

LEONARDO FRASSON DOS REIS

**Estudo comparativo do uso de probiótico e monensina na prevenção e  
tratamento da acidose láctica ruminal aguda em ovinos**

São Paulo

2011

LEONARDO FRASSON DOS REIS

**Estudo comparativo do uso de probiótico e monensina na prevenção e tratamento da acidose láctica ruminal aguda em ovinos**

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

**Departamento:**

Clínica Médica

**Área de concentração:**

Clínica Veterinária

**Orientador:**

Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani

São Paulo

2011

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.2518 FMVZ	Reis, Leonardo Frasson dos Estudo comparativo do uso de probiótico e monensina na prevenção e tratamento da acidose láctica ruminal aguda em ovinos / Leonardo Frasson dos Reis. – São Paulo : L. F. Reis, 2011. 115 f.: il.  Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, 2011.  Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária Área de concentração: Clínica Veterinária.  Orientador: Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani.  1. Leveduras. 2. Aditivos 3. Ionóforos. 4. Acidose (prevenção). 5. pH Ruminal. I. Título.
----------------	---



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo comparativo do uso de probiótico e de monensina na prevenção da acidose láctica ruminal aguda em ovinos", protocolado sob o nº1587/2009, utilizando 30 (trinta) bovinos Mestiço (*Bos Tauros*), sob a responsabilidade do Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Comparative study of the use of monensin and probiotic in the prevention of acute rumen lactic acidosis in ovine", protocol number 1587/2009, utilizing 30 (thirty) half-caste bovine (*Bos Tauros*), under the responsibility Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum" meeting).

São Paulo, 28 de julho de 2011

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni  
Presidente

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

**Nome:** REIS, Leonardo Frasson

**Título:** Estudo comparativo do uso de probiótico e monensina na prevenção e tratamento da acidose láctica ruminal aguda em ovinos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária 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 \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_

*Aos meus pais Walter Ramos dos Reis (in memorian) e Nilse Maria Frasson, por toda dedicação que tiveram comigo e com meu irmão. Por me proverem uma família e um lar o qual eu sempre carregarei comigo. Se eu tivesse que viver mil vidas, gostaria que fossem todas com vocês. Onde quer que eu esteja não haverá distância capaz de desfazer nossos laços.*

*A Deus, que me deu a existência, e uma segunda chance, para que eu pudesse estar presente aqui e neste tempo, realizando este trabalho, e com isso participando, ainda que em um pequeno grau, da vida de todos aqueles que me cercam. A minha família que sempre me acolheu e me apoiou, à minha mãe, a quem a muitas lágrimas custou, pela distância necessária entre nós para a realização desse trabalho. Meu irmão André, meu amigo desde o momento em que vim a esse mundo. João, um amigo a quem espero um dia poder retribuir todo auxílio que me prestou. Minhas tias, primos, e todos que sempre foram parte da minha vida. Minha tia Maria do Socorro, mesmo distante sempre se manteve presente.*

*À Daniele Ornaghi Sant'Anna, pelo afeto, companheirismo, amizade, dedicação. Agradeço a família Sant'Anna por todo apoio que me deram nesse momento importante da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani**, pelo privilégio de participar desta família. Agradeço pela disposição de transmitir generosamente aquilo que dedicou sua vida a adquirir: o conhecimento. Um exemplo de dedicação, apoio e estímulo ao crescimento pessoal. Um exemplo de profissional dedicado à ciência, causa de todos os seus orientados sentirem-se confiantes e orgulhosos de tê-lo como orientador. Agradeço a compreensão, paciência e o auxílio durante este importante período de minha vida. Espero contar com a sua eterna amizade, assim como sempre terá a minha gratidão.

A minha família de Pós-Graduação: **Carolina Akiko Cabral Araújo, Frederico Augusto Mazzocca Lopes Rodrigues, Francisco Leonardo Costa de Oliveira** que foram a família que eu tive durante a minha passagem por esta instituição, sem os quais, a execução e conclusão deste trabalho não seriam possíveis; sinceramente espero um dia ser capaz de retribuir tudo que fizeram pela minha pessoa, tanto profissional como pessoalmente. Com vocês mesmo os momentos de trabalho mais cansativos sempre foram momentos felizes, os quais eu jamais esquecerei. O espírito de amizade que vivi entre vocês fez com que os momentos de trabalho tivessem um caráter quase lúdico, que me remeteu aos melhores momentos de minha agradável infância que vivi com meu irmão, primos e amigos. Nossas semelhanças trouxeram-me o conforto da empatia, e nossas diferenças locupletaram-me, lembrando-me que a vida é constante aprendizado, não apenas no sentido acadêmico e profissional, mas sobretudo na esfera pessoal. Cada momento vivido tornou-se uma experiência de aprendizado com vocês, conservarei as qualidades que vi em cada um de vocês como espelhos que utilizarei em meu aperfeiçoamento pessoal. Saibam que cada um de vocês me ensinou muito mais do que meu silêncio ao longo desses anos demonstrou. Em todas as cirurgias, adaptação, induções, coletas, tratamento dos animais e análises laboratoriais, o espírito de equipe e, principalmente, a amizade e o companheirismo de vocês foi o que tornou esse trabalho possível. Ao longo de todo esse tempo que permanecemos juntos, vocês cultivaram uma imagem dentro de mim que mantereí pra sempre como símbolos de amigos verdadeiros. Foram tantas experiências vividas juntas, dentro e fora da universidade que não haveria espaço para todas em um simples



agradecimento. Minha limitada capacidade lingüística não é capaz de expressar em plenitude a minha gratidão por tudo.

Ao amigo **Enoch Brandão de Souza Meira Junior**. Pela ajuda crucial que recebi durante a parte experimental, as cirurgias para implantar as cânulas, posteriormente para fechar as fístulas. As noites que passou no galpão para ajudar nas coletas foram fundamentais para a realização deste trabalho, porém agradeço ainda mais pela amizade e companheirismo que mostrou no convívio cotidiano. Estes foram muito além de um simples auxílio profissional. *Amicus certus in re incerta cernitur.*

Ao amigo **Prof. Dr. Antonio Humberto Hamad Minervino**, da Universidade Federal do Oeste do Pará UFOPA. Tudo que se refere aos meus amigos supracitados se aplica a ti também.

Ao amigo **Prof. Dr. Raimundo Alves Barrêto Júnior**, do Departamento de Ciências Animais da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, pela grande ajuda durante todo o mestrado, sobretudo durante as cirurgias.

À **Clara Satsuki Mori**, técnica de nível superior responsável pelo Laboratório de Doenças Nutricionais e Metabólicas, pelo convívio diário, ajuda irrestrita e resolução de vários problemas técnicos e pessoais. Agradeço por sua ajuda, paciência e espero contar com sua eterna amizade.

À **Rejane Sousa**, pelo apoio, amizade e companheirismo. Foi um privilégio ter trabalhado contigo.

Ao funcionário do Galpão de Experimentação em Clínica de Ruminantes: **Agnaildo Arcanjo dos Santos**, pela ajuda no trato dos animais, pela paciência e pela amizade, imprescindíveis na realização deste trabalho.

À secretária da pós-graduação, **Adelaide Borges**, pela paciência, agradável convívio, ajuda, compreensão e amizade.

À Professora **Dr. Maria Claudia Araripe Sucupira**, pela sensibilidade de reconhecer quando precisamos de ajuda, e pela sua disposição de sempre ajudar quando precisamos, tornou-se um exemplo de profissional e de pessoa para mim.

Ao professor Dr. **Fernando José Benesi**, pelos agradáveis momentos vividos em sala de aula e no cotidiano.

Aos professores do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP: **Alice Maria Melville Paiva Della Libera, Archivaldo Reche Júnior, Carla Bargi Belli, Carlos Eduardo Larsson, Cássio Xavier de Mendonça Junior (in memoriam) , Eduardo Harry Birgel Júnior, Lílian Gregory, Márcia Mery Kogika, Maria Helena Matiko Akao Larsson, Mitika Kuribayashi Hagiwara, Raquel Yvonne Arantes Baccarin, Sílvia Regina Ricci Lucas, e Wilson Roberto Fernandes** pela convivência harmoniosa, conhecimentos transmitidos e pela amizade.

Ao prof. Dr. **Fabio Celidonio Pogliani**, pelo agradável convívio e amizade.

Aos meus amigos **Matheus Levi, Flavio Ribeiro e Carlos Eduardo “Cadu”**, por me acolherem quando cheguei aqui nesta cidade. Também aos amigos de república **André Moreni, Andrea Estrella e Adrián Guzman**, pelo convívio diário, conversas agradáveis e pela paciência.

Aos amigos de pós-graduação: **Bruno Monteiro, Leandro Lipinski, Melina, Laura, Camila, Marjorie, e “Tio Chico”** pelo agradável convívio, troca de conhecimentos e amizade.

À **Samantha Miyashiro e Marly E. Ferreira de Castro**, pela generosa acolhida, ajuda nas análises bioquímicas e principalmente pela sua amizade.

Aos **funcionários da biblioteca**, pelo profissionalismo, cordial atendimento e amizade.

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP** que oferece condições favoráveis para a execução de pesquisa e pela minha formação.

À **FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO – FAPESP**, pela concessão de bolsa de doutorado e auxílio pesquisa, imprescindíveis ao desenvolvimento desta pesquisa.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a execução deste trabalho.

E principalmente a todos os **ovinos**, que foram fundamentais para que este trabalho fosse realizado.

***Non intellecti nulla est curatio morbi.***

Maximiano, Elegiae 3

## RESUMO

REIS, L. F. **Estudo comparativo do uso de probiótico e monensina na prevenção e tratamento da acidose láctica ruminal aguda em ovinos.** [Comparative study of monensin and probiotics in the prevention and treatment of acute rumen lactic acidosis in sheep]. 2011. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O presente estudo objetivou avaliar comparativamente a eficácia de probiótico a base de levedura *Saccharomyces cerevisiae* e de ionóforo (Monensina sódica) na prevenção e tratamento da acidose láctica ruminal aguda em ovinos, por meio de uma série de variáveis ruminais e sistêmicas. Foram utilizados 30 ovinos adultos, mestiços da raça Santa Inês, providos de cânula ruminal, com cerca de 30 kg de peso corporal. Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas e alimentados com dieta basal calculada em 2,7% do peso vivo e composta de 75% da matéria seca de feno de capim de *coast-cross* e de 25% de concentrado. Os ovinos foram distribuídos aleatoriamente em três grupos com 10 animais cada, assim constituídos: Controle; Probiótico e Monensina. O grupo controle recebeu apenas a dieta basal, o grupo Probiótico teve a dieta basal suplementada com 5g/animal/dia do probiótico Yea-Sacc®, e o grupo Monensina recebeu 33 ppm de monensina sódica em relação a matéria seca da dieta basal. Os aditivos foram fornecidos diretamente através da cânula ruminal. Após 30 dias de experimento foi realizada indução experimental de acidose láctica ruminal através da administração de sacarose. Foi realizado exame clínico e coleta de amostras de sangue e conteúdo ruminal antes na indução (T0h) e após 6, 12, 18, 24, 36 e 48 horas da indução. O pH e a temperatura ruminal foram aferidos de forma contínua por 48 horas a partir da indução experimental por meio de sistema de aquisição de dados com eletrodo submersível. No tempo 12 horas o grupo Monensina apresentou pH médio de 5,2 e foi maior que o grupo Controle (pH 4,45). Nos tempos T18h e T24h os grupos Monensina e Probiótico apresentaram maior pH ruminal que o Controle e nos tempos T36h e T48h apenas o grupo probiótico. Os valores médios do Lactato-L ruminal do grupo controle no T24h foram superiores em 97,6% ao grupo Monensina e 123,0% ao grupo Probiótico, com menores valores observados no grupo Probiótico em relação ao controle nos tempos T24h, T36h e T48h. Quanto maior o lactato-L ruminal, menor o pH ( $R^2 = 0,82$ ), maior a osmolaridade ruminal ( $R^2 = 0,53$ ) e maior p Lactato-L plasmático ( $R^2 = 0,77$ ). O

uso de probiótico proporcionou a partir da 18<sup>a</sup> h de indução a ocorrência de um quadro de ALRA mais brando, por promover um menor acúmulo de ácido láctico no rúmen, com conseqüente diminuição do pH e da osmolaridade ruminais, e de acarretar um menor grau de desidratação e de acidose sistêmica. Essas constatações indicam que o probiótico pode ser utilizado com vantagens no tratamento de ovinos com ALRA. O uso de monensina aliviou pontualmente, na altura da 12<sup>a</sup> hora da indução, a acidose ruminal por uma redução na velocidade de queda do pH ruminal, mas não impediu que esse quadro ocorresse e que evitasse o surgimento de complicações clínicas decorrentes da ALRA.

Palavras-chave: Levedura. Aditivos. Ionóforos. Acidose (prevenção). pH Ruminal.

## ABSTRACT

REIS, L. F. **Comparative study of monensin and probiotics in the prevention and treatment of acute rumen lactic acidosis in sheep.** [Estudo comparativo do uso de probiótico e monensina na prevenção e tratamento da acidose láctica ruminal aguda em ovinos]. 2011. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

This study aimed to comparatively evaluate the efficacy of the probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* and ionophore (monensin) in preventing and treat acute rumen lactic acidosis in sheep through a series of ruminal and systemic variables. 30 adult Santa Ines, cannulated, crossbred sheep were used, weighting 45 kg BW. The animals were kept in metabolic cages and fed a basal diet calculated at 2.7% of live weight and composed of 75% of hay and 25% concentrate. The animals were randomly divided into three groups with 10 animals each, formed as follows: Control; Probiotic and Monensin. The control group received only the basal diet, the probiotic group had the basal diet supplemented with 5 g/animal/d of Yea-Sacc®; Monensin group received 33 ppm of monensin in relation of the dry matter of the basal diet. The additives were supplied directly through the rumen cannula. After 30 days of the experiment an experimentally induced ruminal lactic acidosis was performed by the administration of sucrose. Clinical examination and sampling of blood and ruminal content we performed before the induction (T0h) and after 6, 12, 18, 24, 36 and 48 hours. The ruminal pH and temperature were measured continuously for 48 hours after experimental induction throughout data acquisition system with indwelling probe. At T12h Monensin group had a mean pH of 5.2 and was higher than the Control group (pH 4.45). At T18h and T24h Monensin and Probiotic groups had higher ruminal pH than the control and at T36h and T48h only the probiotic group presented this difference. The mean values of ruminal L-lactate at T24h in the control group were 97.6% higher than Monensin group and 123.0% higher than Probiotic group, with lower values observed in the Probiotic group compared to control at times T24h, T36h and T48h. The higher ruminal L-lactate, the lower the pH ( $R^2 = 0.82$ ), higher ruminal osmolarity ( $R^2 = 0.53$ ) and higher the plasmatic L-lactate ( $R^2 = 0.77$ ). The use of probiotics promoted from the T18h a mild acute ruminal lactic acidosis due to a lower accumulation of lactic acid into the rumen, with a consequent smaller drop in pH and lower elevation of osmolarity, which lead to a lower degree of

systemic acidosis and dehydration. These findings indicate that probiotics can be used with advantage in the treatment of sheep with ARLA. Monensin reduced the effects of ARLA just at T12h, but do not prevent that the animals developed the classic ARLA clinical picture.

Key words: Yeast. Addictive. Ionophores. Acidosis (prevention). Ruminal pH



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Composição bromatológica do feno de capim Coast-Cross e do concentrado comercial oferecido aos ovinos, durante o período experimental – São Paulo – 2011.....	58
Quadro 2 –	Ocorrências clínicas constatadas durante nos animais no decorrer da experimentação – São Paulo – 2011.....	90

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Valores médios e desvios padrão do pH do conteúdo ruminal dos ovinos aferidos por pHmetro de bancada no decorrer do experimento – São Paulo – 2011.....	66
Tabela 2 –	Valores médios e desvios padrão da comparação de resultados de pH ruminal obtidos por pHmetro de bancada e sistema de aferição contínua por telemetria em condições normais e acidóticas – São Paulo – 2011.....	69
Tabela 3 –	Valores médios e desvios padrão da concentração de lactato-L (mMol/l) no conteúdo ruminal de ovinos suplementados com monensina e levedura no decorrer do experimento – São Paulo – 2011.....	70
Tabela 4 –	Valores médios da temperatura ruminal dos ovinos suplementados com monensina e probiótico obtida por telemetria no decorrer do experimento – São Paulo – 2011.....	72
Tabela 5 –	Valores médios e desvios padrão da Osmolaridade do conteúdo ruminal (mOsm/l) dos ovinos suplementados com monensina e probiótico no decorrer do experimento – São Paulo – 2011.....	74
Tabela 6 –	Valores médios e desvios padrão do déficit de volume plasmático (%) dos ovinos suplementados com monensina e probiótico no decorrer do experimento – São Paulo – 2011.....	75
Tabela 7 –	Valores médios e desvios padrão de pH sanguíneo dos ovinos suplementados com monensina e probiótico no decorrer do experimento – São Paulo – 2011.....	77
Tabela 8 –	Valores médios e desvios padrão da concentração de excesso de ácido-base nos animais suplementados com monensina e probiótico durante o experimento – São Paulo – 2011.....	78
Tabela 9 –	Valores médios e desvios padrão da concentração de bicarbonato sanguíneo (mMol/L) nos animais suplementados com monensina e probiótico durante o experimento – São Paulo – 2011.....	80

Tabela 10 – Valores médios e desvios padrão da concentração de lactato-L plasmático dos ovinos suplementados com monensina e probiótico no decorrer do experimento – São Paulo – 2011.....	81
Tabela 11 – Valores médios e os respectivos desvios padrão da Osmolaridade sérica no decorrer do experimento – São Paulo – 2011.....	83
Tabela 12 – Valores médios e os respectivos desvios padrão da concentração de glicose plasmática mg/dL no decorrer do experimento – São Paulo – 2011.....	84
Tabela 13 – Valores médios e os respectivos desvios padrão da frequência cardíaca dos animais suplementados com monensina e probiótico no decorrer do experimento – São Paulo – 2011.....	85
Tabela 14 – Valores médios e os respectivos desvios padrão da frequência respiratória dos animais suplementados com monensina e probiótico no decorrer do experimento – São Paulo – 2011.....	87
Tabela 15 – Valores médios e os respectivos desvios-padrão da frequência dos movimentos ruminais em 3 minutos dos animais suplementados com monensina e probiótico no decorrer do experimento – São Paulo – 2011.....	88

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Valores médios e desvios padrão do pH do conteúdo ruminal dos ovinos aferidos por pHmetro de bancada no decorrer do experimento – São Paulo – 2011.....	67
Gráfico 2 –	pH do conteúdo ruminal aferido continuamente ao longo do ensaio nos três grupos experimentais – São Paulo – 2011.....	68
Gráfico 3 –	Valores médios da comparação de resultados de pH ruminal obtidos por pHmetro de bancada e sistema de medição contínua em condições normais e acidóticas – São Paulo – 2011.....	69
Gráfico 4 –	Valores médios e desvios padrão da concentração de lactato-L (mMol/l) no conteúdo ruminal de ovinos suplementados com monensina e levedura no decorrer do experimento – São Paulo – 2011.....	71
Gráfico 5 –	Valores médios da temperatura ruminal dos ovinos suplementados com monensina e probiótico obtida por sistema de medição contínua no decorrer do experimento – São Paulo – 2011.....	73
Gráfico 6 –	Valores médios e desvios padrão da Osmolaridade do conteúdo ruminal (mOsm/l) dos ovinos suplementados com monensina e probiótico no decorrer do experimento – São Paulo – 2011.....	74
Gráfico 7 –	Valores médios e desvios-padrão do déficit de volume plasmático (%) dos ovinos suplementados com monensina e probiótico no decorrer do experimento – São Paulo – 2011.....	76
Gráfico 8 –	Valores médios e desvios padrão de pH sangüíneo dos ovinos suplementados com monensina e probiótico no decorrer do experimento – São Paulo – 2011.....	77
Gráfico 9 –	Valores médios e desvios padrão da concentração de excesso de ácido-base nos animais suplementados com monensina e probiótico durante o experimento – São Paulo – 2011.....	79

Gráfico 10 – Valores médios e desvios padrão da concentração de bicarbonato sangüíneo (mMol/L) nos animais suplementados com monensina e probiótico durante o experimento – São Paulo – 2011.....	80
Gráfico 11 – Valores médios e desvios padrão da concentração de lactato-L plasmático dos ovinos suplementados com monensina e probiótico no decorrer do experimento – São Paulo – 2011.....	82
Gráfico 12 – Valores médios e os respectivos desvios padrão da Osmolaridade sérica no decorrer do experimento – São Paulo – 2011.....	83
Gráfico 13 – Valores médios e os respectivos desvios padrão da concentração de glicose plasmática mg/dL no decorrer do experimento – São Paulo – 2011.....	84
Gráfico 14 – Valores médios e os respectivos desvios padrão da freqüência cardíaca dos animais suplementados com monensina e probiótico no decorrer do experimento – São Paulo – 2011.....	86
Gráfico 15 – Valores médios e os respectivos desvios padrão da freqüência respiratória (mpm) dos animais suplementados com monensina e probiótico no decorrer do experimento – São Paulo – 2011.....	87
Gráfico 16 – Valores médios e os respectivos desvios-padrão da freqüência dos movimentos ruminais em 3 minutos dos animais suplementados com monensina e probiótico no decorrer do experimento – São Paulo – 2011.....	89
Gráfico 17 – Relação entre pH e a concentração de lactato-L (mMol/L) do conteúdo ruminal dos ovinos no decorrer do experimento – São Paulo – 2011.....	90
Gráfico 18 – Relação entre a concentração de lactato L e a osmolaridade ruminal dos ovinos no decorrer do experimento – São Paulo – 2011.....	91
Gráfico 19 – Relação entre o lactato-L ruminal e lactato-L plasmático dos ovinos durante o experimento – São Paulo – 2011.....	92
Gráfico 20 – Relação entre pH e temperatura ruminal dos ovinos durante o experimento – São Paulo – 2011.....	92
Gráfico 21 – Relação entre osmolaridade ruminal e déficit de volume	93

	plasmático dos ovinos no decorrer do experimento – São Paulo – 2011.....	
Gráfico 22 –	Relação entre déficit de volume plasmático e frequência cardíaca dos ovinos durante os experimentos – São Paulo – 2011.....	94
Gráfico 23 –	Relação entre déficit de volume plasmático e osmolaridade sérica dos ovinos durante o experimento – São Paulo – 2011.....	94
Gráfico 25 –	Relação entre lactato-L plasmático e concentração de glicose plasmática dos ovinos durante o experimento – São Paulo – 2011.....	95

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
±	Mais ou menos
-	Menos
+	Mais
° C	graus Celsius
®	Marca registrada
kg	Kilograma
g	Gramma
dL	Decilitro
mOSm	Miliosmol
mg	Miligrama

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	26
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	28
2.1	PROCESSO FERMENTATIVO DO RÚMEN.....	28
<b>2.1.1</b>	<b>Estrutura compartimentada do aparelho gástrico dos ruminantes</b> .....	28
<b>2.1.2</b>	<b>Transformações bioquímicas da ingesta</b> .....	29
2.2	ACIDOSE LÁCTICA RUMINAL AGUDA.....	32
<b>2.2.1</b>	<b>Histórico</b> .....	32
<b>2.2.2</b>	<b>Ocorrência</b> .....	36
<b>2.2.3</b>	<b>Etiopatogenia</b> .....	37
<b>2.2.4</b>	<b>Sinais Clínicos</b> .....	40
2.3	MENSURAÇÃO DO pH RUMINAL.....	41
<b>2.3.1</b>	<b>Potencial hidrogeniônico do conteúdo ruminal</b> .....	41
<b>2.3.2</b>	<b>Meios para a obtenção e aferição do pH ruminal</b> .....	42
2.3.2.1	A sonda gástrica.....	43
2.3.2.2	A Fistula Ruminal.....	44
2.3.2.3	Aferição de pH <i>in situ</i> .....	45
2.4	ADITIVOS NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES.....	45
<b>2.4.1</b>	<b>Ionóforos</b> .....	46
2.4.1.1	Controle de doenças Provocadas por Protozoários.....	48
2.4.1.2	Implicações para o a saúde humana.....	49
2.4.1.3	Mecanismo de ação.....	49
<b>2.4.2</b>	<b>Probióticos</b> .....	51
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	57
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	58
4.1	ANIMAIS E ALIMENTAÇÃO.....	58
4.2	INSTALAÇÕES.....	58
4.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	59
4.4	INDUÇÃO DA ACIDOSE LÁCTICA RUMINAL AGUDA.....	60
4.5	EXAME CLÍNICO DOS ANIMAIS.....	60
4.6	COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE.....	60
<b>4.6.1</b>	<b>Avaliações hemogasométricas</b> .....	61



