionists in Brazil. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 10, p. 3427-3439, 2009.

MIURA, H.; HORIGUCHI, M.; MATSUMOTO, T. Nutritional interdependence among rumen bacteria, *Bacteroides amylophilus*, *Megasphaera elsdeni* and *Ruminococcus albus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 40, p. 294, 1980.

MORAIS, J. A. S.; BERCHIELLI, T. T.; REIS, R. A. Aditivos. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. p. 539-561.

MORAIS, J. A. S.; BERCHIELLI, T. T.; REIS, R. A. Aditivos. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2011. p. 565-591.

NAGARAJA, T. G.; NEWBOLD, C. J.; VAN NEVEL, C. J.; MEYER, D. I. Manipulation of ruminal fermentation. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. London. Blackie Academic & Professional, 1997. p. 523-632.

NAGARAJA, T. G. Response of the gut and microbial populations to feedstuffs: the ruminant story. In: MINNESOTA NUTRITION CONFERENCE, 64., 2003, Saint Paul. **Proceedings...** Saint Paul: Animal Science, 2003. p. 64-77.

NAGARAJA, T. G.; TITGEMEYER, E. C. Ruminal Acidosis in Beef Cattle: The Current Microbiological and Nutritional Outlook^{1,2}. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. E17-E38, 2007.

NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J.; MCKAIN, N. Effects of the ionophore tetronasin on nitrogen metabolism by ruminal microorganisms in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 4, p. 1103-1109, 1990.

NOCEK, J. E. Bovine Acidosis: implications on Laminitis. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 5, p. 1005-1028, 1997.

NOGUEIRA FILHO, J. C. M.; MARTIN-ORÚE, S. M.; BALCELLS, J.; FONDEVILA, M.; ABLAS, D. S. Níveis de proteína degradável para novilhas em crescimento sobre a concentração de protozoários ciliados e outros parâmetros ruminais. **Acta Scientiarum, Animal Science**, v. 23, n. 4, p. 945-951, 2001.

NUSSIO, L. G.; CAMPOS, F. P.; LIMA, M. L. M. Metabolismo de carboidratos estruturais. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. p.183-223.

ORSKOV, E. R. Starch digestion and utilization in ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 63, n. 5, p. 1624-1633, 1986.

ORSKOV, E. R.; REID, G. W.; KAY, M. Predicting of intake by cattle from degradation characteristics of roughage. **Animal Production**, v. 46, p. 29, 1988.

OTERO, W. G. **Avaliação da diversidade microbiana e degradabilidade in situ em animais tratados com preparado de anticorpos policlonais contra bactérias produtoras de lactato e bactérias proteolíticas**. 2008. 85 p. Dissertação (Mestrado) -

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade da São Paulo, USP, Pirassununga, 2008.

OWENS, F. N.; GOETSCH, A. L. Fermentación ruminal. In: CHURCH, D. C. (Ed.). **El ruminante, fisiología digestiva y nutrición**. Zaragoza, España: Acríbia, 1993. p. 159-190.

OWENS, F. N.; SECRIST, D. S.; HILL, W. J.; GILL, D. R. The effect of grain source and grain processing on performance of feedlot cattle: a review. **Journal Animal Science**, v. 75, p. 868-879, 1997.

OWENS, F. N.; SECRIST, D. S.; HILL, W. J.; GILL, D. R. Acidosis in cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 1, p. 275-286, 1998.

PACHECO, R. D. L. **Monensina sódica ou anticorpos policlonais contra Bactérias precursoras de distúrbios nutricionais em bovinos induzidos à acidose ruminal**. 2010. 116 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Botucatu, 2010.

PECUÁRIA DE CORTE. **Confinamento deve crescer, diz Assocon**. 2011. Disponível em: <<http://www.pecuaria.com.br/info.php?ver=11069>>. Acesso em: 19 set. 2011.

PRYCE, J. D. Modification of the Barker-Summerson method for the determination of lactic acid. **Analyst**, v. 94, p. 1151-1152, 1969.

QUADROS, D. G. Confinamento de bovinos de corte. 2002. Disponível em: http://www.almanaquedocampo.com.br/imagens/files/confinamento_bovinos_corte.pdf>. Acesso em: 15 set. 2011.

RODE, L. M. Maintaining a healthy rumen – An Overview, Research centre, Agriculture & Agri-food Canada. 2000. Disponível em: <http://www.wcds.ca/proc/2000/Manuscripts/Chapter%2010%20-%20Rode.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2011.