4.6.2	<b>Determinação do volume globular (VG)</b> .....	62
4.6.3	<b>Cálculo do déficit de volume plasmático (DVP)</b> .....	62
4.6.4	<b>Determinação da concentração plasmática de ácido láctico-L</b> .....	62
4.6.5	<b>Determinação da osmolaridade sérica</b> .....	63
4.7	<b>COLETA DE AMOSTRAS DE CONTEÚDO RUMINAL</b> .....	63
4.7.1	<b>Mensuração do pH e da temperatura do conteúdo ruminal</b> .....	63
4.7.1.1	Aferição tradicional.....	63
4.7.1.2	Sistema de medição contínua de pH por meio de eletrodo submersível.....	64
4.7.2	<b>Determinação da concentração de ácido láctico-L no conteúdo ruminal</b> .....	64
4.7.3	<b>Determinação da osmolaridade do conteúdo ruminal</b> .....	65
4.8	<b>PROTOCOLO DE TRATAMENTO</b> .....	65
4.9	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	65
5	<b>RESULTADOS</b> .....	66
5.1	<b>VARIÁVEIS RUMINAIS</b> .....	66
5.1.1	<b>pH do conteúdo ruminal</b> .....	66
5.1.2	<b>Comparação do pH do conteúdo ruminal mensurado por pHmetro de bancada e por sistema de aferição contínua</b> .....	68
5.1.3	<b>Concentração de Ácido Láctico-L no conteúdo ruminal</b> .....	70
5.1.4	<b>Temperatura ruminal</b> .....	71
5.1.5	<b>Osmolaridade do conteúdo ruminal</b> .....	73
5.2	<b>VARIÁVEIS SANGÜÍNEAS</b> .....	75
5.2.1	<b>Déficit de volume plasmático</b> .....	75
5.2.2	<b>pH sanguíneo</b> .....	76
5.2.3	<b>Concentração de excesso de ácido-base (EAB)</b> .....	78
5.2.4	<b>Concentração de bicarbonato sanguíneo</b> .....	79
5.2.5	<b>Concentração plasmática de Lactato-L</b> .....	81
5.2.6	<b>Osmolaridade sérica</b> .....	82
5.2.7	<b>Concentração de glicose plasmática</b> .....	84
5.3	<b>VARIÁVEIS CLÍNICAS</b> .....	85
5.3.1	<b>Freqüência cardíaca</b> .....	85
5.3.2	<b>Freqüência respiratória</b> .....	86

<b>5.3.3</b>	<b>Movimentos ruminais.....</b>	<b>88</b>
<b>5.4</b>	<b>OCORRÊNCIAS CLÍNICAS.....</b>	<b>89</b>
<b>5.5</b>	<b>RELAÇÕES ENTRE VARIÁVEIS.....</b>	<b>90</b>
<b>5.5.1</b>	<b>Relação entre pH e a concentração de lactato-L do conteúdo ruminal.....</b>	<b>90</b>
<b>5.5.2</b>	<b>Relação entre lactato L e a osmolaridade do conteúdo ruminal.....</b>	<b>91</b>
<b>5.5.3</b>	<b>Relação entre o lactato-L ruminal e lactato-L plasmático.....</b>	<b>91</b>
<b>5.5.4</b>	<b>Relação entre pH e temperatura ruminal.....</b>	<b>92</b>
<b>5.5.5</b>	<b>Relação entre déficit de volume plasmático e Osmolaridade ruminal.....</b>	<b>93</b>
<b>5.5.6</b>	<b>Relação entre Déficit de Volume Plasmático e Frequência Cardíaca.....</b>	<b>93</b>
<b>5.5.7</b>	<b>Relação entre Déficit de Volume Plasmático e Osmolaridade sérica.....</b>	<b>94</b>
<b>5.5.8</b>	<b>Relação entre lactato-L plasmático e concentração de glicose plasmática.....</b>	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>96</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>103</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>104</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A espécie ovina foi a segunda espécie a ser domesticada pelo homem e a primeira para fins de alimentação e vestuário, estando presente em nosso meio desde o surgimento da humanidade. Sua distribuição é mundial, estando em regiões com as mais diferentes características edafoclimáticas. Apesar disso, somente em alguns países oferece expressão econômica, apresentando na maioria dos casos, níveis baixos de tecnologia e, com efeito, baixo retorno financeiro.

Para reverter tal situação, tem se buscado nos últimos anos, uma maior tecnificação e intensificação dos sistemas de criação, visando aperfeiçoar o manejo nutricional dos ovinos e melhorar os índices de produtividade. Acompanhando esta intensificação do sistema de criação de ovinos, que segue os moldes da espécie bovina, surgem problemas semelhantes nesta espécie dos que ocorrem na espécie bovina criada de forma intensiva, sendo que os distúrbios de origem nutricional e metabólica surgem em grande número nesta espécie nos últimos anos. Destes, a acidose láctica ruminal aguda (ALRA) apresenta um papel preponderante entre os distúrbios, pois tem como origem a ingestão excessiva de carboidratos solúveis por animais não adaptados a este tipo de dieta, que é prática muito comum em sistemas de criação intensivos.

Inicialmente a ALRA causa uma acidose ruminal, devido a um marcante aumento da produção de ácido láctico no interior do órgão, que usualmente atinge concentrações superiores a 120 mM/L de ácido (OWENS et al., 1998; MARUTA; ORTOLANI, 2002;). Esta acidose também provoca um aumento da osmolaridade ruminal, que pode ser superior a do sangue, causando uma passagem de fluidos do interior desse órgão e gerando um quadro de desidratação variável. Além disto, parte do ácido láctico é absorvida provocando um intenso quadro de acidose metabólica sistêmica que pode levar o animal a morte (OWENS, 1998; RADOSTITS et al., 2007)

Um das possibilidades de prevenção da ALRA em animais recebendo dietas ricas em carboidratos é a adição de compostos ionóforos à ração total (AFONSO et al., 2000). Tais compostos são substâncias antimicrobianas de baixo peso molecular produzidas por várias cepas de *Streptomyces* sp as quais podem ter diferentes tipos de ação, destacando-se a ação seletiva sobre bactérias de forma que as Gram negativas possam sobreviver, inibindo as Gram positivas. Mais de 70 diferentes

ionóforos já foram identificados, destacando-se a monensina e a lasalocida (NAGARAJA et al., 1982).

Na ALRA o excesso de carboidratos solúveis possibilita o súbito e exponencial crescimento de certas bactérias Gram positivas, as quais geram intensa produção de ácido láctico e queda brusca no pH ruminal, interferindo na atividade e sobrevivência das bactérias lactilíticas (Gram -), especializadas em metabolizar o ácido láctico. O uso contínuo de ionóforos diminui drasticamente a população de *Streptococcus bovis* e aumenta a de bactérias lactilíticas, reduzindo o risco de ALRA (NAGARAJA et al., 1982; NAGARAJA; LECHTENBERG, 2007).

Apesar de apresentarem resultados satisfatórios, os ionóforos, por se tratarem de antibióticos, acarretam riscos, mesmo que remotos, de provocarem algum tipo de resistência cruzada, ou seja, uma possível seleção em animais de bactérias resistentes a antibióticos e sua transmissão para seres humanos. Por este motivo sua utilização como promotor de crescimento foi proibida em toda União Européia a partir de 2006 (MEDEL et al, 2007). É possível que em breve futuro tal medicamento também tenha seu uso proibido na alimentação animal no Brasil.

Tem crescido o número de estudos com o uso de probióticos na nutrição de bovinos, visando aumentar a produtividade e estimular o crescimento das populações de bactérias e protozoários do rúmen, em especial as celulolíticas e as consumidoras de lactato, visando aumentar a digestão da fibra bruta, bem como prevenir o surgimento de quadros de acidose. (NAGARAJA; LECHTENBERG, 2007). Esses aditivos são constituídos de microorganismos vivos (leveduras ou bactérias), os quais podem favorecer de várias formas o ambiente ruminal.

Em ruminantes, destaca-se a utilização de uma série de leveduras, em especial a *Saccharomyces cerevisiae*, que também apresenta a maioria das funções citadas acima, além de promover manutenção das concentrações adequadas de amônia no rúmen, favorecendo a estabilização do pH ruminal (PERREIRA et al., 2001; NAGARAJA; LECHTENBERG, 2007). Embora tenham sido feitos vários ensaios “in vitro” e “in vivo” da ação do *S. cerevisiae* em aumentar a atividade de bactérias consumidoras de lactato, até o momento não foi realizado nenhum estudo definitivo que tenha testado de forma objetiva a ação preventiva de probióticos frente a um quadro experimental de ALRA. Também não foram encontrados estudos que avaliassem comparativamente a ação desse probiótico e da monensina, ambos disponíveis no mercado nacional, como medida profilática da ALRA em ovinos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PROCESSO FERMENTATIVO DO RÚMEN

#### 2.1.1 Estrutura compartimentada do aparelho gástrico dos ruminantes

Os animais desenvolveram diferentes meios para extrair dos alimentos a energia necessária para a manutenção dos processos biológicos. Todos os mamíferos herbívoros dependem de uma relação simbiótica com microorganismos habitantes do seu trato gastrointestinal, que possuem a habilidade de obter energia dos componentes vegetais ingeridos. Por meio dessa relação, os ruminantes obtêm a energia necessária através de processos fermentativos que ocorrem no rúmen, que é o órgão especializado para realizar essa fermentação (FLINT, 1997).

A família *Bovidae*, cujos ruminantes são os representantes, é constituída por animais essencialmente herbívoros, exceto pelos antílopes da subfamília *Cephalophinae*, que são onívoros, todas as espécies são herbívoras, e desta forma foram evolutivamente adaptadas para retirar a energia necessária para sua manutenção dos carboidratos oriundos dos vegetais ingeridos (SOLARI e BAKER, 2007).

Desde a antiguidade que se conhece a estrutura compartimentada do aparelho gástrico dos ruminantes. No seu livro *De Partibus Animalium*, Aristóteles descreve as quatro câmaras gástricas características: o Rúmen, o Retículo, o Omaso e o Abomaso, que são chamados por ele o Koilia Megale, Kekryphalos, Echinus e Enystron, respectivamente. Segundo sua hipótese, essas câmaras seriam uma maneira de compensar a ausência de dentes incisivos superiores dos ruminantes, e que, durante a sua passagem através das câmaras o alimento é reduzido a uma polpa, e esta sendo a forma utilizável pelo organismo animal (LONES, 1912). O rúmen é o maior dos quatro compartimentos e está conectado com o retículo e o esôfago. É constituído de quatro sacos musculares: saco dorsal, saco ventral, saco caudo-dorsal cego e caudo-ventral cego (DUKES e SWENSON, 1988)

A estrutura compartimentada do rúmen apresenta um equilíbrio bioquímico e uma inter-relação entre a população de microorganismos e o animal hospedeiro complexos ao ponto de caracterizá-lo como um verdadeiro ecossistema, e como tal

comporta-se da mesma forma que os macrossistemas biológicos, havendo um fluxo de entrada e um fluxo de saída de biomassa, vias metabólicas, efeitos do meio, distribuição da população, estabilidade e resposta a mudanças do meio etc. (OLDHAM, 1991b).

### **2.1.2 Transformações bioquímicas da ingesta**

Foi Peyer (1685 apud (HUNGATE, 1966) quem primeiro reconheceu que ocorriam processos fermentativos bacterianos no ecossistema ruminal. O primeiro a identificar o metano e CO<sub>2</sub> como produtos dessa fermentação foi Reiset em 1863 (apud (SMITH e HUNGATE, 1958), em um estudo sobre a química na respiração de animais de fazenda, sugerindo que os microorganismos metanogênicos são abundantes nesse ambiente.

A composição do conteúdo ruminal é dependente de dois fatores principais: A composição da ingesta e a população de microorganismos. É esta inter-relação entre os grupos de microorganismos, os produtos metabólitos e substratos de crescimento microbiano que determinam a composição do conteúdo ruminal (HUNGATE, 1960).

A composição da ingesta interfere na composição do conteúdo ruminal de maneira imediata após a ingestão. Em contrapartida, a população bacteriana interfere de maneira mediata, através dos metabólitos produzidos durante seu ciclo vital, tendo como substrato de crescimento o alimento ingerido pelo animal e assim sua modificação surge algumas horas após a ingestão do alimento através da transformação química dos mesmos.

Entre os principais carboidratos alimentares ingeridos pelos ruminantes temos a celulose, os amidos, os monossacarídeos e os polissacarídeos como a pectina, os quais sofrem transformação química, resultando na produção de ácidos graxos voláteis de cadeia curta (AGVCC) que são o ácido acético, butírico e propiônico que são utilizados como fonte de energia pelo animal, além de outros ácidos em menores quantidades como o fórmico, succínico, ácido láctico e pequenas quantidades de etanol. O metabolismo fermentativo ruminal também produz gases como hidrogênio (H<sub>2</sub>) e metano (CH<sub>4</sub>) (DIJKSTRA, et al., 2005). Todos estes metabólitos quando em condições normais mantêm a concentração adequada por consequência do equilíbrio da população bacteriana produtora dos mesmos, sendo

que o sistema ruminal consegue manter a homeostase ainda que haja mudança na composição da dieta, contanto que esta mudança seja gradual (SUN, et al., 2010).

A população microbiana do rúmen está composta principalmente por bactérias e protozoários, mas também apresenta em menor número fungos, archaea e vírus. (JANSSEN e KIRS, 2008). As bactérias são os principais microorganismos ruminais, e os mais importantes para o organismo hospedeiro são as que possuem como substrato de crescimento os carboidratos. Estes variam desde os complexos carboidratos estruturais até os estruturalmente simples como os amidos e açúcares, sendo que a diferença entre suas estruturas moleculares é o fator determinante na velocidade de degradação pelos microorganismos (CARVALHO et al., 2001). Carboidratos não estruturais são também chamados de carboidratos solúveis, os quais são prontamente disponíveis para os microorganismos, diferentemente dos carboidratos estruturais como a celulose que por ter uma estrutura cristalina tem sua velocidade de degradação bastante reduzida se comparada com o amido, por exemplo, que é um carboidrato não estrutural.

É sabido que cada população microbiana ruminal específica ocupa um nicho. Quando as condições mudam quer sejam pela alteração da dieta, quer seja pela adição de compostos a uma dieta já existente, alguns microorganismos têm seu crescimento inibido, apresentando um número populacional tão reduzido que sua contribuição para o metabolismo ruminal torna-se reduzida (BARAN et al., 1986). Em contrapartida, outras espécies podem apresentar um crescimento populacional significativo, dependente da presença do substrato de crescimento. Esse é o princípio pelo qual se realizam as adaptações a dietas com maior ou menor quantidade de concentrado, e também é o princípio pelo qual se utilizam aditivos como os ionóforos a dieta de ruminantes. Como desdobramento deste princípio de estabilidade do sistema microbiano ruminal tem-se os distúrbios fermentativos como a ALRA.

Isto ocorre graças a uma complexa inter-relação entre os grupos de microorganismos e a concentração dos diferentes substratos presentes no ambiente ruminal. Acontece às vezes que quando *in vitro* os produtos finais desse processo fermentativo apresentam diferenças significativas do que são encontrados no próprio rúmen como, por exemplo, o formiato, succinato e gás hidrogênio, que são encontrados em culturas de bactérias ruminais, porém a quantidade presente no próprio rúmen dos animais é bastante inferior, o que indica que estes produtos

servem de substrato para o crescimento de outras populações no rúmen, por exemplo temos a espécie *Ruminococcus flavefaciens* que a partir da glicose pode produzir tanto o ácido succínico quando na presença de CO<sub>2</sub>, como produz o ácido láctico quando na ausência de CO<sub>2</sub> (SONG e LEE, 2006).

O amido é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza. Pode ser encontrado em sementes, raízes e fibras de plantas, e é composto basicamente de dois polissacarídeos de D-glicose: amilose e amilopectina. A velocidade de conversão de amido em glicose varia de acordo com a composição. Por exemplo, o amido da Batata (*Solanum tuberosum*) difere basicamente do amido do Aipim (*Manihot utilissima*) na relação entre amilose e amilopectina (FERREIRA et al., 2009). As características do amido, bem como as condições de processamento a que são submetidos os produtos amiláceos, são de grande importância na alteração das taxas de hidrólise. A superfície exposta para o ataque microbiano, o tratamento térmico e pressão, o processamento e a redução de tamanho da partícula e alta umidade de armazenamento de grãos de amido aumentam a disponibilidade e a taxa de hidrólise, o que aumenta o grau de severidade da acidose (TEIXEIRA et al., 1998);(REINHARDT et al., 1997; MARUTA, 2000).

Os níveis de hexoses e trioses presentes no rúmen em situações de normalidade são tão baixos que raramente são detectadas no rúmen, ainda que sejam produtos da hidrólise dos amidos presentes na dieta. Isso ocorre, pois são rapidamente transformadas em piruvato pela via glicolítica. O piruvato, por sua vez, é prontamente transformado em ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato), fazendo com que os níveis dessas substâncias raramente atinjam níveis mensuráveis no rúmen (BERGMAN, 1990).

A digestão microbiana dos alimentos converte os substratos em ácidos orgânicos. Enquanto a disponibilidade de substrato não ultrapassa a taxa de absorção relativa à sua produção, a concentração de ácidos e fermentação ruminal se mantém estável, variando entre 5,8 e 6,5, mas jamais abaixo de 5,5. Quando o pH do rúmen se encontra na faixa 5,0 a 5,5 é considerado como acidose subaguda ou crônica, e pH abaixo de 5,0, aproximando-se 4,5 ou inferior, considera-se a acidose como aguda (OWENS et al, 1998; KRAUSE e OETZEL, 2006; NAGARAJA e LECHTENBERG, 2007).

A principal espécie produtora de ácido láctico no rúmen é a *Streptococcus bovis*, Esta espécie não é capaz de fermentar carboidratos estruturais, e em um



rúmen cuja alimentação tem como base alimentos volumosos sua população é bastante reduzida, e só é capaz de crescer quando há glicose disponível (ASANUMA e HINO, 2002) , ainda que em animais alimentados com dietas de alto teor de concentrado, esta espécie é encontrada em pequenas quantidades no rumem (OWENS et al., 1998).

As bactérias do rúmen podem ser classificadas como "produtoras de lactato" ou "consumidoras de lactato." O equilíbrio entre estes dois grupos determina se o lactato se acumulará ou não no rúmen. Produtos finais de cepas bacterianas podem mudar dependendo da disponibilidade de substrato. (RUSSELL e HINO, 1985). As espécies consumidoras de lactato são sensíveis ao pH baixo, enquanto a maioria dos produtores de lactato não são. Em condições anaeróbias, o piruvato é convertido em lactato para regenerar o NAD utilizada na glicólise. Sob condições normais, o lactato não se acumula no rúmen em concentrações acima de 5mMol/L (SLYTER, 1976).

## 2.2 ACIDOSE LÁCTICA RUMINAL AGUDA

### 2.2.1 Histórico

Doenças metabólicas e digestivas em ruminantes são quadros que apresentam complexas relações de causalidade. Distúrbios como acidose ruminal vem acometendo os animais ruminantes desde que estes foram domesticados. Entretanto, a prevalência desses transtornos tem aumentado com o advento de sistemas de manejo intensificados, onde a alimentação concentrada e uso extensivo de grãos processados tornou-se uma premissa para que se obtenha o máximo de ganho de peso dentro do menor tempo possível (BENTON, 2010).

No manejo nutricional de confinamento, é uma prática comum realizar a transição dos animais alimentados em pasto para dietas de alto concentrado através de um período de adaptação o mais rapidamente possível (DUCKETT et al., 1993).

A adaptação às dietas de terminação é um processo crítico que pode expor os animais a um elevado risco de acidose. (NAGARAJA e CHENGAPPA, 1998; VECHIATO, 2009).

A acidose láctica ruminal aguda é um quadro enfermício que acomete animais

ruminantes, que por motivo de ingestão excessiva de carboidratos solúveis, que são rapidamente fermentados e convertidos em ácidos orgânicos, e como resultado tem a concentração de ácido láctico no rúmen aumentada em até cem vezes em relação à concentração normal (ORTOLANI, 1995; MARUTA, 2000; NAGARAJA e TITGEMEYER, 2007; OBA e WERTZ-LUTZ, 2011). Com esse aumento súbito, os mecanismos de eliminação do ácido láctico pelo organismo do animal não são suficientes para manter o nível normal, ocorrendo assim o acúmulo deste ácido, tendo como conseqüência a marcada queda de pH e o aumento da osmolalidade ruminal, o que afeta negativamente a absorção e produção de endotoxina e amidas como a histamina que também desempenham um papel nos efeitos fisiológicos da doença, que incluem estase ruminal, diarreia e desidratação, acidose sistêmica e, em casos agudos, insuficiência respiratória, cardiovascular e renal (HUBER, 1976).

Por se tratar de um distúrbio decorrente de praticas de alimentação modernas, somente no século XIX que houve o primeiro relato da ALRA, quando Reiset em 1863 afirmou que as indigestões agudas seguidas de óbito que acometiam ruminantes eram precedidas em até 24 horas por grande ingestão de grãos (HUNGATE, 1966).

Phillipson e Mcanally, (1942) estudaram o processo da fermentação dos carboidratos no rúmen de ovelhas, avaliando a produção de ácidos orgânicos a partir de diferentes tipos de açúcar e amido. Foi sugerido que o ácido láctico poderia ser um estágio transitório no processo fermentativo da glicose, pois os mesmos constataram que esta substancia surgia rapidamente após a ingestão, mas também desaparecia rapidamente enquanto os ácidos graxos de cadeia curta apresentavam posteriormente elevação nos níveis de concentração ruminal (PHILLIPSON; MCANALLY, 1945).

Entre as décadas de 1960 e 1980 a produção de grãos apresentou uma caracterizada redução nos custos de produção, aumento da produtividade e conseqüente redução dos preços no mercado, o que possibilitou a expansão do número de gado em confinamento. Essa expansão nos confinamentos levou a um crescente interesse da pesquisa veterinária em estudar os distúrbios que acompanharam essa intensificação no manejo, o que refletiu em um aumento de publicações de pesquisas sobre acidose a partir da década de 1960 (VASCONCELOS e GALYEAN, 2008)

Hungate, que estudou as mudanças na dinâmica populacional bacteriana do rúmen já na segunda metade do século XX, explicou que as mudanças que resultam na indigestão ácida em ruminantes relacionavam-se com o aumento da população de *Streptococcus bovis*, sendo esse um fator importante no surgimento da acidose por ser o principal organismo produtor de ácido láctico no ambiente ruminal (HUNGATE, 1966).

Allison e colaboradores, em um experimento com ovinos canulados, inocularam o conteúdo ruminal de animais adaptados previamente com dieta rica em concentrado. Como resultado encontraram uma queda no pH ruminal, aumento de lactato e ácidos graxos de cadeia curta. Este foi um dos primeiros esforços para compreender as mudanças ruminais concomitantes ao processo adaptativo de dietas à base de grãos (ALLISON et al., 1964).

Uhart e Carroll (1967) observaram a relação entre a concentração de lactato e pH ruminal, fato também observado por Telle e Preston (1971), que sugeriram que o ácido láctico era a principal causa de acidose.

Seguindo os avanços nas pesquisas sobre a origem e a patogenia da acidose alcançados nas décadas anteriores, na década de 1970 o foco das pesquisas desenvolvidas na área voltou-se para a compreensão de como os métodos de adaptação afetam as mudanças fisiológicas e ruminais relacionadas com a acidose (DUNLOP, 1972).

Outros estudos demonstraram que embora a concentração ruminal de glicose seja normalmente baixa no rúmen, nos episódios de acidose a sua contração podia superar a sanguínea (SLYTER, 1976). Alguns estudos visando prevenir a acidose foram feitos empregando antibióticos como aditivos alimentares, porém, o emprego de Penicilina G e Tetraciclina não se mostrou economicamente viáveis e nem seguros sob o ponto de vista sanitário (MUIR e BARRETTO, 1979)

Nessa mesma década, surgiram os trabalhos visando determinar um modelo seguro de indução da acidose láctica ruminal aguda (KEZAR e CHURCH, 1979).

Na década de 1980, com o advento de diversas substâncias no mercado de aditivos alimentares, surgiram trabalhos que objetivavam estudar os efeitos de aditivos potencialmente preventivos, especialmente os ionóforos. Assim sendo, foram publicadas pesquisas realizadas com modelos *in vitro* e *in vivo* para testar a eficiência desses aditivos, trabalhou-se também modelos de indução de acidose láctica ruminal (MUIR et al., 1981; NAGARAJA et al., 1982; NAGARAJA et al., 1985;

NAGARAJA e TAYLOR, 1987; NEWBOLD e WALLACE, 1988).

Nos anos de 1990 as pesquisas seguiram estudando os diversos aspectos que poderiam interferir no desenvolvimento da enfermidade. Prosseguiu-se com os estudos sobre os agentes bacterianos causadores, agora suportados pelos avanços nas técnicas de biologia molecular (RUSSELL, 1991; RICKE et al., 1996). Estudos sobre as implicações sistêmicas da acidose revelaram que posterior a um episódio de acidose láctica ruminal aguda ocorria um aumento de prostaglandinas F, redução de ferro e aumento da temperatura corporal, o que seria indicativo de que o estado endotoxêmico pós-acidose de fato ocorria (AIUMLAMAI et al., 1992).

Andersen et al.(1994) em um estudo com vacas submetidas a acidose láctica ruminal aguda induzida registraram a liberação de prostaciclina, 6-Cetoprostaglandina F1 Alfa e tromboxano B2, mostrando que endotoxinas e metabólitos do ácido araquidônico de origem pré-hepática poderiam ser fatores envolvidos nas complicações sistêmicas subsequentes à acidose ruminal. Outros estudos também foram publicados relacionando as complicações pós acidose ruminal com a liberação de substâncias vasoativas e o surgimento de laminites e outros problemas de casco (NOCEK, 1997).

Na mesma década, diversos trabalhos foram escritos sobre métodos de controle da acidose, estes estudos focavam sua atenção na adaptação adequada (REINHARDT et al., 1997), entretanto um elemento novo surgiu, a imunização contra agentes produtores de ácido láctico (SHU et al., 1999). Em 1998, Owens et al.(1998) publica uma revisão que torna-se um trabalho clássico da década sobre o assunto.

A partir da década de 2000 concomitantes ao prosseguimento das linhas de pesquisa tradicionais, surgem abordagens novas para o estudo e a prevenção da doença. Com o aperfeiçoamento das tecnologias de sistemas de aquisição de dados por telemetria, a monitoração contínua do pH ruminal trouxe uma visão mais completa sobre os fenômenos ruminais (BEAUCHEMIN et al., 2003; ENEMARK et al., 2003; ALZAHAL et al., 2007).

Gill et al.(2000) em um estudo com ovinos sugerem que o risco de acidose láctica pode ser reduzido pela imunização contra *S. bovis* e *Lactobacillus*.

Os probióticos, especialmente os baseados em leveduras que já vinham sendo estudados desde a década de 90 (CALLAWAY e MARTIN, 1997) passaram a despertar o interesse como aditivos potencialmente capazes de ajudar na prevenção desde o início da década de 2000 (YANG et al., 2004), porém foi a partir de 2006,

com a proibição da utilização de ionóforos pela Comunidade Européia que as pesquisas com probióticos na alimentação de ruminantes se intensificaram (BROSSARD, et al., 2006; BACH et al., 2007; CHIQUETTE, 2009)

### **2.2.2 Ocorrência**

Tanto ruminantes domésticos como selvagens são passíveis de sofrer acidose láctica ruminal aguda, entretanto a ocorrência em animais selvagens é rara, pois depende de fatores os quais não são encontrados no ambiente selvagens, vindo a incidir em exemplares mantidos em cativeiros e zoológicos (SCHILCHER et al., 2010). A baixa ocorrência se aplica para ruminantes domésticos criados em regime extensivo, cujos episódios de ALRA se dão principalmente em casos de ingestão acidental de grande quantidade de grãos, quando o animal tem acesso acidental a algum local de estocagem de grãos na fazenda. Em rebanhos criados em sistema intensivo ou semi-intensivo a morbidade pode variar de 2% a 50%, por outro lado a letalidade varia de 30 a 40% em animais tratados e chega a 90% em animais que não recebem tratamento (RADOSTITIS et al., 2007).

De acordo com Nagaraja (2007) doenças digestivas apresentam a segunda maior causa de mortalidade no gado de corte confinado americano, abaixo apenas das doenças respiratórias. Óbitos por causa digestiva variam entre 0,05 a 0,08% da ocupação total, representando 26% do total das mortes.

Silva et al. (2009) relatam que o problema da ALRA também vem ocorrendo em ovinos criados em regime intensivo no estado do Pará e Maranhão. Vieira et al. (2006) reporta que a ALRA correspondeu a 5,4% dos atendimentos de ovinos realizados na Clínica de Bovinos, Campus Garanhuns da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), no período de janeiro de 2000 a outubro de 2006.

O sistema nacional americano de monitoramento de saúde animal publicou em 2009 um relatório apontando os distúrbios digestivos, entre eles está incluída a acidose, como a terceira causa de óbitos de origem não predatória entre ovinos, correspondendo a 13,2% do total de perdas (N.A.H.S., 2009).

### 2.2.3 Etiopatogenia

O rúmen é um órgão digestivo e também um biossistema. As origens da acidose estão na desordem das relações desse biossistema com o organismo ruminante, para compreender esta desordem devemos considerar os diversos fatores envolvidos no surgimento e desenvolvimento da ALR, tais como: o consumo de alimentos pelo animal, composição da dieta, a população microbiana ruminal, comportamento alimentar e mudanças climáticas são alguns dos diversos fatores envolvidos nesta afecção (GALYEAN e ENG, 1998). Owens em sua clássica revisão de 1998 dividiu em 12 etapas os fenômenos envolvidos no surgimento e estabelecimento do quadro de acidose láctica ruminal aguda, que inicia com aumento da concentração de amido no rúmen e encerra com o metabolismo e a excreção do ácido láctico. As mudanças no rúmen ocorrem após a alimentação, e podem variar de acordo com a composição, o volume ingerido e a frequência com que o alimento é consumido (OWENS et al., 1998).

O aumento da concentração de amido e outros carboidratos prontamente fermentáveis no rúmen ocorrem em função tanto de erros de manejo nutricional quanto em casos de ingestão acidentais, sendo o segundo caso menos freqüente (RODRIGUES, 2009). Entre os alimentos causadores, citam-se os grãos (trigo, milho, sorgo, arroz, etc.), frutas (pêra, maçã, uva, laranja, tomate, etc.), verduras (repolho, couve-flor, beterraba, etc) farinhas e farináceos (fubá, farelo, raspa de mandioca, etc), subprodutos industriais (melaço, resíduos de cervejaria, polpa de laranja, soro, lácteo, grãos fermentados de uisqueria, etc.), e concentrados comerciais (DUNLOP, 1972; REINHARDT et al., 1997; MARUTA, 2000).

Com a presença de glicose livre, ocorrem mudanças na dinâmica populacional microbiana no rúmen envolvendo a *S. bovis* e esta passa a produzir como metabólito de seu crescimento grande quantidade de ácido láctico. Porém outras bactérias envolvidas diretamente na fermentação do amido poder ser fontes importantes de ácido láctico (SLYTER e RUMSEY, 1991). Assim como ocorre a produção de ácidos, ocorre também a liberação de mediadores químicos da inflamação como histaminas, prostaglandinas e tromboxanos o que leva a absorção de endotoxinas (ANDERSEN et al., 1994).

Quando a glicose é liberada a partir da hidrólise do amido, ocorre um aumento da osmolalidade ruminal, esse aumento de osmolalidade inibe a absorção dos ácidos graxos de cadeia curta, o que contribui para a redução do pH ruminal.

Normalmente dentre os ácidos graxos de cadeia curta produzidos, o ácido acético é o predominante, representando em média 70% do total de AGVCC, seguido pelo propiônico (cerca de 20%) e butírico (cerca de 8%). Entretanto nos quadros de ALRA, em consequência da disposição de substratos nas primeiras horas do processo fermentativo, rapidamente o ácido propiônico torna-se preponderante, com subsequente redução da proporção de ácido acético. Com o progresso da acidose a concentração destes ácidos é drasticamente reduzida. Essa redução é efeito da taxa de absorção destes ácidos, da destruição da microbiota ruminal normal produtora de AGVCC e a diluição dos fluidos ruminais pelo influxo compensatório do aumento de osmolaridade ruminal (DUNLOP, 1972).

Com o decréscimo do pH as bactérias Gram negativas consumidoras de ácido láctico como *Selenomonas ruminantium*, *Megasphaera elsdenii* e *Veillonella alcalescens* tem sua atividade reduzida (HENDERSON, 1980; MAROUNE e BARTOS, 1987; NISBET e MARTIN, 1994). Entretanto as espécies produtoras de ácido láctico como *S. bovis* e especialmente os *Lactobacillus sp* são ácido-resistentes. Desta forma o crescimento das bactérias produtoras de ácido láctico contribui para o progresso da acidose ruminal, acelerando a queda do pH ruminal, que acompanha o aumento da produção de lactato em pH baixo. Essas bactérias Gram positivas ao gerarem intensa produção de ácido láctico e queda brusca no pH ruminal, interferem negativamente na atividade e sobrevivência das bactérias Gram negativas lactilíticas especializadas em transformar o ácido láctico em substâncias inativas (RUSSELL e HINO, 1985). Quando o pH atinge um valor abaixo de 5,4, ocorre a morte dos protozoários ruminais e das bactérias Gram negativas consumidoras de ácido láctico. Essas que são predominantes no rúmen normal acabam por ser substituídas pelas Gram positivas produtoras de ácido. A mudança ocorre tão rapidamente que o processo de proliferação de bactérias produtoras de ácido láctico e morte das consumidoras de ácido láctico ocorrem em média dentro de 20 horas após a ingestão excessiva de carboidratos solúveis (OLDHAM, 1991a).

Com o pH atingindo valores abaixo de 4,8 os *Lactobacillus sp* tem seu crescimento substancialmente favorecido, e estas espécies assim como o *S. bovis*, possuem como metabólito final de crescimento o ácido láctico.

O ácido láctico apresenta dois isômeros, o levógiro (L+) e o dextrógiro (D-). Em situações normais a forma levógira (L+) é encontrada em concentrações superiores a forma dextrógira na proporção de 5:1. Nos quadros de ALRA, essa proporção passa a ser de 1:1, porém isso não reflete a produção visto que ocorre a interconversão entre as formas por meio de L-lactato-racemase, em combinação com uma L-lactato-desidrogenase produzida por certas espécies de bactérias fermentadoras de ácido láctico. O ácido láctico apresenta um pK de 3,7, o que é considerado baixo, e em sua grande parte encontra-se dissociado em lactato e íons  $H^+$  quando no interior do rúmen. (EWASCHUK et al., 2005; NAGARAJA e TITGEMEYER, 2007).

Como consequência do aumento da concentração de agentes osmoticamente ativos no meio, ocorre uma elevação da osmolalidade ruminal. O valor fisiológico normal para a osmolalidade ruminal pode variar de acordo com a dieta. Dietas compostas basicamente por forragem costuma resultar em osmolalidade ligeiramente inferiores àquelas encontradas em dietas ricas em concentrado, 240 a 265 mOsm/L e 280 a 300 mOsm/L respectivamente (OWENS et al., 1998).

Huber (1971) verificou que ovinos com ALRA apresentavam aumento da osmolalidade ruminal, passando de 255 mOsm/L em condições normais para 402 mOsm/L no momento de pico. Segundo (CARTER e GROVUM, 1990) a osmolalidade sérica normal dos ruminantes varia entre 285 e 310 mOsm/L. Por diferença de pressão osmótica entre os compartimentos, ocorrer então um seqüestro de líquidos para o interior do rúmen. A maior parte desse líquido que é transferido é oriundo do espaço intersticial.

Em decorrência da alta concentração de ácido láctico no rúmen, sucede a absorção do ácido láctico presente no rúmen. Este ácido uma vez presente na circulação sanguínea se dissocia em lactato e íons  $H^+$ , que prontamente reage com o bicarbonato sanguíneo, que age como tampão e mantém a homeostase. A forma levógira do lactato (L+) pode ser metabolizada no fígado por intermédio da oxidação ou da gliconeogênese, sendo convertido em glicose e no processo consome íons  $H^+$ , apresentando assim a propriedade tamponante (LEAL et al., 2007).



## 2.2.4 Sinais Clínicos

Ruminantes com ALRA podem apresentar quadros clínicos bastante diversificados, em dependência da espécie envolvida, da quantidade de carboidratos ingerida, do estágio do processo acidótico e da susceptibilidade individual do animal (OWENS et al., 1998; NAGARAJA e LECHTENBERG, 2007; RADOSTITS et al., 2007).

Nas horas iniciais os sinais clínicos são quase inexistentes, visto que o processo fermentativo e a conseqüente queda do pH requer um tempo mínimo para que ocorra. Nesse momento pode ocorrer a perda do apetite por parte do animal. Levam-se em média 10 horas para que surja uma modificação no estado geral do animal, podendo então manifestar apatia e depressão. Em alguns animais podem surgir meteorismo gasoso leve. A partir da décima quarta hora, quando por decorrência da absorção do ácido láctico ruminal, inicia-se a acidose metabólica sistêmica e os sinais clínicos se acentuam. Nesse momento podemos encontrar taquicardia. A taquipneia é presente em casos de acidose metabólica leve, cujo pH sanguíneos mantêm acima de 7,18. Quando em casos de acidemia muito intensa pode ocorrer a redução da freqüência respiratória. Em função do aumento de osmolalidade ruminal e ulterior transferência de líquidos para a luz do órgão, surgem os sinais de desidratação. As mucosas tornam-se hiperêmicas, os vasos episclerais congestos. A temperatura retal é variável, podendo apresentar em casos de desidratação mais intensa quadros de hipotermia. Caso a desidratação torne-se intensa ainda observamos o muflo seco, enoftalmia, temperatura cutânea baixa nas extremidades, oligúria ou anúria (UNDERWOOD, 1992; DIRKSEN et al., 2005; RADOSTITS et al., 2007). Em grande parte dos casos ocorre atonia ruminal. Entretanto alguns animais podem apresentar fracos movimentos de baixa tonicidade no transcorrer do quadro sendo essa estase dos movimentos considerada um mecanismo de defesa, pois na ausência de movimentos o órgão reduz (HUBER, 1976).

Um quadro freqüentemente encontrado é a diarreia. Cujas fisiopatologia é a mesma das demais diarreias osmóticas, No caso da acidose, o ácido láctico assume o papel de substância de baixa absorção, mantendo a alta osmolaridade na luz do trato gastrointestinal. Essa diferença de pressão osmótica carrega grande quantidade de água para a luz intestinal na tentativa do organismo para manter a isotonicidade

intraluminal, superando a capacidade intestinal de absorção. Como consequência, pode-se notar fezes bastante diarreicas, porém por conta da própria origem dessa diarreia, pode-se notar também que a frequência de defecação não é muito alterada, assim como o volume de fezes também não sofre grande aumento (MARUTA e ORTOLANI, 2002; DIRKSEN et al., 2005; NAGARAJA e LECHTENBERG, 2007).

Em ovinos os sinais clínicos são similares àqueles encontrados em bovinos, embora bruxismo e fasciculação muscular sejam relatados em alguns casos. Ovinos diferem de bovinos em sua função ruminal no tocante à velocidade do fluxo de conteúdo através do rúmen, sendo que a passagem pelo rúmen dos ovinos é mais rápida que em bovinos. Ovinos tendem a apresentar uma maior incidência de complicações entéricas como a enterotoxemia, se comparados a bovinos (PULINA, 2005).

## 2.3 MENSURAÇÃO DO pH RUMINAL

### 2.3.1 Potencial hidrogeniônico do conteúdo ruminal

O potencial hidrogeniônico é uma grandeza físico-química que indica a acidez, neutralidade ou alcalinidade de uma solução aquosa (FRANCIS, 2011). Trata-se de um parâmetro de extrema importância para a o rúmen, pois as diferentes espécies bacterianas possuem faixas de pH ótimo para o crescimento, sendo que o pH juntamente com a concentração de substratos são fatores importantes na manutenção do equilíbrio populacional e por conseguinte bioquímico do rúmen (OWENS et al., 1998).

O rúmen é um ambiente bastante heterogêneo quanto a parâmetros de pH e temperatura. O valor fisiológico do pH ruminal apresenta um ciclo nictemeral de variação e seus valores são influenciados pelo tipo de alimento consumido, a ingestão de água e a ruminação (ALLISON et al., 1964). Sua estabilidade é mantida através de uma complexa relação entre a população bacteriana e os substratos de crescimento disponíveis no rúmen, produtos da fermentação e o efeito tamponante da saliva (CZERKAWSKI, 1986). Nagaraja e Lechtenberg, (2007) relatam que a fermentação ruminal habitual mantém o pH ruminal oscilando entre valores de 5,5 a 6,5.

Ørskov (1986) relata que a redução de pH fisiológica ocorre imediatamente após a ingestão de alimentos, atingindo os valores mais baixos no período compreendido entre 30 minutos e 4 horas após a ingestão. Se a dieta tiver uma boa quantidade de fibras essa queda é menos pronunciada em função do aumento da secreção salivar durante o ato da ruminação. A absorção dos ácidos graxos de cadeia curta pela parede do rúmen reduz a concentração de ácidos e com isso também leva a um aumento do pH ruminal. Esse processo envolve a troca de íons sódio e hidrogênio pelas células epiteliais. O mecanismo envolvidos nas alterações locais no pH próximo à superfície absorptiva do rúmen ainda não estão totalmente esclarecidos (RODRIGUES, 2009) . Ørskov (1986) ainda relata que em pH abaixo de 6,2 há uma redução da atividade de degradação das fibras alimentares pelas bactérias fibrolíticas ruminais, por causa dessas espécies possuem o pH ótimo de atividade situado entre 6,7 e 7,1. De Veth e Kolver, (2001) após um estudo *in vitro* afirmaram que o valor do pH capaz de causar essa redução situa-se abaixo de 5.8.

O pH ruminal é um importante indicativo da digestão e da saúde do rúmen. A aferição do pH ruminal é um elemento chave na pesquisa com nutrição de ruminantes, especialmente quando se trata do estudo dos distúrbios fermentativos, como no caso da ALRA, onde a queda do pH é o principal sinal clínico (DUFFIELD et al., 2004).

### **2.3.2 Meios para a obtenção e aferição do pH ruminal**

O pH ruminal é importante na patogênese da ALRA, assim o monitoramento do pH ruminal é imprescindível para o estudo desta enfermidade (ENEMARK et al. 2003).

Um dos fatores que devemos ter em mente ao realizarmos a avaliação deste parâmetro é a variação nictemeral.

Existem várias formas de mensurar o pH ruminal, desde a mais simples como a utilização de sonda gástrica para coleta do conteúdo ruminal, rumenocentese, fístula ruminal, e sensores internos com ou sem fio (wireless).

### 2.3.2.1 A sonda gástrica

A utilização da sonda oroesofágica, também chamada de oro-ruminal, é a maneira mais simples de coletar o conteúdo ruminal. Consiste de um tubo que pode ser empregado tanto para retirar quanto para administrar conteúdos líquidos no rúmen (GEISHAUSER e MANNHARDT, 1994) e seu baixo custo e facilidade de manejo permite que seja amplamente utilizada. Entretanto a passagem da sonda se tiver que ser feitas repetidas vezes pode tornar-se um evento deveras desconfortável para o animal, além do fato da contaminação com saliva ser algo bastante comprometedor para um valor real do pH ruminal.

Uma sonda esofágica própria para essa finalidade é constituída de um tubo flexível, e dependendo do porte do animal deve possuir até 3,5m para bovinos. Deve conter múltiplas janelas na porção terminal, para que assim se reduzam as chances de ocorrer obstrução por conteúdo sólido durante a aspiração no momento da coleta. A sonda também deve apresentar a porção terminal mais pesada para poder submergir através da parte sólida estratificada do conteúdo ruminal e atingir o saco ventral do rúmen (DIRKSEN e SMITH, 1987)

Geishauser e Mannhardt (1994), realizaram um experimento com dez ovinos adultos realizando a comparação do suco de rúmen obtido através de sonda oroesofágica e através de cânula ruminal. Não foi encontrada nenhuma diferença significativa no pH, acidez titulável, potencial de oxirredução, nitrogênio amoniacal, acetato, lactato-L de sódio e concentrações de cloreto. No entanto foram encontradas diferenças significativas entre as amostras obtidas por sonda oroesofágicas e amostras de fístula no que diz respeito às concentrações de ácidos graxos de cadeias curtas totais, propionato, n-butilato, i-butilato, n-valerato, i-valerato, cálcio, fósforo, magnésio e potássio.

Hofírek e Haas (2001) em um experimento realizado com vacas leiteiras com o objetivo de avaliar o suco ruminal colhido através de sonda oroesofágica e rumenocentese do saco ventral do rúmen encontrou diferença significativa nos valores de pH, acidez titulável e quantidade total de ácidos graxos de cadeia curta, sendo o pH maior no grupo que utilizou a sonda oroesofágica.

Em um ensaio realizado com animais Nelore, cujo objetivo era estudar os efeitos do método de colheita de líquido ruminal através de sonda ou fístula ruminal, foi observado que o líquido ruminal colhido por fístula apresentou maior

concentração de ácidos graxos voláteis de cadeia curta (AGVCC), maior porcentagem de ácido propiônico, menor relação entre as porcentagens dos ácidos acético e propiônico e menor pH do que o colhido por sonda esofagiana, concluindo que a contaminação por saliva causa elevação do pH aferido (SALLES et al. 2003).

### 2.3.2.2 A Fistula Ruminal

Fístula é uma comunicação entre a luz de um órgão e o meio externo ou outro órgão. Uma fístula ruminal é uma abertura artificial, implantada cirurgicamente com a finalidade de permitir acesso direto ao conteúdo ruminal, possibilitando a avaliação da fisiologia e do metabolismo do órgão (DUFFIELD et al., 2004).

Para que se mantenha a fístula fechada, sendo aberta somente nos momentos de interesse ao pesquisador empregam-se cânulas com tampas removíveis. Para isso existem diversas cânulas ruminais disponíveis, fabricada em diversos materiais, entre os materiais rígidos disponíveis para a confecção se empregam metal, acrílico ou plástico. Dentre os materiais flexíveis existem cânulas de látex, borracha sintética, vinil ou silicone (KOMAREK, 1981). As cânulas de material flexível de maneira geral são mais fáceis de serem implantadas, além de causarem menos desconforto ao animal.