RODRIGUES, P. H. M.; K. C.; P. J.; MORGULLIS, S. C. F.; SILVA, E. J. A.; MEYER, P. M.; PIRES, A. V. Avaliação da monensina administrada pela forma convencional ou por dispositivo de liberação lenta em bovinos alimentados com forragens de baixo valor nutritivo e suplementados ou não com uréia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 6, p. 1937-1944, 2007.

RUSSELL, J. B.; HINO, T. Regulation of lactate production in streptococcus bovis: a spiraling effect that contributes to rumen acidosis. **Journal of Dairy Science**. v. 68, p. 1712, 1985.

RUSSELL, J. B.; STROBEL, H. J. Effect of ionophores on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 1-6, 1989.

RUSSELL, J. B.; WILSON, D. B. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 8, p. 1503-1509, 1996.

RUSSEL, J. B. Mechanisms of action of ionophores. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, 59., 1997, Ithaca, New York. Proceedings... Ithaca: Cornell University, 1997. p. 88-92.

RUSSEL, J. B.; RYCHLIK, J. L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Journal of Animal Science**, v. 292, p. 1119-1122, 2001.

SANTOS, F. A. P. D.; BALSALOBRE, M. A. A. Por que confinar? In: PEIXOTO, A. M.; MOURA, J. C. D.; FARIA, V. P. **Confinamento de bovinos de corte**. Piracicaba: Fealq, 2000. p. 148

SANTOS, F. A. P. Metabolismo de proteínas. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. p. 151-179.

SARTI, L. M. N.; BARDUCCI, R. S.; MILLEN, D. D.; PACHECO, R. D. L.; ARRIGONI, M. D. B.; MARTINS, C. L.; COSTA, S. F.; MELO, L. Q.; PARRA, F. S.; RONCHESEL, J. R.; OMAZELLA, D.; ROSA, H. D.; LEIVA, T.; BALDIN, S. R.; CÔNSOLO, N. R. B. Rumen papillae measurements of feedlot cattle fed monensin or polyclonal antibody preparation against lactate-producing rumen bacteria. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 284, 2009. Supplement, 2.

SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K. S.; BEAUCHEMIN, K. A.; GIBB, D. J.; CREWS, D. H., JR.; HICKMAN, D. D.; STREETER, M.; MCALLISTER, T. A. Effect of bunk management on feeding behavior, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: A review. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 14, p. E149-158, 2003. Supplement, 2.

SHU, Q.; GILL, H. S.; LENG, R. A.; ROWE, J. B. Immunization with a Streptococcus bovis Vaccine Administered by Different Routes Against Lactic Acidosis in Sheep. **The Veterinary Journal**, v. 159, n. 3, p. 262-269, 2000.

SILVA, J. F. C.; LEÃO, M. I. **Fundamentos de nutrição dos ruminantes**. Piracicaba-SP: Livroceres, 1979. 380 p.

SILVA, J. F. C. Mecanismos reguladores de consumo. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. p. 57-77.

SLYTER, L. L. Influence of acidosis on rumen function. **Journal of Animal Science**. v. 43, p. 910-929, 1976.

STOCK, R.; BRITTON, R. Acidosis. Institute of agriculture and natural resources. Nebraska, University of Nebraska-Lincoln, 1991.

STOCK, R. A.; BRITTON, R. A. **Acidosis**. Nebraska, University of Nebraska, 1996.

TEDESCHI, L. O.; FOX, D. G.; RUSSELL, J. B. Accounting for the effects of a ruminal nitrogen deficiency within structure of the Cornell Net Carbohydrate and Protein System. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 1648-1658, 2000.

THORNTON, J. H.; OWENS, F. N. Monensin Supplementation and in vivo Methane Production by Steers. **Journal of Animal Science**, v. 52, n. 3, p. 628-634, 1981.

VALADARES FILHO, S. C.; PINA, D. S. Fermentação ruminal. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. p. 151-179.

VALADARES FILHO, S. C.; PINA, D. S. Fermentação ruminal. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2011. p. 161-189.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476 p.

WESTON, R. Some aspects of constraint to forage consumption by ruminants. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 47, n. 2, p. 175-197, 1996.

YOKOYAMA, H.; PERALTA, R. C.; DIAZ, R.; SENDO, S.; IKEMORI, Y.; KODAMA, Y. Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. **Infection Immunology**, v. 60, n. 3, p. 998-1007, 1992.