Animais canulados exigem um manejo mais cuidadoso, com algumas possíveis complicações após a implantação de cânulas permanentes. Por necessitar de cirurgia para sua implantação, podem ocorrer todos os reveses que se sucedem a uma cirurgia abdominal, como complicações durante a anestesia dependendo da técnica empregada, hemorragias, problemas de cicatrização, peritonite, etc. Posteriormente ainda existe a possibilidade de peritonite e vazamento de conteúdo ruminal. O vazamento de grande quantidade de conteúdo do rúmen pode levar o animal à desidratação e desnutrição. Além disso, o líquido ruminal extravasado causa lesões na pele, produz odor desagradável e o seu acúmulo na pelagem atrai moscas e favorece a ocorrência de miíases (MUZZI et al., 2009).

### 2.3.2.3 Aferição de pH *in situ*

Estudos visando avaliar o pH ruminal *in situ* vem sendo realizados nas últimas quatro décadas, sendo limitadas de acordo com a tecnologia disponível no momento (JOHNSON e SUTTON, 1968; MCARTHUR e MILTIMORE, 1968)

Garrett et al. (1999) após um experimento onde avaliaram o pH ruminal de vacas obtido por meio de fístula ruminal e através de rumenocentese, concluíram que o pH coletado através de cânula tente a ser maior que o aferido no conteúdo ruminal obtido diretamente por ruminocentese.

Desde o início da década de 2000, vem crescendo o interesse dos pesquisadores em desenvolver métodos para aferição contínua de pH ruminal, sendo isto possivelmente um reflexo do aperfeiçoamento das tecnologias de telemetria (BEAUCHEMIN et al., 2003; ENEMARK et al., 2003; DUFFIELD et al. 2004; BEAUCHEMIN e YANG, 2005).

Alzahal et al. (2007), em uma nota técnica, descrevem uma técnica de telemetria industrial adaptada a pesquisa veterinária, que possibilita de maneira segura, a aferição contínua da temperatura e pH ruminal por vários dias consecutivos e sem a necessidade de calibrações diárias. O sistema de aquisição de dados é composto por um eletrodo blindado ligado por cabo a um datalogger, que registra as variações de pH com sensibilidade de até 0,001 de potencial hidrogeniônico. Porém, como emprega utiliza um cabo para fazer a transferência dos dados do eletrodo para o datalogger, esse sistema necessita que os animais sejam canulados para ser empregado, com efeito, tem assim seu uso restrito à pesquisa.

## 2.4 ADITIVOS NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES

A intensificação do sistema de produção ovino tem sido uma forma de aumentar o produto final e conseqüentemente maximizar o lucro, utilizando para isso programas de incremento a produção como melhoramento genético, técnicas reprodutivas e manejo dietético (CALDEIRA, 2005).

O manejo dietético tem-se baseado no aumento do uso de rações concentradas, permitindo maiores ganhos de peso, no entanto esta melhoria tem sido um desafio para a microbiota ruminal, e a resposta a este desafio não tem sido

satisfatória para os produtores devido ao aumento dos riscos de distúrbios metabólicos devido ao acúmulo de produtos do metabolismo fermentativo promovendo desequilíbrios na microbiota ruminal (WEIMER, 1998). No entanto, a utilização de rações concentradas pelo seu benefício não podem ser descartadas da dieta animal, sendo necessário recorrer a ferramentas que possibilitem pequenos ajustes no processo fermentativo para que se possa explorar o máximo potencial produtivo.

A manipulação dos processos fermentativos tem sido objeto de muitos estudos na área da microbiologia ruminal, com intuito de encontrar mecanismos que pudessem ser útil no controle do processo fermentativo, possibilitando assim a utilização mais eficiente dos nutrientes (NAGARAJA, 2003).

Segundo Nagaraja et al. (1997), a manipulação dos processos fermentativos tem o intuito de melhorar os processos benéficos da fermentação ruminal e minimizar ou eliminar os efeitos negativos como o excesso de lactato e metano.

Neste contexto, os aditivos foram ferramentas desenvolvidas com o fito de aumentar a eficiência na utilização dos alimentos, incrementando dessa forma a produção animal e melhorando a qualidade dos produtos de origem animal (LOYOLE; PAULE, 2006). Os aditivos mais utilizados para ruminantes são os antibióticos ionóforos, não-ionóforos, probióticos entre eles as leveduras, prebióticos, minerais orgânicos e tamponantes.

Dentre estes, os antibióticos ionóforos e os probióticos vêm sendo utilizados de maneira preventiva contra a ALRA,

#### **2.4.1 Ionóforos**

Os ionóforos (grego, *ion* “o que vai”; *phoros*, “carregador”) são compostos que aumentam a permeabilidade das membranas lipídicas biológicas ou artificiais para íons específicos. Formam com cátions, complexos dinamicamente reversíveis que atuam no transporte de íons através dessas membranas. A maioria dos ionóforos são moléculas orgânicas relativamente pequenas que atuam como transportadores dentro de membranas ou se unem para formar canais de íons através das membranas permeáveis. As mudanças resultantes nos gradientes de íons transmembranas produzem efeitos profundos sobre a função e metabolismo

celular, o que confere as propriedades farmacológicas únicas dos ionóforos (PRESSMAN e FAHIM, 1982).

A atividade biológica dos ionóforos foi primeiramente reconhecida pelos seus efeitos no metabolismo das mitocôndrias. A valinomicina foi a primeira substância dessa classe a ter seus efeitos estudados, ainda na década de 1950.

A monensina sódica foi descoberta em 1967, tendo seu uso autorizado desde 1971 para ser utilizada no controle da coccidiose das aves (NOVILLA et al., 1992). Somente em meados da década de 70 os ionóforos foram aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para serem usados na alimentação de ruminantes nos EUA. Os mais utilizados são a monensina sódica, sendo o mais estudado e primeiro a ser liberado em 1976 (CORAH, 1991). Atualmente são conhecidos 120 compostos da classe dos ionóforos. Dentre esses, somente a monensina, a lasalocida, salinomomicina e laidlomomicina propionato são aprovados para o uso como aditivo em dietas de ruminantes. A monensina é a principal substância empregada e por isso a mais estudada.

A monensina é um típico ionóforo carboxílico, com isso tem seu efeito antibiótico empregado como aditivo alimentar. Seu uso na alimentação de ruminantes é feito com o objetivo de modular a população microbiana ruminal, aumentando o desempenho dos animais pela melhora da eficiência energética principalmente em função do aumento do ácido propiônico e da redução da relação acetato/propionato, diminuição do ácido láctico e redução nas perdas de ácido láctico que seriam potencialmente fermentados no rúmen.

Produzida da fermentação de cepas de bactérias *Streptomyces cinamonensis* a droga é de limitada atividade bacteriana usada extensivamente no controle da coccidiose de aves.

Apesar dos seus efeitos benéficos, os ionóforos podem ser tóxicos quando fornecidos em altas doses. Há diferentes sensibilidades entre as espécies animais e existem relatos de intoxicações por ionóforos em cavalos.

Embora os ruminantes absorvam aproximadamente 50% da monensina administrada pela via oral, após sua absorção, a molécula circula por todo o corpo não se acumulando preferencialmente em algum tecido. O composto sofre rápido metabolismo hepático. Seus metabólitos incluem moléculas de monensina desmetiladas, hidroxiladas, descarboxiladas e outras formas. Os metabólitos avaliados têm muito pouca atividade biológica. A monensina e seus metabólitos são



excretados principalmente na bile e aparecem nas fezes. Cerca de 1% é excretado na urina de mamíferos e frangos. Bovinos e ovinos excretam 40 a 50% da dose de monensina na forma original. Aparentemente a maior parte da monensina absorvida é metabolizada, a molécula original nas fezes representa em grande parte a monensina que não foi absorvida (HATCH, 1992).

Muitas pesquisas têm sido direcionadas para estratégias de eliminação de metano nos ruminantes. Globalmente 50 a 60% do metano é proveniente do setor da agricultura, especificamente da pecuária e a principal fonte são os ruminantes. É hipotetizado que a monensina diminua a produção de metano pela inibição da metanogênese, inibindo o crescimento de bactérias e protozoários que provêm o substrato para o metano .

A monensina tem a propriedade de afetar os níveis de metano no rúmen. Esses níveis são relacionados à população de protozoários, cujo numero é modulado pela monensina. Quando esta população torna-se adaptada a monensina os npiveis de metano retorna aos níveis pré-tratamento. (CZERKAWSKI,1986)

#### 2.4.1.1 Controle de doenças Provocadas por Protozoários

Os ionóforos têm demonstrado valor terapêutico contra vários protozoários parasitas, as espécies de coccídeos se destacam entre eles como as mais importantes economicamente para ovinos. A monensina atua destruindo o parasita no início dos estágios assexuados do ciclo de vida (esporozoíto, trofozoíto, esquizonte), podendo desta forma, ser utilizado na prevenção de casos clínicos. Por isso, devem ser incluídos na ração antes, ou pouco tempo depois da ingestão do oocisto infectante na dose de 15mg de monensina/ovino/dia (SYNGE, 1989). Assim espera-se que, com seu uso, ocorra a diminuição da liberação de oocistos por animais adultos e cordeiros, diminuindo a contaminação ambiental (TYLER et al., 1992).

Os ionóforos, usados profilaticamente para diminuir a coccidiose neonatal, além de diminuir a liberação de oocistos e minorar a contaminação de neonatos. Nas gestações avançadas, fase de maior susceptibilidade para a ovelha, pode ser utilizada para prevenir a coccidiose na forma entérica (TYLER et al., 1992; SYNGE, 1989).

Estes antibióticos são também indicados no controle de outras doenças provocadas por protozoários. São efetivos em prevenir as formas clínicas e em reduzir a severidade dos sinais clínicos provocados pelo *Toxoplasma gondii* em ovinos e caprinos. A adição de 16 mg/kg de monensina/dia na dieta de ovelhas prenhes e experimentalmente infectadas reduziu o número de abortos de 56% para 16% (TYLER et al., 1992).

#### 2.4.1.2 Implicações para o a saúde humana

Em 2006 entrou em vigor, a medida que proíbe o uso dos ionóforos monensina sódica e salinomocina, como promotores de crescimento nos países membros da União Européia. Essa medida faz parte do programa europeu de segurança alimentar e objetiva principalmente descartar riscos, mesmo que remotos, de resistência cruzada, ou seja, uma possível seleção em animais, de bactérias resistentes a antibióticos e sua transmissão para seres humanos.

A monensina não é usada na medicina humana e, portanto não foi classificada como um antibiótico importante para humanos pela OMS experiente organização na categorização de antimicrobianos críticos no desenvolvimento de estratégias de risco para conter resistência antimicrobiana devido ao uso não humano.

#### 2.4.1.3 Mecanismo de ação

Os ionóforos formam complexos lipossolúveis que facilitam o transporte iônico através de membranas biológicas e podem causar graves distúrbios celulares funcionais. Estudos com este grupo de antibióticos relatam que são capazes de proteger e deslocar as cargas de íons formando complexos com cátions facilitando seus movimentos através da membrana celular, uma vez que esta é composta superfície de lipídeos e uma grande quantidade de energia é necessária para transportá-lo, ou seja, funcionam como veículo de transporte através da membrana sendo seletivos para os íons específicos (BERGEN; BATES, 1984).

O ionóforo ao ligar-se ao cátion transporta-o através da membrana celular para dentro da bactéria e esta por meio do mecanismo de bomba iônica na tentativa de manter o equilíbrio a célula utiliza sua energia de forma excessiva até suprimir suas reservas como consequência disto a bomba iônica não opera eficientemente provocando um desequilíbrio devido a uma maior concentração iônica dentro da célula que fora ocorre um aumento da pressão osmótica a água penetra em excesso e com isso a célula incha rompendo-se

As bactérias Gram negativas são mais resistentes aos ionóforos que as Gram positivas isso ocorre em virtude do seu envoltório celular ser constituído por uma parede celular além de uma membrana externa de proteção formada por proteínas lipoproteínas e lipossacarídeos. Essa membrana possui canais de proteínas através da membrana com tamanho limite de aproximadamente 600 Da denominada porina. A maioria dos ionóforos possui tamanho maior que 660 Da e consequentemente não passam através das porinas o que tornam as células impermeáveis aos ionóforos. Por outro lado as bactérias Gram positivas possuem uma camada espessa de peptideoglicanas que por ser porosa não impede a ação da monensina.

O mecanismo de ação dos ionóforos sobre as bactérias está relacionado com mecanismos de bomba iônica que regula o balanço químico entre o meio interno e o externo da célula. Em condições normais as bactérias mantêm as concentrações de  $K^+$  no interior da célula muito mais alta do que no meio externo expelindo prótons e na para equilibrar as concentrações Esse mecanismo é necessário não só para a síntese de proteína como também para tamponar o pH intracelular por meio do mecanismo de troca  $K^+/H^+$ . Ao se ligar as bactérias Gram positivas os ionóforos promovem a entrada íons  $H^+$  e saída de  $K^+$  o que leva a um acúmulo de  $H^+$  no citoplasma da célula bacteriana causando redução ph a valores inferiores aos encontrados no meio extracelular.

Essa alteração do Ph interno causado pela transferência de grandes quantidades de  $H^+$  para dentro da célula microbiana dissipa totalmente o gradiente existente entre a membrana e o meio causando uma depressão na força motriz que era responsável pela entrada de  $H^+$  no citoplasma microbiana o com concomitante geração de ATP. Além disso o acúmulo de  $H^+$  intracelular exige um gasto adicional de ATP.

## 2.4.2 Probióticos

O emprego do termo “Probiótico” é relativamente recente, sendo que nos últimos 40 anos as definições vêm sendo refinadas para melhor abranger a categoria de produtos para qual se usa o termo (HAMILTON-MILLER et al., 2003). Etimologicamente, o termo é composto da preposição latina *pro* (para) e do sufixo grego *bióticos* (βιωτικός), este último derivado de *bios* (βίος) "vida". O significado atual de probiótico que é também aceito pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) vem da definição dada por (FULLER, 1989) na sua revisão, que afirma probióticos como sendo suplementos alimentares contendo microorganismos viáveis que afetam benéficamente o hospedeiro pela melhora do balanço da microbiota gastrointestinal.

Os probióticos vêm sendo utilizados na alimentação humana desde a antiguidade. Há registros que o leite fermentado vem servindo de alimento desde 2000 a.C., e registros da cultura Indo-Iraniana chamam a mistura de iogurte e mel de “alimento dos deuses”.

Os probióticos de origem láctea mantiveram-se praticamente desconhecidos em grande parte da Europa até que Ilya Metchnikov foi agraciado com o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1908 por uma pesquisa que atribuiu a longevidade de algumas etnias em países da Europa Central e Oriental ao consumo de probióticos (FARNWORTH, 2008). Durante a segunda metade do século XX o seu uso medicinal foi amplamente difundido com o objetivo de restabelecer a flora intestinal normal de pacientes após o emprego de antibioticoterapia. (MCNULTY, et al., 2011) constataram que os microorganismos probióticos são capazes de alterar as propriedades metabólicas de uma comunidade microbiana intestinal. Em um experimento em que se realizou o seqüenciamento de RNA revelou-se que bactérias probióticas modificaram a expressão gênica da microbiota intestinal de camundongos pela codificação de enzimas metabólicas chaves, como as envolvidas no metabolismo de açúcares.

A Food and Drugs Administration (FDA) americana substituiu a denominação probiótico pelo termo DFM (direct-fed microbials) que é definido como “fonte natural de microorganismos vivos (viáveis)”. Dentre essa classificação estão incluídas as culturas microbianas viáveis, extratos de culturas, preparações enzimáticas ou suas várias combinações (YOON; 1995). As leveduras, como a *Sacharomyces cerevisiae*

e as bactérias probióticas, como *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum*, entre outras fazem parte dessa classificação.

As leveduras são microorganismos eucariontes unicelulares eucariotas do reino Fungi possuidores de uma parede celular rígida, formada de quitina. Desprovidos de clorofila, são heterótrofos, anaeróbios facultativos que apresentam alta taxa de multiplicação quando em presença de oxigênio. São naturalmente encontradas no ambiente ruminal, porém como apresentam a condição ideal de crescimento o pH de 4,5, tem sua multiplicação inibida tanto pela temperatura ruminal, que fica em torno de 39 °C quanto pelo pH, que oscila entre 5,6 e 6,5 (LUND, 1974; NAGARAJA e LECHEMBERG, 2007). Esta característica sugere que essas populações encontradas no rúmen possam ser originárias da ingestão, sendo sua permanência passageira, porém constantemente reintroduzidas pela alimentação (LUND, 1974).

Entre as espécies de leveduras empregadas como probiótico, as do gênero *Saccharomyces* possuem amplo emprego no campo industrial. Os microorganismos do gênero *Saccharomyces* foram provavelmente os primeiros agentes empregados pelo homem com o objetivo de modificar as propriedades dos alimentos. Achados arqueológicos apontam que os chineses já produziam bebidas fermentadas desde 7.000 a.C, assim como no Irã e Egito por volta de 6000 a.C. O pão, provavelmente foi o primeiro alimento fermentado produzido pelo homem. O papel das leveduras na história humana é tão amplo que está presente desde a Revolução do Neolítico (TAYLOR, 1977; ARNOLD, 2005; LEGRAS et al., 2007).

As leveduras utilizadas na alimentação animal são obtidas a partir do processo de recuperação dos produtos da fermentação do melaço nas indústrias de álcool e cervejarias, nesse processo as leveduras resultantes do processo fermentativo alcoólico são centrifugadas e passam por um processo de secagem e moagem, sendo disponibilizada posteriormente para a alimentação animal (BERTO, 1965).

O mecanismo de ação das leveduras no ambiente ruminal tem sido objeto de muitos estudos, no entanto parece que o mecanismo de ação não é apenas um específico, mas um conjunto. Esse aditivo tem a habilidade de estimular populações específicas de bactérias ruminais, promovendo aumento no número de bactérias celulolíticas, estabilizando o pH ruminal, aumentando a digestibilidade de fibras e as condições de anaerobiose (ARCURI et al., 2006).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* não existe naturalmente no ambiente ruminal (LUND, 1974), já que as condições desse ambiente não são favoráveis ao seu crescimento devido a composição química do fluido ruminal, a temperatura e ao pH, sendo este próximo de 4,5 o ideal para o seu desenvolvimento (ARAMBEL; TUNG, 1987). As leveduras são capazes de secretarem compostos químicos como nucleotídeos, aminoácidos e enzimas, que servem de fatores de crescimento para as bactérias do rúmen, além de contribuírem para a nutrição animal (NICODEMO, 2001). No entanto, estudos como o de Harrison et al (2008) com bovinos e Newbold et al (1990) com ovinos demonstraram que o crescimento da levedura no rúmen ocorre apenas poucas horas após a administração, sendo necessário a administração contínua desse aditivo para que ele desempenhe satisfatoriamente suas funções.

O principal efeito benéfico ao uso de levedura tem sido a manutenção da estabilidade do pH ruminal, favorecendo o crescimento das bactérias totais do rúmen e especialmente as celulolíticas. No entanto, não está muito claro como isso ocorre, existindo duas hipóteses mais aceitas. A primeira relaciona o crescimento das bactérias celulolíticas com a capacidade da levedura em consumir o oxigênio do ambiente ruminal. Apesar de o rúmen ser um ambiente anaeróbico, há entrada de oxigênio por meio da ruminação e pela ingestão de água e alimentos, o que prejudica a adesão das bactérias celulolíticas as fibras da dieta (ROGER et al., 1990), nesse contexto o uso da levedura é benéfico porque esta consome o oxigênio ruminal favorecendo a anaerobiose e conseqüentemente melhorando a ação das bactérias celulolíticas (ROSE, 1987).

Wiedmer et al (1987) em experimento utilizando vacas fistuladas, observaram aumento de 40% no número de bactérias celulolíticas no rúmen, após administração de levedura através de fístula ruminal. No entanto, Newbold et al (1995) comparando cinco diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* na suplementação de ovelhas e em simulador de digestão, observaram diferença no número de bactérias celulolíticas, sendo que duas cepas estimularam o crescimento bacteriano enquanto as outras três não, sugerindo que diferentes cepas podem diferir em seu efeito sobre a população de bactérias celulolíticas.

A segunda hipótese é a de que o uso da levedura diminui os níveis de lactato ruminal, não pelo consumo deste, já que a *Saccharomyces cerevisiae* não utiliza o lactato como seu substrato (PANCHAL et al., 1984), mas fornecendo substratos

como ácido málico e dicarboxílicos para bactérias fermentadoras de lactato ou competindo com as bactérias fermentadoras que geram ácido láctico.

Martin (1991) e Callaway e Martin (1997) descreveram a relação simbiótica entre a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e as bactérias fermentadoras *Selenomonas ruminantium* e *Megasphaera elsdenii* respectivamente, sugerindo que a levedura forneceria vitaminas do complexo B e aminoácidos para o crescimento dessas bactérias as quais passam a utilizar o lactato ruminal no seu metabolismo, potencializando dessa forma a utilização do lactato por essas bactérias e diminuindo à concentração do mesmo no rúmen.

A levedura pode utilizar como substrato para o seu crescimento oligossacarídeos como a maltose e maltriose do suco ruminal, sendo estes convertidos posteriormente em glicose (PANCHAL et al., 1984). A competição da levedura por esses oligossacarídeos com as bactérias fermentadoras reduz à concentração de açúcares do rúmen, diminuindo conseqüentemente a produção de lactato pelas bactérias fermentadoras, o qual aumenta quando açúcares e produtos facilmente fermentáveis são digeridos no rúmen (HUNGATE, 1966).

As leveduras além de favorecerem o aumento no número de bactérias celulolíticas também têm ação benéfica sobre a população de bactérias proteolíticas (YOON; STERN, 1996).

A utilização de altos valores de concentrado nas dietas de confinamento promove mudanças na microbiota ruminal, diminuindo o número de bactérias celulolíticas prejudicando a digestão de carboidratos estruturais. A diminuição no número de bactérias está relacionado à queda do pH pelo consumo de carboidratos facilmente fermentáveis dessas dietas (WIEDMEIER et al., 1987). Nesses casos a adição de levedura na alimentação animal seria um benefício em potencial devido a sua capacidade de elevação do pH ruminal e por conseguinte a maior atividade das bactérias celulolíticas.

No entanto, a utilização de leveduras na dieta de ruminantes tem mostrado efeitos divergentes com relação ao pH ruminal, pois alguns estudos tem mostrado aumento no pH (ADAMS et al., 1981; WIEDMEIER et al., 1987; DAWSON et al., 1990; FIEMS et al., 1993), ou redução da flutuação diária do pH de animais alimentados com concentrado (DOREAU; JOUANY, 1998; CHEVAYX; FABRE, 2007), ou a não alteração dessa variável (ARAMBEL et al., 1990; QUIGLEY et al., 1992; ZANETTI et al., 2009).

Esta divergência entre a resposta dos animais suplementados pode está relacionada com a cultura de levedura utilizada, o tipo de forrageira, a proporção volumoso: concentrado (WILLIAMS et al., 1991; ADAMS et al., 1995) e o período e nível de suplementação dos animais (WALLACE, 1996).

A fermentação ruminal também tem sido alterada pela utilização de levedura, observando-se aumento na concentração de ácidos de cadeia curta, na digestão de matéria seca, digestão de proteína, produção de ácido propiônico, além do aumento de proteína microbiana e redução na concentração de amônia (ADAMS et al., 1981; ERASMUS et al., 1982; MILLER-WEBSTER, 2002).

Estudos evidenciaram redução nos níveis de amônia quando se utilizou levedura na suplementação animal, sugerindo aumento da captação desse elemento pela microbiota elevando a síntese de aminoácidos microbianos, disponibilizando maior aporte de nitrogênio a ser aproveitado pelo duodeno e, com efeito, pelo animal (DAWSON et al., 1981). O aumento no número de bactérias totais viáveis e celulolíticas com a utilização de levedura foi comprovado tanto *in vitro* como *in vivo*, sendo esse um efeito consistente desse aditivo, favorecendo maior digestibilidade de fibra e produção de proteína microbiana (NEWBOLD, 1995; LILA et al., 2004).

A suplementação de levedura tem promovido aumento no consumo de alimento, e não especificamente aumento na eficiência alimentar, podendo está ligado ao aumento da palatabilidade, taxa de digestão da fibra e taxa de passagem (WALLACE; NEWBOLD, 1996). Williams et al (1987) sugeriu que esse efeito seja devido a manutenção ou aumento do pH pelo uso da levedura, melhorando o ambiente ruminal e por conseguinte estimulando o apetite (WILLIAMS et al. 1987).

A utilização de levedura tem mostrado *in vitro* efeito sobre a produção de metano, reduzindo-o. Tal efeito deve está ligado ao aumento da síntese de proprionato e acetato, pela utilização de metabólitos hidrogenados, reduzindo a síntese de metano (NISBET; MARTIN, 1991; MUTSVANGWA et al., 1992).

O efeito da levedura no desempenho produtivo de bovinos também tem sido avaliado, mostrando efeitos variáveis, ocorrendo em alguns estudos ganho de peso e aumento da eficiência alimentar (PARRA; DE CONSTANZO, 1995; HUDYMA; GRAY, 1993) ou nenhum efeito significativo nesses parâmetros (MIR; MIR, 1994; HASSAN, 1996).

Conforme Wallace (1994), o efeito da suplementação com levedura é dependente da dose e da dieta fornecida, pois o mecanismo central de ação



benéfica da levedura é o crescimento microbiano, sendo importante selecionar cepas capazes de realizarem esta estimulação.

Além de todos os efeitos benéficos do uso da levedura sobre o ambiente ruminal e sobre a produção animal, tem sido relatado efeitos positivos desta sobre o sistema imunológico, já que componentes da parede celular das leveduras têm sido responsabilizados pela ativação local e sistêmica do sistema imune em animais, devido à presença de mananoglicosacarídeos na superfície externa da parede celular.

Os mananoglicosacarídeos (MOS) externos responsáveis por essa ação estimulação são as manoses. Patógenos gastrointestinais principalmente as enterobactérias possuem na membrana celular lectinas, responsáveis pela aderência dessas ao glicocálix das células intestinais. As lectinas possuem preferência com relação ao tipo de açúcar em que se aderem, sendo a manose o específico das bactérias enteropatogênicas. Dessa forma, a predileção das bactérias pela manose possibilita a aderência dessas a levedura diminuindo a possibilidade de ligação com as células gastrointestinais do animal (NEWMAN, 1994).

A formação de complexos entre a levedura e a bactéria atuaria aumentando a resposta imune, através do aumento da fagocitose na superfície intestinal, devido a presença de receptores de manose nos macrófagos (MORAN, 2004).

Chaucheyras-Durand et al (1998) estimaram que 17% a 34% das leveduras suplementadas permanecem vivas durante o transito gastrointestinal de ruminantes, não sendo degradadas completamente no ambiente ruminal, podendo exercer algum efeito nas porções mais distais do trato digestivo. Martínez et al (2003) demonstraram que a levedura na forma integral seria mais benéfica do que seus constituintes de forma isolada.

### 3 OBJETIVOS

A presente dissertação teve por objetivo:

Avaliar comparativamente o efeito de um probiótico a base da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e de um ionóforo, a monensina sódica, sobre variáveis clínicas, ruminais, bioquímicas e sistêmicas de ovinos submetidos a indução experimental de acidose láctica ruminal aguda;

Verificar a eficácia metafilática dos dois aditivos estudados na prevenção e recuperação de ovinos submetidos a quadros de acidose láctica ruminal aguda.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS E ALIMENTAÇÃO

Foram utilizados trinta ovinos mestiços da raça Santa Inês, providos de cânula ruminal, com cerca de 45 kg de peso corporal e 24 meses de idade. Para facilitar o manejo e identificação dos animais foram colocados cabrestos individuais apropriados e brincos numerados

Sessenta dias antes do início do período experimental, todos os animais receberam aplicação de endectocida a base de moxidectina na dose recomendada pelo fabricante, aplicada por via subcutânea, além de aplicação de dose de vacina contra clostridioses, seguida de reforço 30 dias após a primeira imunização.

Os animais foram submetidos à cirurgia de implantação de cânula ruminal de silicone. Após os procedimentos cirúrgicos, os ovinos passaram por período de adaptação as instalações e ao manejo alimentar.

Durante todo período experimental os animais foram alimentados com dieta basal calculada em 2,7% do peso vivo, composta de 75% da matéria seca de feno de capim de coast-cross e de 25% de ração concentrada comercial contendo 14% de proteína bruta, a qual era fornecida fracionada duas vezes ao dia. Os ovinos tiveram livre acesso à água. A constituição bromatológica da dieta encontra-se na Quadro 1.

Quadro 1 – Composição bromatológica do feno de coast-cross e do concentrado comercial oferecida aos ruminantes durante todo o período experimental – São Paulo – 2011

Composição	Feno <sup>1</sup>	Ração Peletizada <sup>2</sup>
<b>% MS( matéria seca)</b>	89,2	88
<b>% FB (fibra bruta)</b>	31,2	10
<b>% PB (proteína bruta)</b>	8,5	18
<b>% EE (extrato etéreo)</b>	1,8	2,5
<b>% MM (matéria mineral)</b>	6,4	10
<b>% MS( matéria seca)</b>	89,2	88

<sup>1</sup> Análises realizadas no Laboratório de Doenças Nutricionais e Metabólicas da FMVZ - USP.

<sup>2</sup> Informações fornecidas pelo fabricante.

## 4.2 INSTALAÇÕES

Durante período de adaptação à dieta com aditivo, os ovinos foram mantidos em baias coletivas e posteriormente, quinze dias antes do início das induções, eram transferidos para gaiolas metabólicas individuais nas dependências do Centro de Pesquisa em Doenças Nutricionais e Metabólicas de Ruminantes do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ da Universidade de São Paulo - USP, Campus de São Paulo.

Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas metálicas individuais, o que permitiu o controle sobre o alimento ingerido. As gaiolas foram dispostas lado a lado a fim de diminuir o estresse dos animais.

Os ovinos foram pesados após a aquisição, ao final do período de adaptação e no início do experimento, no dia da indução à acidose láctica ruminal aguda, sempre antes do oferecimento de ração pela manhã, utilizando balança Coimma®, modelo ICS-300, com capacidade de 300 kg e sensibilidade de 100 g.

## 4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os trinta animais foram submetidos a um delineamento inteiramente casualizado em que, após o período de adaptação, os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos iguais com 10 animais cada, assim constituídos:

- CONTROLE
- PROBIÓTICO
- MONENSINA

O grupo controle recebeu apenas a dieta basal citada no item 4.1. O grupo Probiótico, teve a dieta basal suplementada com 5 g de Yea-Sacc®1026, provendo inoculação total de  $4 \times 10^9$  ufc/animal/dia de *Saccharomyces cerevisiae* cepa 1026 (Alltech SA, EUA), O grupo monesina recebeu na dieta basal, a dose de 33 ppm de Monensina Sódica (Rumensin®), segundo recomendação feita por (AFONSO et al., 2002)

#### 4.4 INDUÇÃO DA ACIDOSE LÁCTICA RUMINAL AGUDA

Após 30 dias do início do fornecimento do probiótico e do ionóforo, foi realizada indução experimental de acidose láctica ruminal, em todos os animais, por meio da administração de 15g de sacarose por quilo de peso vivo do animal, diretamente no rumem, de acordo com protocolo descrito por (KEZAR e CHURCH, 1979).

#### 4.5 EXAME CLÍNICO DOS ANIMAIS

Foi realizado exame físico, colheitas de sangue e colheitas de conteúdo ruminal no decorrer do estudo nos seguintes tempos: Basal (T0), imediatamente antes da indução do quadro de ALRA; tempo 6 horas (T6h); tempo 12 horas (T12h), 12 horas após início da indução de ALRA; tempo 18 horas (T18h); tempo 24 horas (T24h); tempo 36 horas (T36h); tempo 48 horas (T48h),. No exame físico dos animais avaliou-se a frequência cardíaca, frequência respiratória, movimentos ruminais, estado de hidratação e qualquer outra alteração clínica que por ventura ocorresse, segundo recomendações descritas por Rosemberger (1983).

#### 4.6 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE

Nos mesmos momentos em que foram realizados o exame físico, foram coletadas amostras de sangue total por meio de punctura da artéria auricular externa, anaerobicamente com seringa plástica descartável heparinizada de 3 mL, conforme descrito por Sucupira e Ortolani, (2003) e seguindo os cuidados de conservação da amostra preconizados por Lisbôa et al., (2001) para a determinação do pH, bicarbonato e excesso de ácidos e bases (EAB).

Para coleta de sangue venoso foram utilizados tubos à vácuo (vacutainer<sup>®</sup>) com capacidade de 8,5 mL sem anti-coagulante, para a obtenção do soro, e tubos de 5 mL contendo anti-coagulante fluoreto de sódio e ácido dietilenodiamino tetra-acético (EDTA).

Após cada coleta, os tubos com as amostras de sangue que continham anticoagulantes eram imediatamente homogeneizadas e posteriormente processados nas dependências do laboratório no Centro de Pesquisa em Doenças Nutricionais e Metabólicas de Ruminantes da FMVZ – USP. Ao passo que o tubo sem anticoagulante era mantido à temperatura ambiente até que proviesse seu processamento.

No laboratório, os tubos com sangue e sem anticoagulante, para obtenção de soro, eram centrifugados a 1.400 x g por dez minutos. Os tubos com sangue e fluoreto, destinados a obtenção de plasma, foram submetidos à centrifugação de 1.400 x g por dez minutos. As amostras de sangue nos tubos com EDTA foram utilizadas para determinação do volume globular.

As amostras de soro e plasma foram acondicionadas, em duas alíquotas, em microtubos plásticos eppendorf® e congelados a 20°C negativos, sendo descongeladas uma única vez para cada análise realizada. As amostras de soro foram utilizadas para determinação da osmolaridade sérica, enquanto que as amostras de plasma foram utilizadas para determinação da concentração de ácido láctico da forma levógira (L).

As amostras de sangue colhidas com seringa descartável foram utilizadas para análises hemogasométricas. Logo após a colheita tais amostras foram acondicionadas em isopor® contendo gelo e água e tomou-se o cuidado, no momento da colheita, de não permitir a entrada de bolhas de ar no interior da seringa. Imediatamente após a punção do sangue fechou-se a ponta da agulha com uma tampa de borracha, para impedir a entrada ou saída de gases, segundo recomendações de Sucupira e Ortolani (2003).

#### **4.6.1 Avaliações hemogasométricas**

As seringas contendo 3 mL de sangue arterial e heparina sódica foram retiradas do isopor® com gelo e água, secas com papel absorvente e homogeneizadas antes da colocação da amostra em hemogasômetro marca ROCHE®, modelo AVL 330. Cada determinação foi corrigida segundo a temperatura retal do animal correspondente. Foram obtidos os valores do pH sanguíneo, pressão

parcial de gás carbônico (pCO<sub>2</sub>), concentração de bicarbonato (HCO<sub>3</sub>) e excesso ácido-básico (EAB).

#### **4.6.2 Determinação do volume globular (VG)**

As amostras de sangue total, provenientes dos tubos com EDTA, foram colocadas em tubos capilares de 75 mm (microhematócrito) e centrifugados por cinco minutos a 13000 x *g*.

#### **4.6.3 Cálculo do déficit de volume plasmático (DVP)**

Utilizando os resultados do volume globular, foi calculado o déficit de volume plasmático de cada momento experimental em relação ao tempo zero, segundo a seguinte fórmula:

$$\text{DVP: } \left\{ \left[ \frac{\text{VG1} (1-\text{VG2})}{\text{VG2}} * (1-\text{VG1}) \right] - 1 \right\} * 100$$

Onde VG1 = VG inicial no tempo 0 expresso com uma casa após a vírgula

VG2= VG em outros tempos expressos com uma casa após a vírgula.

#### **4.6.4 Determinação da concentração plasmática de ácido láctico-L.**

A determinação do ácido láctico-L no plasma foi realizada no analisador químico automático da marca Randox, modelo RX Daytona. Empregou-se o kit comercial da Kovalent do Brasil Ltda. para método de UV enzimático utilizando Lactato Desidrogenase (LDH).

#### **4.6.5 Determinação da osmolaridade sérica**

A determinação da osmolaridade sérica foi obtida em osmômetro por ponto de congelamento, marca Advanced™ Instruments, modelo The Advanced Micro-Osmometer 3300.

#### **4.7 COLETA DE AMOSTRAS DE CONTEÚDO RUMINAL**

As amostras de conteúdo ruminal foram coletadas nos mesmos momentos supracitados de exame clínico e coleta de sangue, e foram obtidas com a utilização mangueira plástica com diâmetro de  $\frac{1}{4}$  de polegada, inserida em sonda metálica flexível com diâmetro de  $\frac{1}{2}$  polegada, as quais foram introduzidas no rumem através da cânula ruminal. Uma bomba de vácuo e pressão marca Quimis, modelo Q355B, foi utilizada para promover a sucção do conteúdo ruminal, que foi aspirado em frasco de vidro com capacidade de um litro. Foram colhidos cerca de 150 mL de conteúdo ruminal, diretamente do saco ventral posterior do órgão.

##### **4.7.1 Mensuração do pH e da temperatura do conteúdo ruminal**

Foram a obtidas análises de pH do conteúdo ruminal por duas formas distintas: por coleta e posterior análise em pHmetro de bancada e por sistema de medição contínua com eletrodo submersível, descritos abaixo.

###### **4.7.1.1 Aferição tradicional**

Nos momentos de coleta supradeterminados retirou-se cerca de 30 mL de fluido ruminal do frasco de vidro e determinou-se o seu pH utilizando medidor de pH microprocessado de bancada da marca Gehaka, modelo PG 1800, com sensibilidade de 0,01 grau, acoplado a eletrodo íon específico, marca Gehaka modelo GEH – 09RBCN, previamente calibrado segundo instruções do fabricante.



#### 4.7.1.2 Sistema de medição contínua de pH por meio de eletrodo submersível

Para uma avaliação mais detalhada do comportamento do rumem no decorrer da indução de acidose nos diferentes grupos experimentais foi realizada monitoração contínua do pH e temperatura do conteúdo ruminal. Para isso foi empregado um aparato de telemetria industrial adaptado conforme descrito por (ALZAHAL et al., 2007) composto por um eletrodo submersível modelo PHE-6510 acoplado a um datalogger modelo OM-CP-PH10, ambos da marca Omega Engineering, Inc. O eletrodo foi submergido no conteúdo ruminal, através da cânula, disposto no saco ventral do rumem.

Para a calibração e posterior recuperação e uso dos dados utilizou-se o cabo de transferência modelo OM-CP-IFC110 e o software Omega Versão 2.04.6 para sistema operacional Windows XP SP3/Vista/ 7 (32-64-bit). Para calibração dos eletrodos e datalogger utilizou-se o software supracitado e soluções tampão de pH da marca Merck de potencial hidrogeniônico de 7,00 e 4,00 e o procedimento de calibração realizado através do software, conforme indicação do fabricante.

O eletrodo foi colocado em cada animal a partir do momento zero T0 e permaneceu no interior do rumem do animal por um período de 48 horas consecutivas. O processo de registro da temperatura e do pH ruminal foi configurado para ser realizado a cada 5 minutos, com sensibilidade de 0,01 °C e 0,01 de pH. Deste modo, foi possível traçar toda a curva de variação do pH do conteúdo ruminal, desde o momento inicial e durante todo o episódio de acidose induzido com sacarose, permitindo uma melhor comparação entre os grupos.

#### **4.7.2 Determinação da concentração de ácido láctico-L no conteúdo ruminal**

A determinação do ácido láctico-L no conteúdo ruminal foi realizada no analisador químico automático da marca Randox, modelo RX Daytona. Empregou-se o kit comercial da Kovalent do Brasil Ltda. para método de UV enzimático utilizando Lactato Desidrogenase (LDH).

#### **4.7.3 Determinação da osmolaridade do conteúdo ruminal**

A determinação da osmolaridade do conteúdo ruminal foi realizada em osmômetro por ponto de congelamento, marca Advanced™ Instruments, modelo The Advanced Micro-Osmometer 3300.

#### 4.8 PROTOCOLO DE TRATAMENTO

Todos os animais que apresentaram quadro clínico de acidose láctica ruminal aguda, foram realizados os seguintes procedimentos a fim de evitar a morte pelos seguintes tratamentos: infusão de solução isotônica de bicarbonato de sódio (1,3%) para a correção da acidose sistêmica segundo fórmula clássica de reposição de tampões (RADOSTITS et al., 2007) e de 20 mL/ kg P.V. de solução salina isotônica. Na 24<sup>a</sup> hora após a indução os animais dos grupos monensina e probiótico receberam 30 mg/Kg de matéria seca e 5 g, por via intraruminal, respectivamente. Nesse mesmo tempo o grupo controle foi tratado com 5 g de cloreto de sódio via intraruminal.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para se conhecer a distribuição dos dados obtidos nas diversas variáveis estudadas os mesmos serão submetidos ao teste de Kolmogorov e Smirnov. Como os dados *in totum* apresentaram distribuição normal os mesmos foram submetidos inicialmente à análise de variância (ANOVA) e no caso de significância foram comparados pelo teste de Tukey. Adotou-se um grau de significância de 5 % e considerou-se como tendência no caso da significância calculada permanecer entre 5 e 10 % (SAMPAIO, 2002).

Para estudar a influência das relações entre duas variáveis foram calculadas os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e de correlação ( $r$ ).

## 5 RESULTADOS

Os resultados obtidos durante o experimento serão expressos por meio das médias, desvios padrão dos valores obtidos para as diferentes variáveis estudadas. Desta forma, foram alocados em Tabelas e gráficos com a finalidade de facilitar a leitura deste capítulo.

### 5.1 VARIÁVEIS RUMINAIS

#### 5.1.1 pH do conteúdo ruminal

Os resultados médios e desvios padrão das aferições pontuais referentes ao pH do conteúdo ruminal no decorrer da indução experimental estão expostos na Tabela 1 e no Gráfico 1.

TABELA 1 – Valores médios e desvios padrão do pH do conteúdo ruminal dos ovinos aferidos por pHmetro de bancada no decorrer do experimento – São Paulo – 2011

Momentos	Controle		Monensina		Probiótico		P
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
T0	6,60 <sup>a</sup>	0,12	6,79 <sup>a</sup>	0,23	6,72 <sup>a</sup>	0,17	0,810
T6	4,81 <sup>c</sup>	0,29	4,80 <sup>c</sup>	0,13	4,87 <sup>b</sup>	0,18	0,879
T12	4,45 <sup>Bcd</sup>	0,05	5,21 <sup>Ac</sup>	0,53	4,80 <sup>ABb</sup>	0,12	0,004
T18	4,50 <sup>cd</sup>	0,3	4,96 <sup>c</sup>	0,55	4,50 <sup>b</sup>	0,35	0,178
T24	4,25 <sup>d</sup>	0,28	4,79 <sup>c</sup>	0,37	4,85 <sup>b</sup>	0,77	0,092
T36	4,76 <sup>Bc</sup>	0,57	5,47 <sup>ABbc</sup>	0,39	6,36 <sup>Aa</sup>	0,59	0,001
T48	5,70 <sup>Bb</sup>	0,75	6,41 <sup>ABab</sup>	0,61	7,08 <sup>Aa</sup>	0,35	0,012
P	0,001		0,001		0,001		

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos. Letras minúsculas nas colunas significam diferença entre os tempos de coleta.

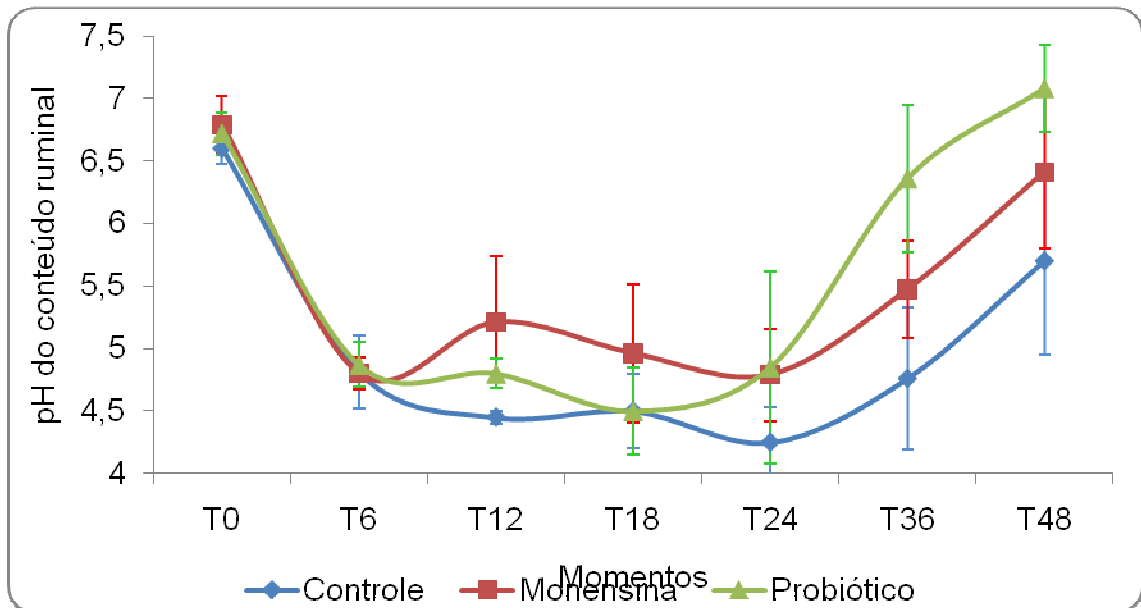


Gráfico 1 – Valores médios e desvios padrão do pH do conteúdo ruminal dos ovinos aferidos por pHmetro de bancada no decorrer do experimento – São Paulo – 2011

Não houve diferenças significativas entre os três grupos quanto ao pH do conteúdo ruminal no tempo inicial ( $p > 0,81$ ). Entretanto com o avançar do quadro evidenciaram-se diferenças estatísticas entre os grupos.

No tempo 12 horas o grupo Monensina apresentou pH médio de 5,2 e foi maior ( $p < 0,005$ ) que o grupo Controle, com valor médio de pH 4,45, mas não diferiu do grupo Probiótico (pH 4,8). Porém, esta diferença deixou de existir no tempo T18h e ocorreu uma tendência no T24h dos grupos Monensina e Probiótico apresentarem valores de pH do conteúdo ruminal superiores ao grupo Controle ( $p = 0,092$ ).

Já nos tempos subseqüentes, T36h e T48h, o grupo Probiótico apresentou pH significativamente mais alto que o grupo Controle ( $p < 0,001$ ). Na avaliação intra-grupo os menores valores de pH foram encontrados nos tempos 18h e 24h, sendo a menor média observada no tempo T24h.

O gráfico 2 ilustra o comportamento do pH do conteúdo ruminal aferido por sistema de medição contínua com eletrodo submerso no saco ventral do rumem ao longo do ensaio nos três grupos experimentais.

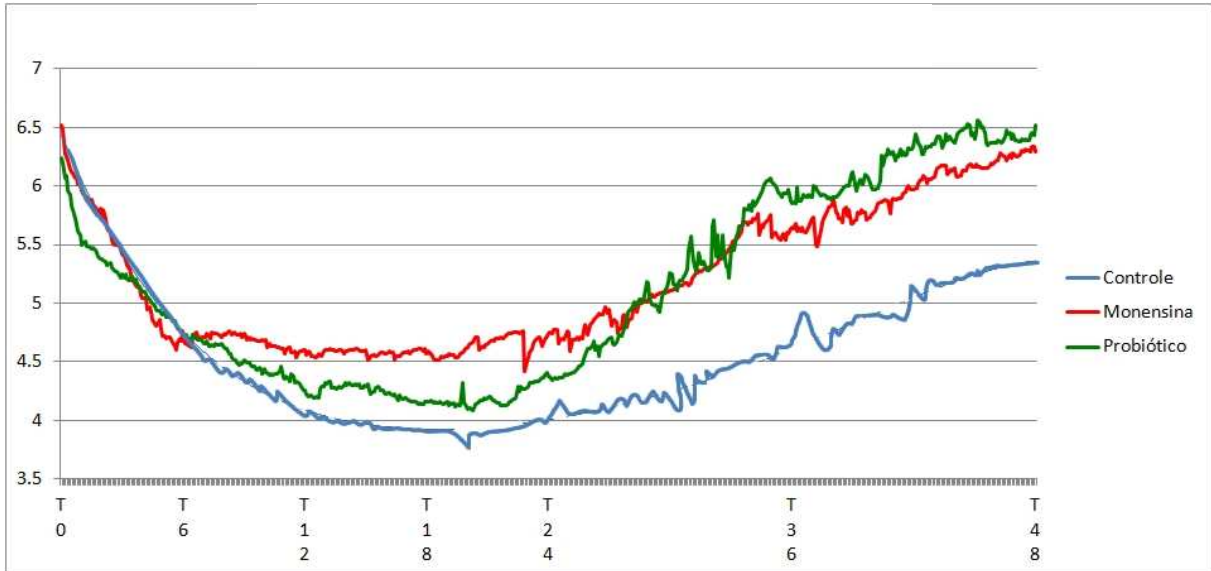


Gráfico 2 – pH do conteúdo ruminal aferido continuamente ao longo do ensaio nos três grupos experimentais – São Paulo – 2011

### 5.1.2 Comparação do pH do conteúdo ruminal mensurado por pHmetro de bancada e por sistema de aferição contínua

A Tabela 2 e o Gráfico 3 apresentam a comparação entre os resultados do pH do conteúdo ruminal entre os dois métodos de aferição utilizados, o tradicional com a coletas de conteúdo por meio da fístula ruminal e o sistema de telemetria contínua do pH por meio da introdução de um eletrodo diretamente no saco ventral do rúmen. Para uma comparação entre os dois métodos, além da média geral, optou-se por separar os resultados em três faixas, uma relativa ao pH normal ( $\text{pH} \geq 5,6$ ) e outra faixa de pH considerado acidótico em casos de acidose ruminal por AGVCC ( $5,6 < \text{pH} < 5,0$ ) e a faixa de pH acidótico ocasionado por ALRA ( $\text{pH} < 5,0$ ). Para a média geral utilizou-se todos os valores obtidos pela aferição pontual com pHmetro de bancada e então, fez-se a correlação com os respectivos dados obtidos pela leitura telemétrica no momento da coleta. A correlação linear obtida pelos dados de pH gerais obedece à equação:  $y = 0,9478x - 0,0008$  e tem coeficiente de correlação de Pearson de 0,93. Na faixa de pH compreendida entre 5,6 e 5,0 a correlação obedeceu a equação  $y = -2,2462x + 16,932$  e o coeficiente de correlação de Pearson foi de 0,73, já na faixa de pH situada abaixo de 5,0 a obtivemos a equação

da correlação  $y = 0,8101x + 0,6511$ , cujo coeficiente de correlação de Pearson foi de 0,73.

Tabela 2 – Valores médios e desvios padrão da comparação de resultados de pH ruminal obtidos por pHmetro de bancada e sistema de aferição contínua por telemetria em condições normais e acidóticas – São Paulo – 2011

Método	Média geral		Faixa de pH normal		Faixa de pH ARAGVCC		Faixa de pH ALRA	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Bancada	5,48 <sup>A</sup>	0,9	6,64 <sup>A</sup>	0,4	5,4 <sup>A</sup>	0,1	4,54 <sup>A</sup>	0,3
Aferição contínua	5,38 <sup>B</sup>	1,0	6,42 <sup>B</sup>	0,37	4,8 <sup>B</sup>	0,4	4,33	0,3
P	0,001		0,002		0,047		0,001	
R <sup>2</sup>	0,87		0,64		0,53		0,53	
$\rho$	0,93		0,8		0,73		0,73	

Letras maiúsculas na mesma coluna significam diferença entre os métodos de aferição.

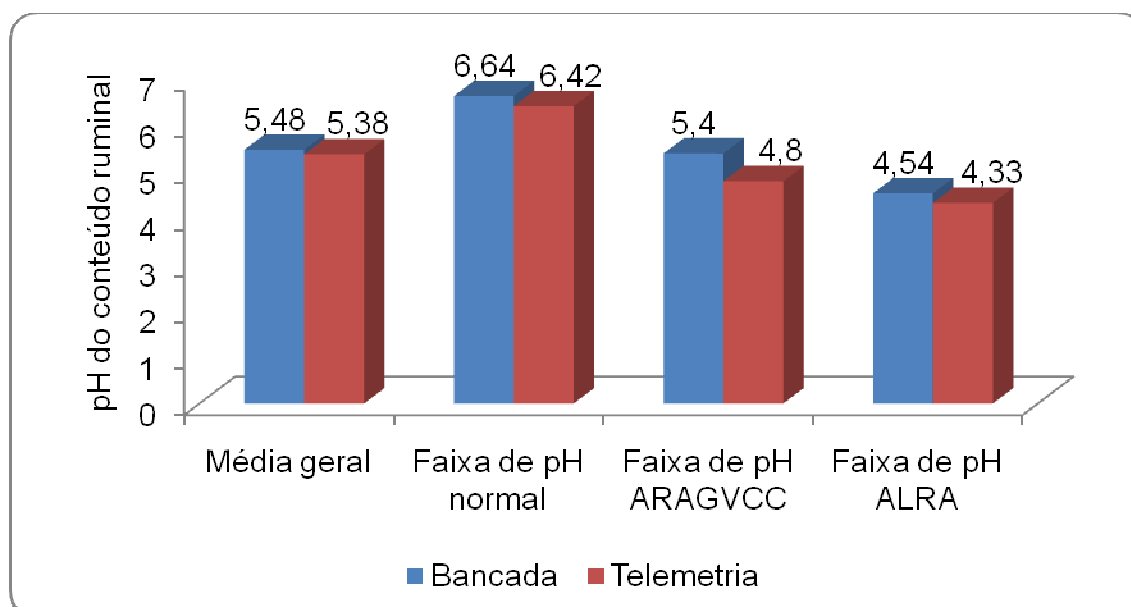


Gráfico 3 – Valores médios da comparação de resultados de pH ruminal obtidos por pHmetro de bancada e sistema de medição contínua em condições normais e acidóticas. São Paulo – 2011

### 5.1.3 Concentração de Ácido Láctico-L no conteúdo ruminal

A Tabela 3 apresenta os valores médios e os respectivos desvios padrão da concentração de ácido láctico-L no conteúdo ruminal. O gráfico 4 ilustra o comportamento dessa variável no decorrer do experimento.

Tabela 3 – Valores médios e desvios padrão da concentração de lactato-L (mMol/l) no conteúdo ruminal de ovinos suplementados com monensina e levedura no decorrer do experimento – São Paulo – 2011

Momentos	Controle		Monensina		Probiótico		P
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
T0	0,47 <sup>d</sup>	0,15	0,34 <sup>c</sup>	0,15	0,26 <sup>c</sup>	0,39	0,345
T6	33,6 <sup>bcd</sup>	11,1	30,3 <sup>ab</sup>	12,6	22,34 <sup>bc</sup>	5,43	0,241
T12	68,3 <sup>ab</sup>	27,7	39,9 <sup>ab</sup>	17,8	38,92 <sup>ab</sup>	11,32	0,077
T18	69,4 <sup>ab</sup>	30,0	42,9 <sup>a</sup>	18,2	51,09 <sup>a</sup>	19,06	0,275
T24	81,2 <sup>Aa</sup>	33,1	41,6 <sup>ABa</sup>	12,7	33,0 <sup>Bab</sup>	20,90	0,023
T36	47,8 <sup>Aabc</sup>	20,3	26,2 <sup>ABab</sup>	18,6	1,39 <sup>Bc</sup>	0,91	0,003
T48	15,2 <sup>Acd</sup>	4,0	16,2 <sup>Ab</sup>	8,1	0,45 <sup>Bc</sup>	0,15	0,001
P		0,001		0,050		0,001	

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos e letras minúsculas nas colunas significam diferença entre os tempos de coleta.

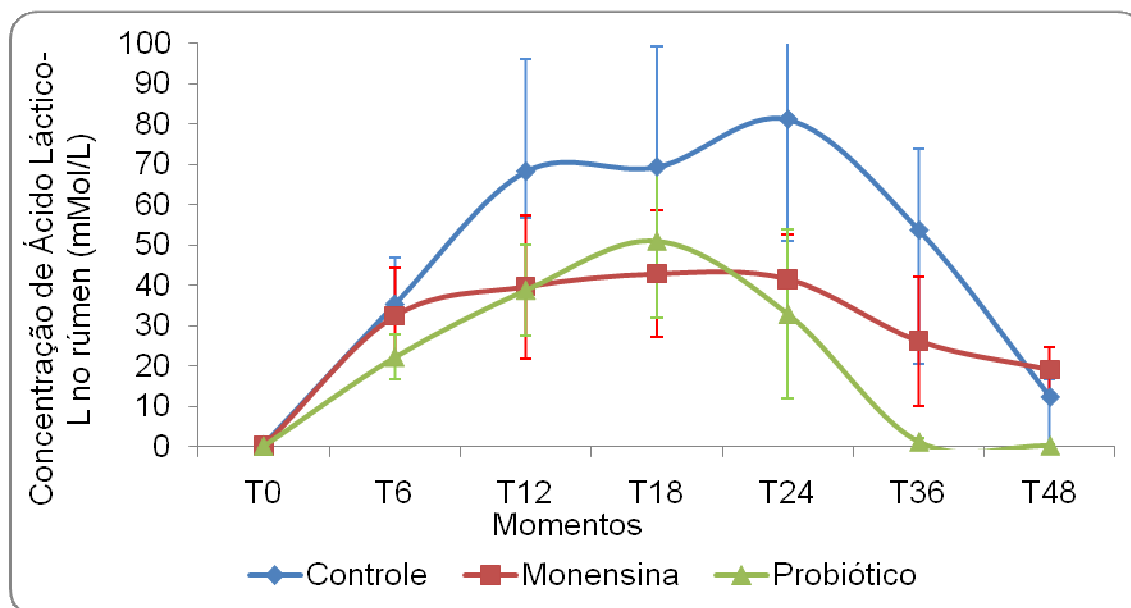


Gráfico 4 – Valores médios e desvios padrão da concentração de lactato-L (mMol/l) no conteúdo ruminal de ovinos suplementados com monensina e levedura no decorrer do experimento – São Paulo – 2011

Observou-se um aumento na concentração de ácido láctico-L no conteúdo ruminal a partir de seis horas após a indução, porém seu pico de concentração foi atingido no T18 para os grupos Probiótico e Monensina e T24 para o grupo Controle. O grupo Controle apresentou valores numericamente superiores aos demais grupos desde o T6 até o final do experimento, no entanto só observamos diferenças significativas em relação ao grupo probiótico e nos momentos T24, T36 e T48. Observou-se no T24 uma diferença numérica dos valores médios de Lactato-L ruminal, sendo o grupo Controle 97,6% superior ao grupo Monensina e 123,03% ao grupo Probiótico. O alto desvio padrão do grupo controle prejudicou a análise estatística dos dados.

#### 5.1.4 Temperatura ruminal

A tabela 4 apresenta os valores médios da temperatura ruminal nos diferentes momentos de avaliação clínica enquanto que gráfico 5 ilustra o comportamento dessa variável ao longo do experimento por meio de medição contínua através do eletrodo intra ruminal. Na avaliação intragrupo, observou-se que o pico de



temperatura foi atingido no tempo T12h em todos os grupos experimentais. Na avaliação entre os grupos, observou-se diferença estatística significativa para o grupo Controle no tempo T12h ( $p < 0,029$ ), que apresentou temperatura mais alta que os demais ( $41,1^{\circ}\text{C}$ ), e o grupo Monensina com a menor temperatura entre os grupos ( $40,4^{\circ}\text{C}$ ). Nos tempos T36h e T48h os grupos Monensina e Probiótico apresentaram temperaturas ruminais mais elevadas que o grupo Controle.

Tabela 4 – Valores médios da temperatura ruminal dos ovinos suplementados com monensina e probiótico obtida por telemetria no decorrer do experimento – São Paulo – 2011

Momentos	Controle		Monensina		Probiótico		P
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
T0	38,8 <sup>c</sup>	0,6	38,5 <sup>b</sup>	0,6	39,0 <sup>b</sup>	0,2	0,433
T6	40,4 <sup>b</sup>	0,5	40,0 <sup>a</sup>	0,5	40,7 <sup>a</sup>	0,6	0,283
T12	41,1 <sup>Aa</sup>	0,2	40,4 <sup>Ba</sup>	0,2	40,6 <sup>ABa</sup>	0,4	0,029
T18	38,4 <sup>cd</sup>	0,7	39,7 <sup>ab</sup>	0,7	39,7 <sup>ab</sup>	1,1	0,111
T24	38,1 <sup>cd</sup>	0,6	39,5 <sup>ab</sup>	0,6	39,5 <sup>ab</sup>	1,6	0,270
T36	37,8 <sup>Bde</sup>	1,5	40,2 <sup>Aa</sup>	1,5	39,9 <sup>Aab</sup>	0,6	0,012
T48	37,7 <sup>Be</sup>	1,5	40,0 <sup>Aa</sup>	1,5	40 <sup>Aab</sup>	0,4	0,007
P	0,001		0,122		0,102		

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos e letras minúsculas nas colunas significam diferença entre os tempos de coleta.

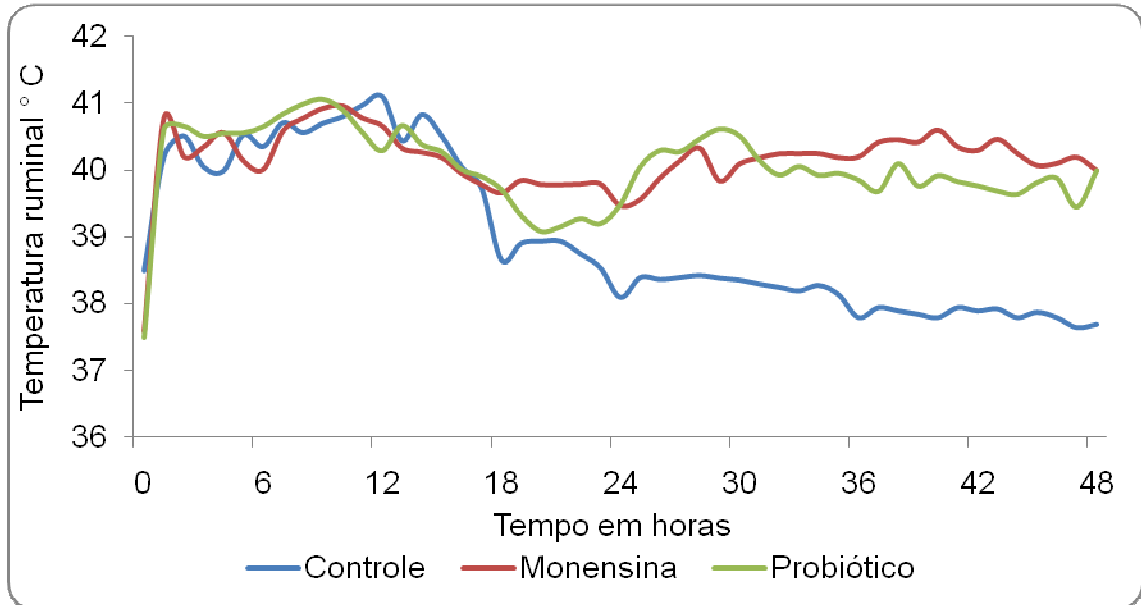


Gráfico 5 – Valores médios da temperatura ruminal dos ovinos suplementados com monensina e probiótico obtida por sistema de medição contínua no decorrer do experimento – São Paulo – 2011

### 5.1.5 Osmolaridade do conteúdo ruminal

A tabela 5 exhibe os valores médios e desvios padrão da osmolaridade do conteúdo ruminal dos ovinos suplementados com monensina e probiótico submetidos à ALRA. O gráfico 6 ilustra o comportamento da osmolaridade do conteúdo ruminal ao longo do experimento

Tabela 5 – Valores médios e desvios padrão da Osmolaridade do conteúdo ruminal (mOsm/l) dos ovinos suplementados com monensina e probiótico no decorrer do experimento – São Paulo – 2011

Momentos	Controle		Monensina		Probiótico		P
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
T0	274 <sup>Ab</sup>	19	253 <sup>A</sup>	12	206 <sup>Bb</sup>	13	0,001
T6	453 <sup>Aa</sup>	75	377 <sup>B</sup>	89	293 <sup>Bab</sup>	42	0,018
T12	357 <sup>ab</sup>	92	284	75	299 <sup>a</sup>	64	0,363
T18	309 <sup>b</sup>	29	307	81	278 <sup>Aab</sup>	77	0,795
T24	328 <sup>Ab</sup>	67	339 <sup>A</sup>	42	234 <sup>Bab</sup>	26	0,013
T36	306 <sup>Ab</sup>	14	256 <sup>AB</sup>	87	205 <sup>Bab</sup>	53	0,050
T48	309 <sup>Ab</sup>	21	218 <sup>B</sup>	34,01	202 <sup>Bab</sup>	22	0,001
P	0,000		0,089		0,006		

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos e letras minúsculas nas colunas significam diferença entre os tempos de coleta.

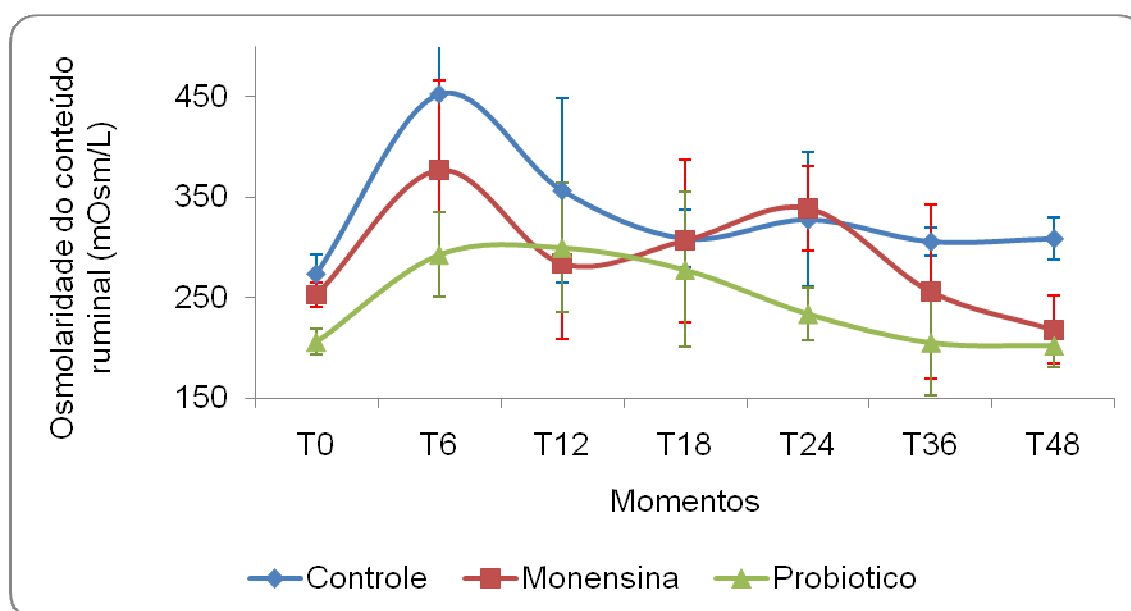


Gráfico 6 – Valores médios e desvios padrão da Osmolaridade do conteúdo ruminal (mOsm/l) dos ovinos suplementados com monensina e probiótico no decorrer do experimento – São Paulo – 2011

Dentre os valores de Osmolaridade encontrados não houve diferença estatística significativa relativa ao tratamento que os grupos receberam, havendo diferenças somente em função do tempo.

No tempo T0 o grupo Probiótico apresentou valores de Osmolaridade abaixo dos outros dois grupos ( $p < 0,00$ ). O pico da Osmolaridade foi observado no tempo T6h para todos os grupos, sendo que nesse momento o grupo Controle apresentou maiores valores de osmolaridade ruminal do que os demais grupos ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença estatística entre os grupos Monensina e Probiótico.

## 5.2 VARIÁVEIS SANGÜÍNEAS

### 5.2.1 Déficit de volume plasmático

Os valores médios e os desvios-padrão do déficit de volume plasmático dos ovinos submetidos à indução de ALRA estão representados na tabela 6. O gráfico 7 apresenta o comportamento desta variável no decorrer do experimento.

Tabela 6 – Valores médios e desvios padrão do déficit de volume plasmático (%) dos ovinos suplementados com monensina e probiótico no decorrer do experimento – São Paulo – 2011

Momentos	Controle		Monensina		Probiótico		P
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
T6	8,3 <sup>b</sup>	4,0	8,4 <sup>d</sup>	4,0	10,6 <sup>ab</sup>	6,4	0,734
T12	25,5 <sup>a</sup>	11,7	25,0 <sup>abc</sup>	13,0	17,1 <sup>ab</sup>	7,5	0,428
T18	34,0 <sup>Aa</sup>	11,8	30,4 <sup>ab</sup>	10,9	24,0 <sup>a</sup>	11,3	0,401
T24	36,7 <sup>Aa</sup>	6,8	31,9 <sup>ABa</sup>	14,9	18,6 <sup>Bab</sup>	7,4	0,038
T36	37,5 <sup>Aa</sup>	18,5	11,0 <sup>Bcd</sup>	10,4	2,5 <sup>Bb</sup>	7,5	0,015
T48	12,4 <sup>b</sup>	5,3	15,8 <sup>bcd</sup>	8,3	4,5 <sup>b</sup>	12,0	0,223
P	0, 001		0, 022		0, 002		

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos. Letras minúsculas nas colunas significam diferença entre os tempos de coleta

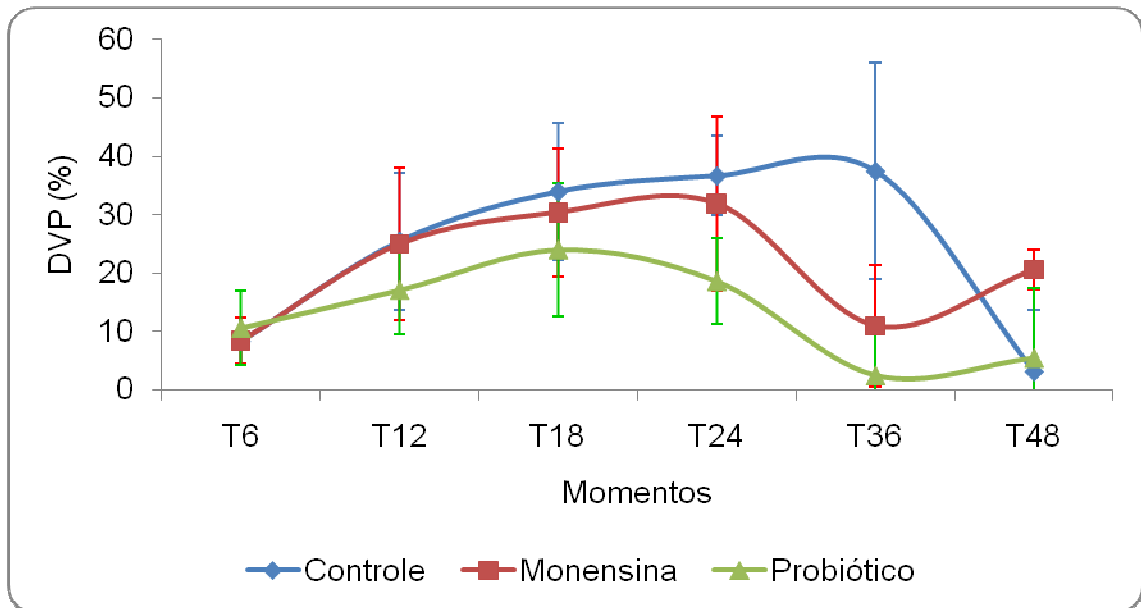


Gráfico 7 – Valores médios e desvios-padrão do déficit de volume plasmático (%) dos ovinos suplementados com monensina e probiótico no decorrer do experimento – São Paulo – 2011

### 5.2.2 pH sanguíneo

Os valores médios e desvios padrão de pH sanguíneo referentes aos tempos do experimento estão expressos na tabela 7. A partir do tempo T12h todos os grupos apresentaram valores abaixo do valor observado no início de experimento T0. O momento em que o pH sanguíneo apresentou-se mais baixo foi o mesmo nos grupos Controle e Monensina, o tempo T24h. O grupo Probiótico apresentou maior valor de pH sanguíneo que os demais grupos nos tempos T24h e T36h ( $p < 0,05$ ), quando então encontrou-se dentro dos limites fisiológicos de normalidade. O gráfico 8 apresenta o comportamento do pH sanguíneo ao longo do tempo transcorrido entre os momentos inicial e final do ensaio.

Tabela 7 – Valores médios e desvios padrão de pH sanguíneo dos ovinos suplementados com monensina e probiótico no decorrer do experimento – São Paulo – 2011

Momentos	Controle		Monensina		Probiótico		P
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
T0	7,41 <sup>a</sup>	0,03	7,36 <sup>a</sup>	0,05	7,41	0,06	0,437
T6	7,36 <sup>ab</sup>	0,03	7,37 <sup>a</sup>	0,04	7,41	0,06	0,263
T12	7,30 <sup>ab</sup>	0,03	7,30 <sup>ab</sup>	0,10	7,33	0,09	0,794
T18	7,25 <sup>b</sup>	0,04	7,27 <sup>b</sup>	0,07	7,28	0,08	0,751
T24	7,22 <sup>Bb</sup>	0,08	7,20 <sup>Bb</sup>	0,07	7,34 <sup>A</sup>	0,11	0,050
T36	7,31 <sup>Aab</sup>	0,07	7,25 <sup>ABab</sup>	0,07	7,37 <sup>B</sup>	0,06	0,050
T48	7,37 <sup>ab</sup>	0,08	7,35 <sup>a</sup>	0,07	7,38	0,06	0,989
P	0,001		0,017		0,299		

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos, letras minúsculas nas colunas significam diferença entre os tempos de coleta.

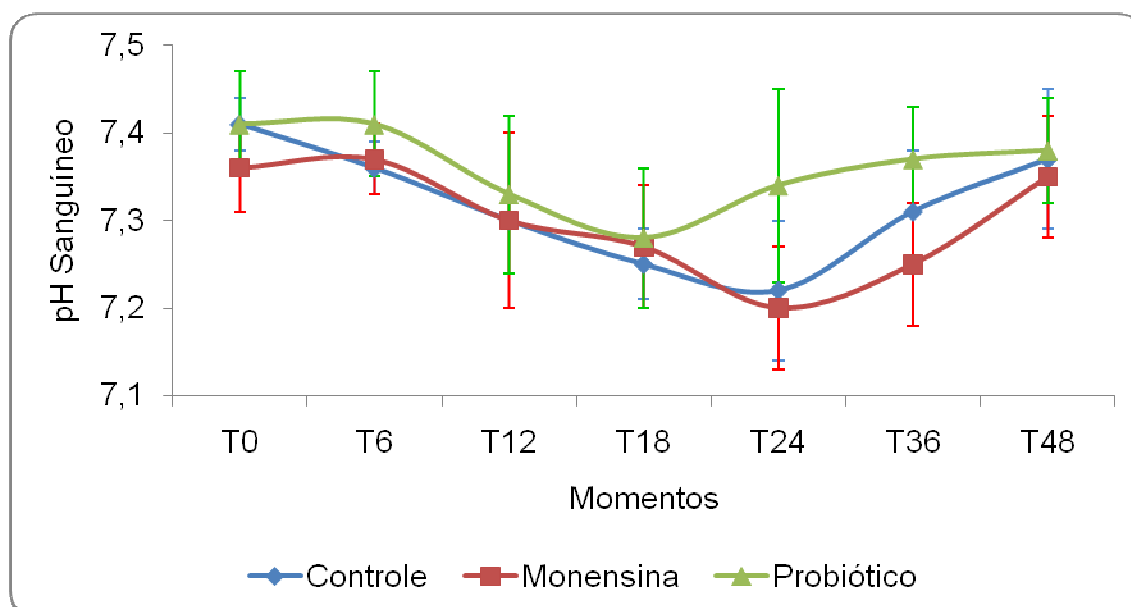


Gráfico 8 – Valores médios e desvios padrão de pH sanguíneo dos ovinos suplementados com monensina e probiótico no decorrer do experimento – São Paulo – 2011

### 5.2.3 Concentração de excesso de ácido-base (EAB)

Na tabela 8 encontramos os valores médios da concentração de excesso de ácido-base. O gráfico 9 ilustra o comportamento desta variável no decorrer do experimento.

Tabela 8 – Valores médios e desvios padrão da concentração de excesso de ácido-base nos animais suplementados com monensina e probiótico durante o experimento – São Paulo – 2011

Momentos	Controle		Monensina		Probiótico		P
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
T0	-1,6 <sup>b</sup>	1,8	-2,6 <sup>ab</sup>	3,5	0,9	4,1	0,289
T6	-2,2 <sup>a</sup>	2,4	-1,5 <sup>a</sup>	4,0	2,9	3,0	0,169
T12	-5,4 <sup>a</sup>	2,7	-11,6 <sup>c</sup>	2,5	-4,6	6,9	0,175
T18	-9,6 <sup>Aba</sup>	2,4	-14,2 <sup>Bc</sup>	2,9	-4,6 <sup>A</sup>	5,8	0,031
T24	-9,3 <sup>Ba</sup>	1,9	-13,7 <sup>Bc</sup>	2,0	-1,0 <sup>A</sup>	5,1	0,001
T36	-5,4 <sup>ABa</sup>	3,9	-9,2 <sup>Bbc</sup>	3,6	-0,5 <sup>A</sup>	1,8	0,014
T48	-5,7 <sup>a</sup>	4,3	-7,9 <sup>abc</sup>	2,9	-4,0	4,6	0,410
P	0,001		0,001		0,135		

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos, letras minúsculas nas colunas significam diferença entre os tempos de coleta.

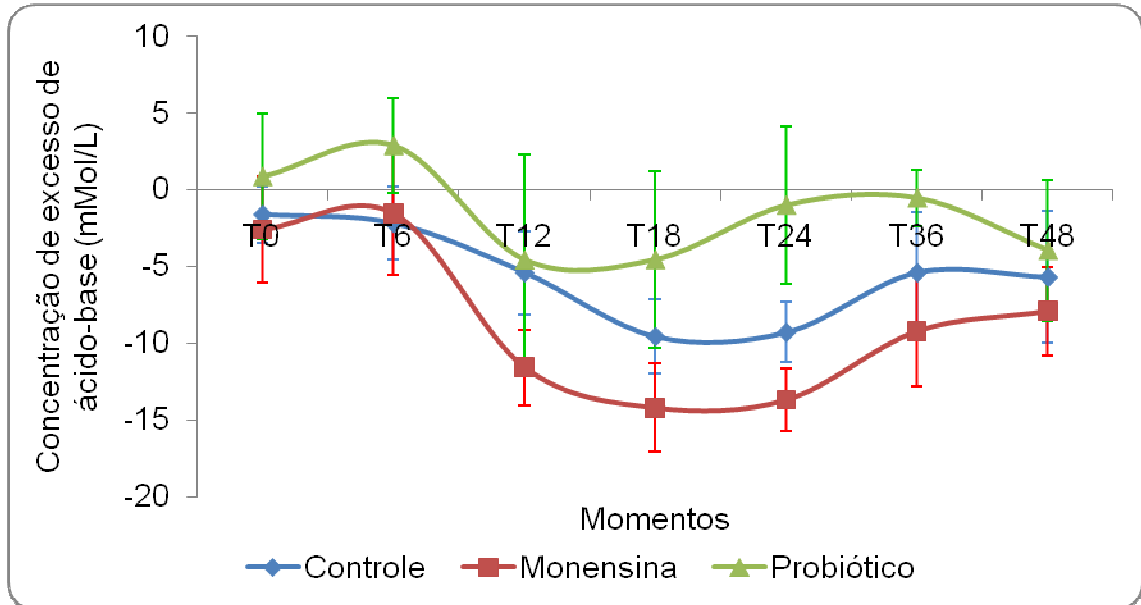


Gráfico 9 – Valores médios e desvios padrão da concentração de excesso de ácido-base nos animais suplementados com monensina e probiótico durante o experimento – São Paulo – 2011

#### 5.2.4 Concentração de bicarbonato sangüíneo

Na tabela 9 encontramos os valores médios da concentração de bicarbonato. O gráfico 10 ilustra o comportamento desta variável no decorrer do experimento.



Tabela 9 – Valores médios e desvios padrão da concentração de bicarbonato sangüíneo (mMol/L) nos animais suplementados com monensina e probiótico durante o experimento – São Paulo – 2011

Momentos	Controle		Monensina		Probiótico		P
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
T0	26,4 <sup>a</sup>	1,7	26,0 <sup>a</sup>	1,9	27,3	0,99	0,476
T6	28,0 <sup>b</sup>	3,0	23,4 <sup>ab</sup>	4,2	27,7	2,52	0,145
T12	19,7 <sup>b</sup>	2,6	16,3 <sup>c</sup>	2,1	20,6	5,86	0,307
T18	17,0 <sup>ABb</sup>	2,1	13,6 <sup>Bc</sup>	0,5	21,4 <sup>A</sup>	5,55	0,025
T24	18,0 <sup>ABb</sup>	2,5	13,5 <sup>Bc</sup>	1,6	23,2 <sup>A</sup>	4,38	0,004
T36	20,0 <sup>ABb</sup>	3,0	16,3 <sup>Bc</sup>	2,1	19,5 <sup>A</sup>	4,02	0,236
T48	19,8 <sup>b</sup>	3,4	17,4 <sup>bc</sup>	1,6	22,1	4,47	0,196
P	0,001		0,000		0,073		

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos, letras minúsculas nas colunas significam diferença entre os tempos de coleta.

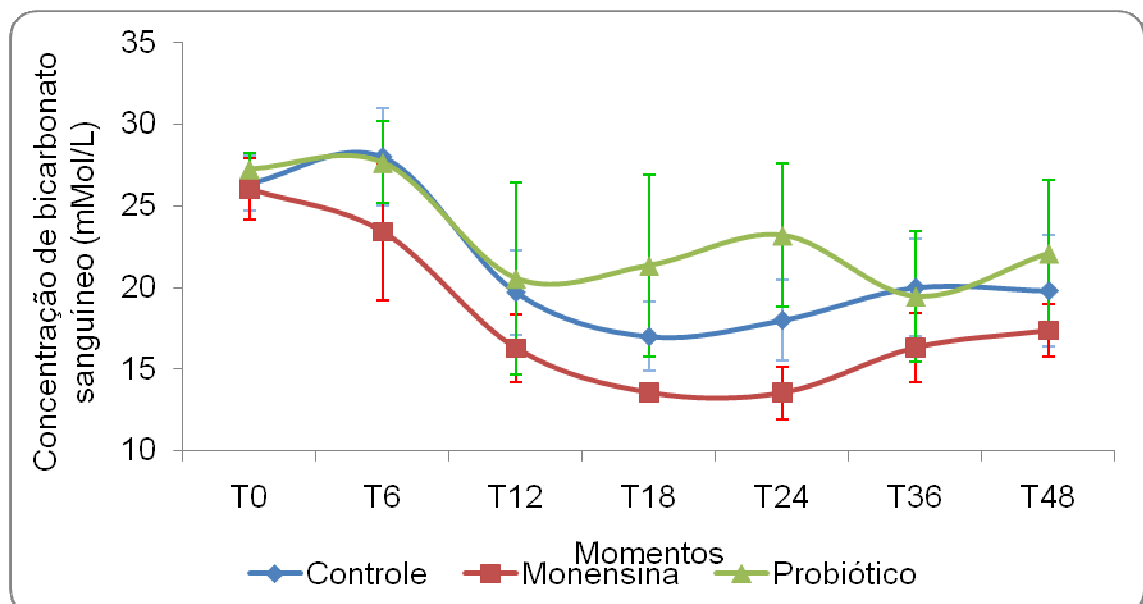


Gráfico 10 – Valores médios e desvios padrão da concentração de bicarbonato sangüíneo (mMol/L) nos animais suplementados com monensina e probiótico durante o experimento – São Paulo – 2011.

### 5.2.5 Concentração plasmática de Lactato-L

Os valores médios e os respectivos desvios padrão encontram-se expostos na tabela 10. Não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum dos momentos avaliados. A concentração de lactato-L foi significativamente superior a partir do tempo T6h, sendo o momento de maior valor para o grupo Controle. O grupo Monensina apresentou o pico no momento T12h e o grupo Probiótico apresentou o valor mais alto no momento T48h. O gráfico 11 ilustra o comportamento desta variável no decorrer do experimento.

Tabela 10 – Valores médios e desvios padrão da concentração de lactato-L plasmático dos ovinos suplementados com monensina e probiótico no decorrer do experimento – São Paulo – 2011

Momentos	Controle		Monensina		Probiótico		P
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
T0	0,49 <sup>b</sup>	0,53	0,47	0,19	0,55 <sup>b</sup>	0,39	0,940
T6	3,74 <sup>a</sup>	1,79	2,39	1,53	2,66 <sup>a</sup>	0,95	0,333
T12	2,82 <sup>ab</sup>	2,61	3,36	2,29	2,48 <sup>a</sup>	0,81	0,822
T18	2,27 <sup>ab</sup>	0,48	2,47	1,4	2,38 <sup>ab</sup>	0,94	0,962
T24	1,84 <sup>ab</sup>	1,39	1,75	0,51	2,51 <sup>a</sup>	1,09	0,534
T36	2,60 <sup>ab</sup>	2,32	1,60	0,54	1,97 <sup>ab</sup>	0,89	0,629
T48	2,14 <sup>ab</sup>	0,88	2,54	1,57	3,24 <sup>ab</sup>	2,47	0,614
P	0,064		0,218		0,010		

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos.

Letras minúsculas nas colunas significam diferença entre os tempos de coleta.

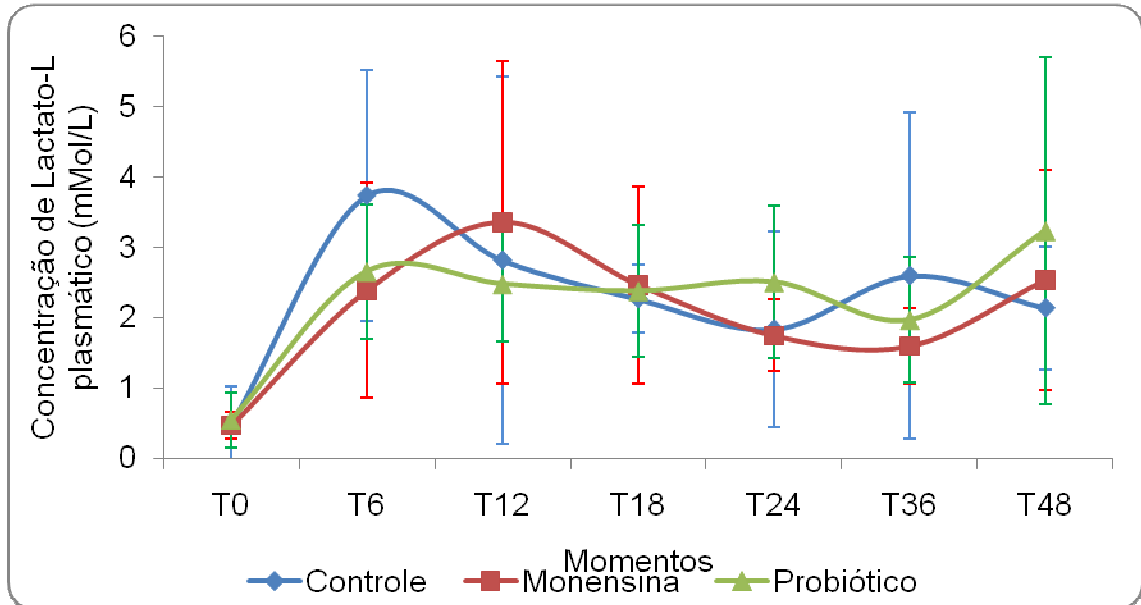


Gráfico 11 – Valores médios e desvios padrão da concentração de lactato-L plasmático dos ovinos suplementados com monensina e probiótico no decorrer do experimento – São Paulo – 2011

### 5.2.6 Osmolaridade sérica

Os valores médios e os respectivos desvios padrão da Osmolaridade sérica no decorrer do experimento podem ser vistos na tabela 11. O gráfico 12 apresenta o comportamento dessa variável ao longo do experimento.

O grupo Controle apresentou diferença estatística em relação ao grupo Probiótico no momento T6h, porém esta diferença não ocorreu em comparação com o grupo Monensina ( $p < 0,018$ ). O mesmo padrão repetiu-se no tempo T12h, quando o grupo Probiótico apresentou o valor mais baixo entre os três grupos, com diferença significativa quando comparado ao grupo Controle porém não quando comparado ao grupo Monensina, e nem o grupo Monensina quando comparado ao grupo Controle.

Tabela 11 – Valores médios e os respectivos desvios padrão da Osmolaridade sérica no decorrer do experimento – São Paulo – 2011

Momentos	Controle		Monensina		Probiótico		P
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
T0	295	10,4	294	4,4	301	12,7	0,605
T6	319 <sup>A</sup>	12,5	309 <sup>AB</sup>	7,8	300 <sup>B</sup>	5,6	0,018
T12	321 <sup>A</sup>	15,5	300 <sup>AB</sup>	14,9	291 <sup>B</sup>	7,9	0,008
T18	297	12,4	303	21,0	281	5,9	0,078
T24	295 <sup>A</sup>	12,9	287 <sup>AB</sup>	7,7	277 <sup>B</sup>	7,8	0,440
T36	293 <sup>A</sup>	6,2	290 <sup>AB</sup>	8,8	278 <sup>B</sup>	8,2	0,029
T48	288 <sup>A</sup>	4,8	293 <sup>AB</sup>	8,8	277 <sup>A</sup>	6,1	0,009

P

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos.

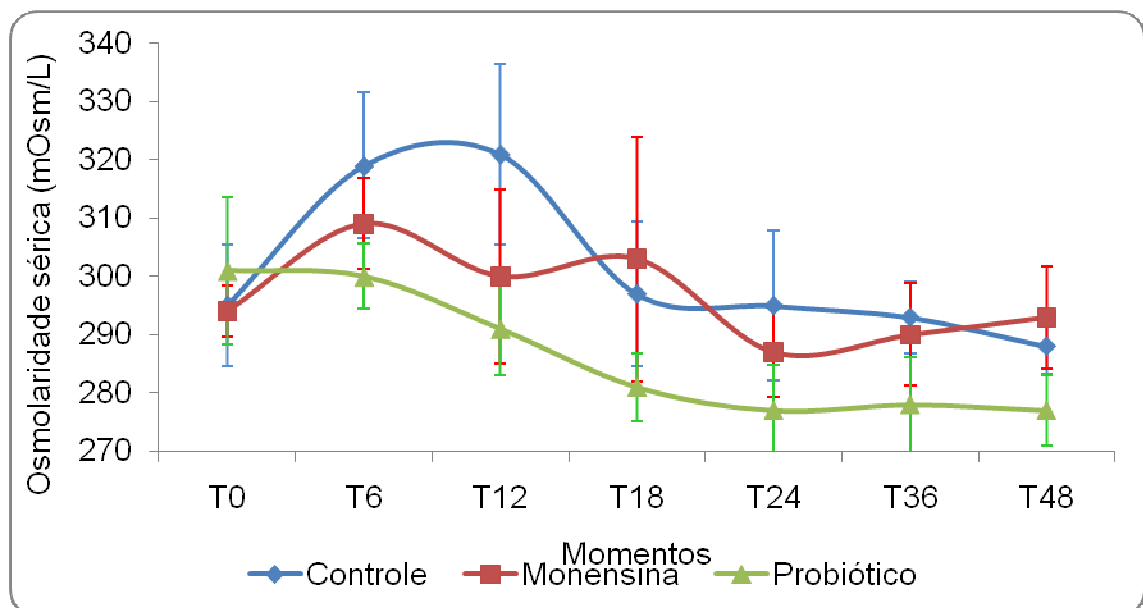


Gráfico 12 – Valores médios e os respectivos desvios padrão da Osmolaridade sérica no decorrer do experimento – São Paulo – 2011

### 5.2.7 Concentração de glicose plasmática

Os valores médios e os respectivos desvios padrão da glicemia no decorrer do experimento podem ser vistos na tabela 12. O gráfico 13 apresenta o comportamento dessa variável ao longo do experimento.

Tabela 12 – Valores médios e os respectivos desvios padrão da concentração de glicose plasmática mg/dL no decorrer do experimento – São Paulo – 2011

Momentos	Controle		Monensina		Probiótico		P
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
T0	57,5	7,7	58,3	3,2	62,4 <sup>a</sup>	8,4	0,542
T6	51,7	12,9	56,3	22,6	53,0 <sup>ab</sup>	8,7	0,892
T12	58,2	30,9	42,0	8,8	43,6 <sup>ab</sup>	12,1	0,429
T18	68,7	51,4	50,3	9,7	46,0 <sup>ab</sup>	9,1	0,519
T24	52,5	14,2	49,5	15,3	57,0 <sup>ab</sup>	9,9	0,698
T36	63,5	19,6	40,3	12,6	41,8 <sup>b</sup>	12,3	0,089
T48	67,6 <sup>A</sup>	8,7	47,0 <sup>B</sup>	11,1	49,6 <sup>Bab</sup>	9,0	0,013
P	0,877		0,503		0,030		

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos.

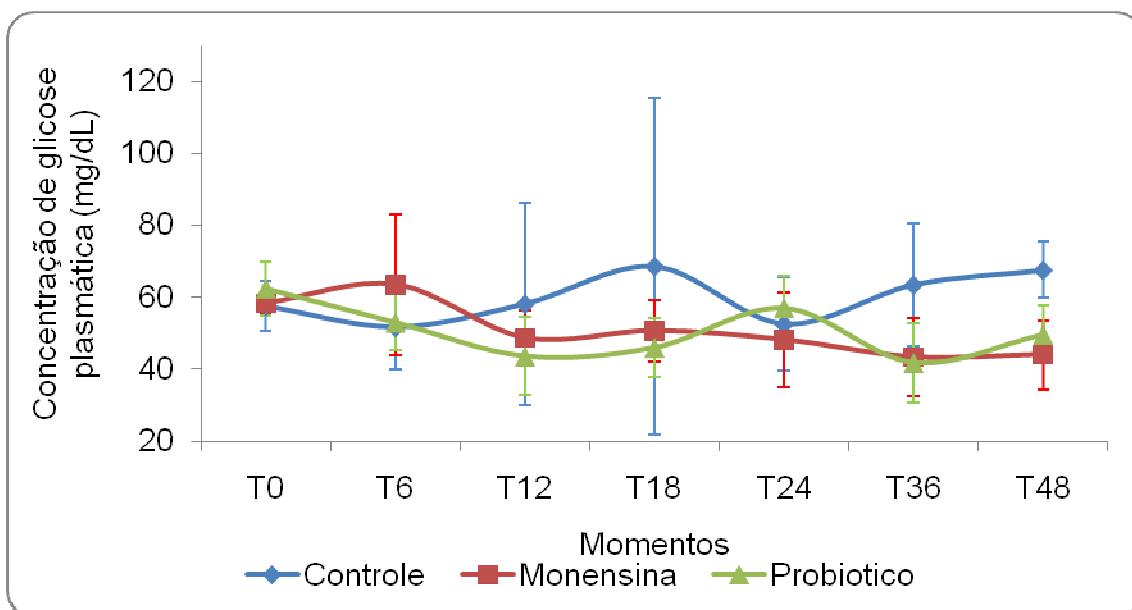


Gráfico 13- Valores médios e os respectivos desvios padrão da concentração de glicose plasmática mg/dL no decorrer do experimento – São Paulo – 2011

### 5.3 VARIÁVEIS CLÍNICAS

#### 5.3.1 Freqüência cardíaca

A tabela 13 apresenta os resultados dos valores médios e respectivos desvios-padrão da freqüência cardíaca média dos animais dos grupos Controle, Monensina e Probiótico no decorrer do experimento.

Tabela 13 – Valores médios e os respectivos desvios padrão da freqüência cardíaca dos animais suplementados com monensina e probiótico no decorrer do experimento – São Paulo – 2011

Momentos	Controle		Monensina		Probiótico		P
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
T0	80 <sup>d</sup>	6	83 <sup>c</sup>	9	77 <sup>b</sup>	3,6	0,475
T6	100 <sup>bc</sup>	20	97 <sup>abc</sup>	8	96 <sup>ab</sup>	12,2	0,863
T12	110 <sup>ab</sup>	8	110 <sup>ab</sup>	12	101 <sup>a</sup>	8,3	0,318
T18	113 <sup>ab</sup>	9	115 <sup>a</sup>	4	109 <sup>a</sup>	14,9	0,736
T24	116 <sup>a</sup>	10	102 <sup>abc</sup>	10	110 <sup>a</sup>	10,4	0,154
T36	113 <sup>Aab</sup>	11	104 <sup>ABab</sup>	7	97 <sup>Ba</sup>	4	0,035
T48	88 <sup>cd</sup>	6	95 <sup>abc</sup>	6	94 <sup>ab</sup>	6	0,709
P	0,001		0,001		0,001		

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos.

Letras minúsculas nas colunas significam diferença entre os tempos de coleta

O gráfico 14 ilustra o comportamento desta variável ao longo do experimento

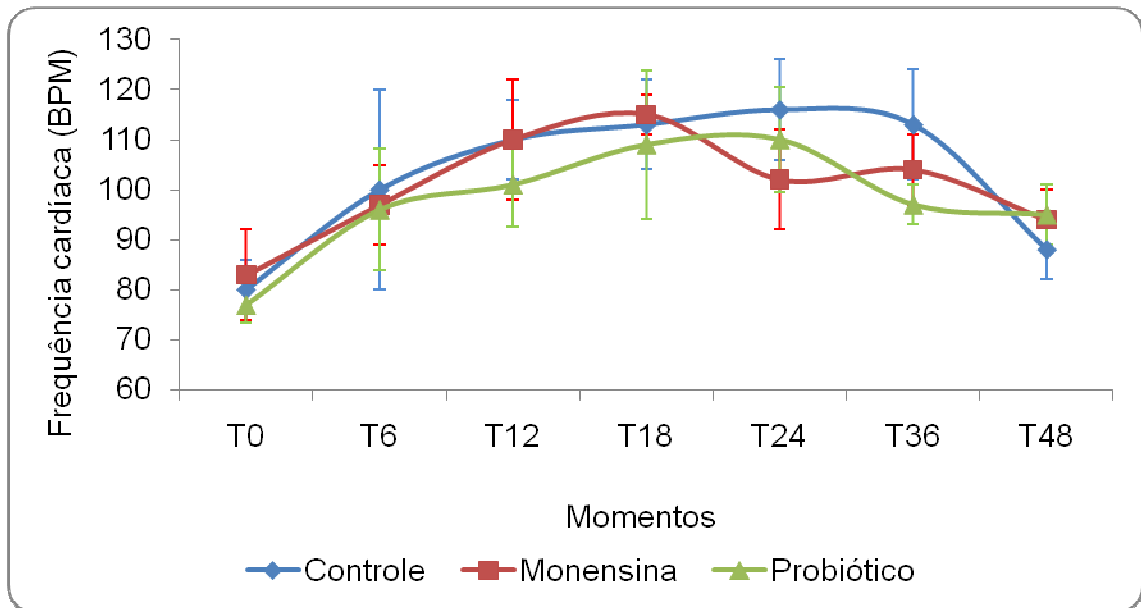


Gráfico 14 – Valores médios e os respectivos desvios padrão da frequência cardíaca dos animais suplementados com monensina e probiótico no decorrer do experimento – São Paulo – 2011

### 5.3.2 Frequência respiratória

A tabela 14 apresenta os resultados dos valores médios e respectivos desvios-padrão da frequência cardíaca média dos animais dos grupos Controle, Monensina e Probiótico no decorrer do experimento. O gráfico 15 apresenta o comportamento dessa variável ao longo do experimento.

Tabela 14 - Valores médios e os respectivos desvios padrão da freqüência respiratória dos animais suplementados com monensina e probiótico no decorrer do experimento – São Paulo - 2011

Momentos	Controle		Monensina		Probiótico		P
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
T0	16,5	2,5	19,8	3,19	24,5	6,6	0,075
T6	15,5 <sup>B</sup>	4,1	20,5 <sup>AB</sup>	3,56	28,0 <sup>A</sup>	9,8	0,038
T12	18,0	2,3	20,0	0,0	21,2	4,8	0,385
T18	15,5	3,4	19,0	6,0	21,0	2,0	0,220
T24	17,5	2,5	22,0	2,3	22,4	3,6	0,066
T36	18,5	1,9	19,0	1,2	19,0	2,6	0,919
T48	19,5	2,5	19,2	4,3	18,0	1,6	0,759

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos.

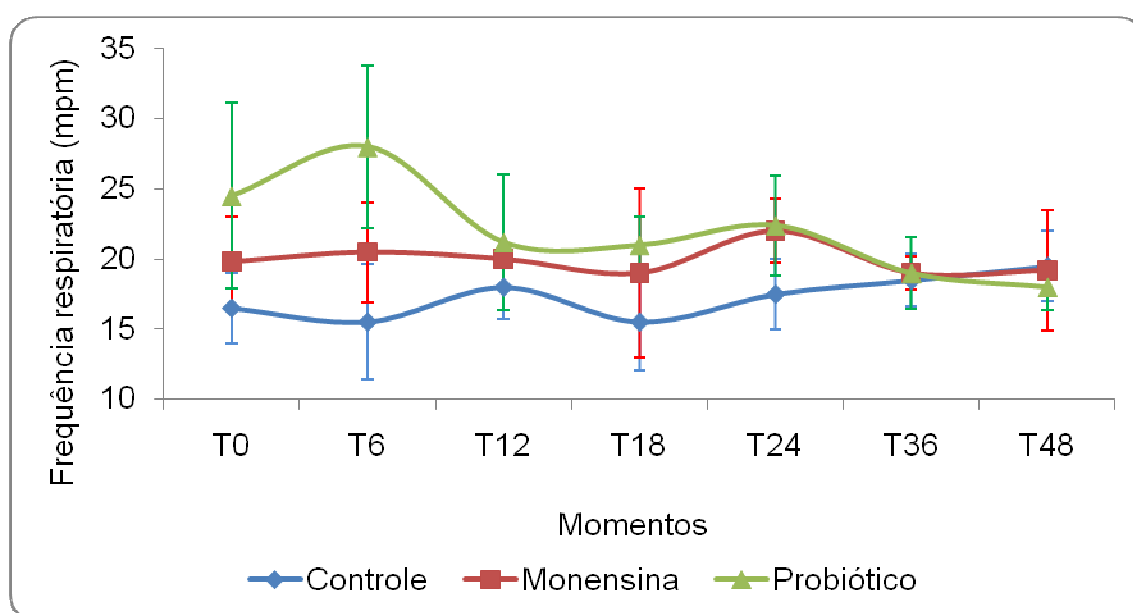


Gráfico 15 – Valores médios e os respectivos desvios padrão da freqüência respiratória (mpm) dos animais suplementados com monensina e probiótico no decorrer do experimento – São Paulo – 2011



### 5.3.3 Movimentos ruminais

A tabela 15 apresenta os valores médios e respectivos desvios-padrão referentes aos movimentos ruminais em 3 minutos dos ovinos pertencentes aos três grupos no decorrer do experimento. O gráfico 16 apresenta o comportamento dessa variável ao longo do experimento.

Tabela 15 - Valores médios e os respectivos desvios-padrão da frequência dos movimentos ruminais em 3 minutos dos animais suplementados com monensina e probiótico no decorrer do experimento – São Paulo - 2011

Momentos	Controle		Monensina		Probiótico		P
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
T0	2,3 <sup>a</sup>	0,8	3,0 <sup>a</sup>	0,0	2,7 <sup>a</sup>	0,5	0,261
T6	2,3 <sup>a</sup>	1,0	1,2 <sup>b</sup>	0,9	1,8 <sup>b</sup>	0,8	0,248
T12	0,7 <sup>b</sup>	0,5	0,7 <sup>c</sup>	0,5	0,4 <sup>c</sup>	0,5	0,576
T18	0,0 <sup>Bc</sup>	0,0	0,0 <sup>Bd</sup>	0,0	1,0 <sup>Ac</sup>	0,7	0,003
T24	0,0 <sup>c</sup>	0,0	0,2 <sup>Ad</sup>	0,5	0,0 <sup>d</sup>	0,0	0,269
T36	0,0 <sup>c</sup>	0,0	0,0 <sup>d</sup>	0,0	0,0 <sup>d</sup>	0,0	0,269
T48	1,0 <sup>b</sup>	0,0	0,7 <sup>c</sup>	1,5	1,0 <sup>c</sup>	0,0	0,866
P	0,001		0,001		0,001		

Letras maiúsculas nas linhas significam diferença estatística entre os grupos.

Letras minúsculas nas colunas significam diferença entre os tempos de coleta.

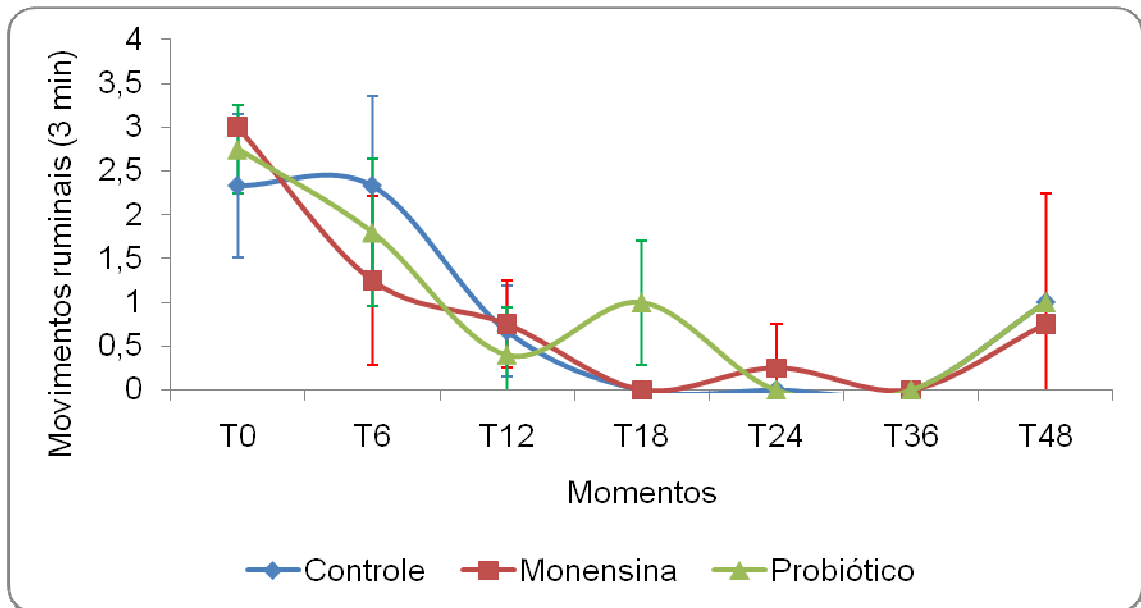


Gráfico 16 – Valores médios e os respectivos desvios-padrão da freqüência dos movimentos ruminais em 3 minutos dos animais suplementados com monensina e probiótico no decorrer do experimento – São Paulo – 2011

#### 5.4 OCORRÊNCIAS CLÍNICAS

Todas as ocorrências observadas durante o decorrer do ensaio estão expostas no quadro 2. Um animal de cada grupo apresentou diarreia durante o experimento. Mesmo após receber todo tratamento clínico necessário, devido à severidade do quadro de acidose desenvolvido, um animal do grupo controle morreu durante o período do experimento, entre os tempos 36 e 48 h. A desidratação severa foi observada em animais dois do grupo Controle e Monensina. O Grupo Monensina foi o que apresentou maior numero de casos de laminite em consequência da acidose desenvolvida. Marcante hiporexia se manifestou em dois animais do grupo controle e um do grupo monensina. após o tempo 24h.

Quadro 02- Ocorrências clínicas constatadas durante nos animais no decorrer da experimentação

Grupos	Controle	Monensina	Probiótico
Diarréia	1/6	1/6	1/6
Hiporexia após 24h	3/6	2/6	-
Laminite	1/6	3/6	1/6
Depressão do quadro geral	3/6	2/6	-
Desidratação severa	3/6	2/6	-
Morte	1/6	-	-

## 5.5 RELAÇÕES ENTRE VARIÁVEIS

### 5.5.1 Relação entre pH e a concentração de lactato-L do conteúdo ruminal

O gráfico 17 apresenta a correlação entre pH e a concentração de lactato-L do conteúdo ruminal nos ovinos.

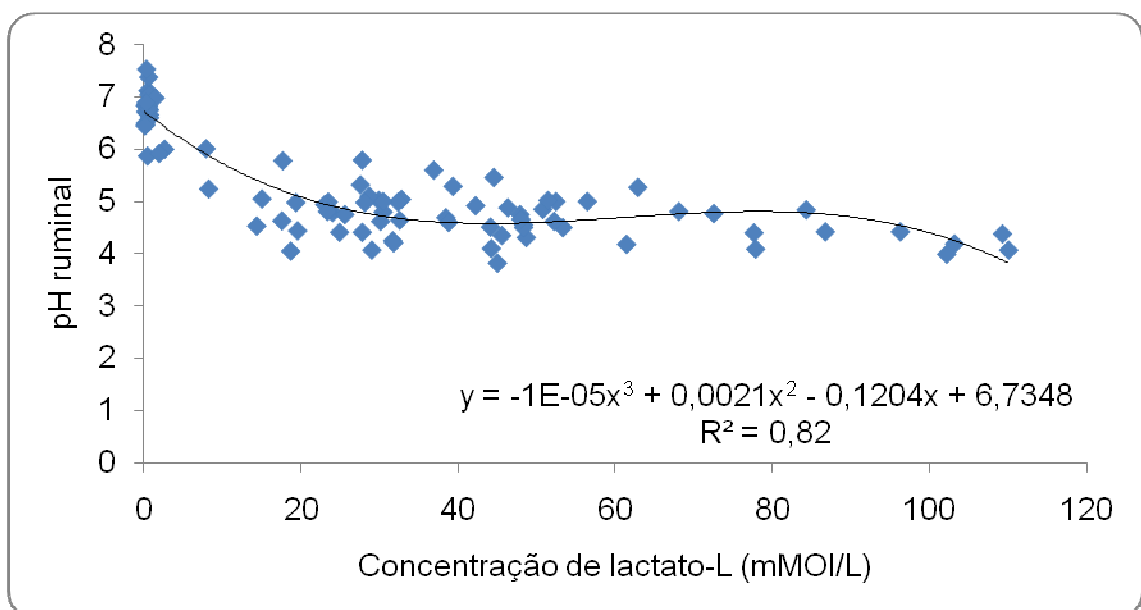


Gráfico 17 – Relação entre pH e a concentração de lactato-L (mMol/L) do conteúdo ruminal dos ovinos no decorrer do experimento – São Paulo – 2011

### 5.5.2 Relação entre lactato L e a osmolaridade do conteúdo ruminal

O gráfico 18 exibe a relação entre a concentração de ácido láctico-L ruminal e a osmolaridade ruminal. Para isso excluiu-se os resultados dos momentos T6 e T12, de todos os tratamentos, devido à elevação da osmolaridade causado pela acidose ruminal, decorrente do aumento da produção dos ácidos graxos voláteis de cadeia curta e não pela produção de ácido láctico.

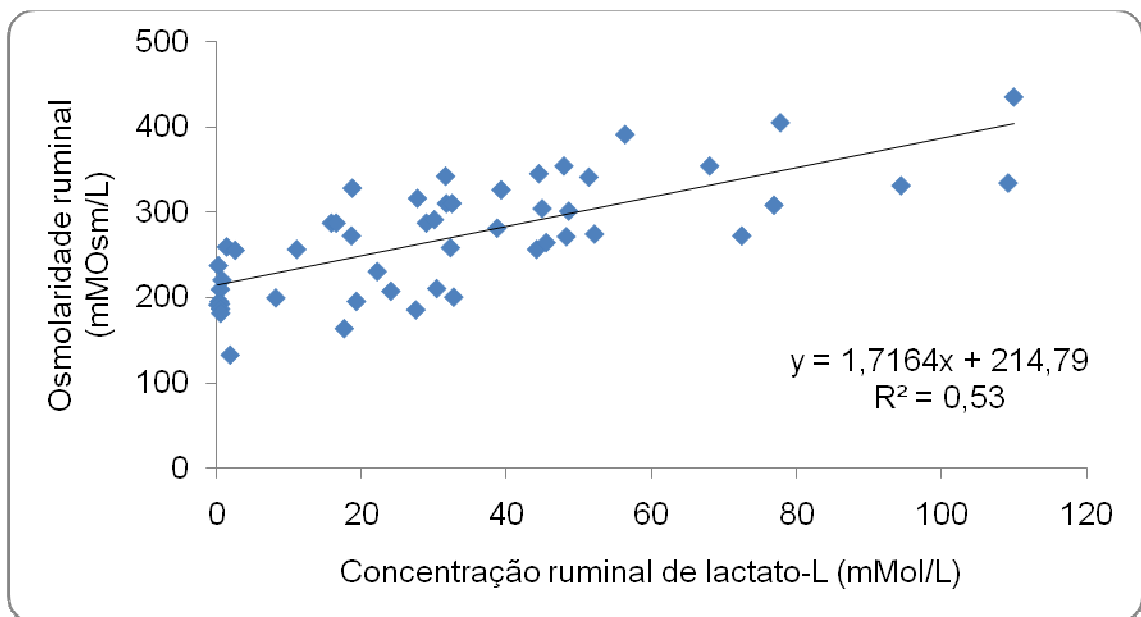


Gráfico 18 – Relação entre a concentração de lactato L e a osmolaridade ruminal dos ovinos no decorrer do experimento – São Paulo – 2011

### 5.5.3 Relação entre o lactato-L ruminal e lactato-L plasmático

O gráfico 19 apresenta a correlação entre pH e a concentração de lactato-L do conteúdo ruminal nos ovinos. Para esta análise foram considerados todos os dados disponíveis das duas variáveis sem distinção de grupo ou momento experimental.

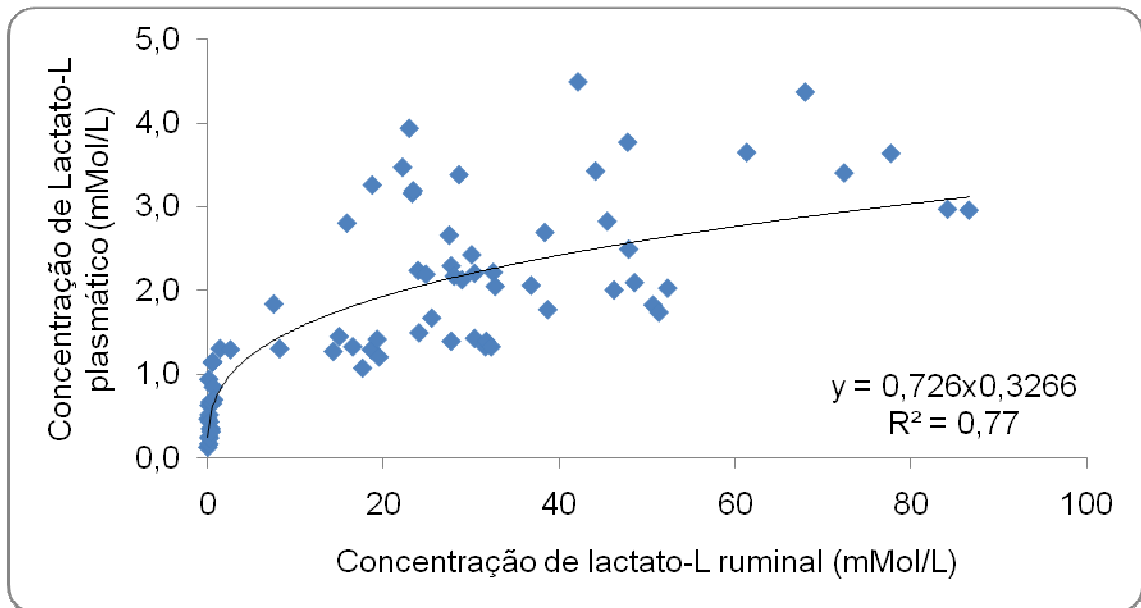


Gráfico 19 - Relação entre o lactato-L ruminal e lactato-L plasmático dos ovinos durante o experimento – São Paulo – 2011

#### 5.5.4 Relação entre pH e temperatura ruminal

O gráfico 20 apresenta a correlação entre pH e a concentração de lactato-L do conteúdo ruminal nos ovinos.

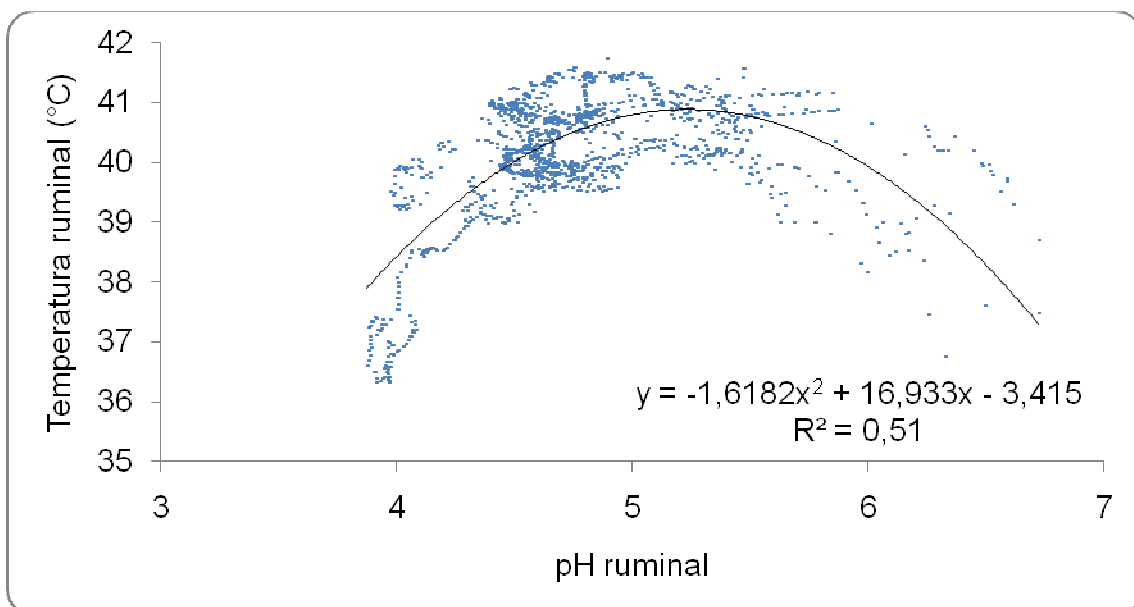


Gráfico 20 - Relação entre pH e temperatura ruminal dos ovinos durante o experimento – São Paulo – 2011

### 5.5.5 Relação entre déficit de volume plasmático e Osmolaridade ruminal

O gráfico 21 apresenta a correlação entre pH e a concentração de lactato-L do conteúdo ruminal nos ovinos. Para esta análise foram considerados todos os dados disponíveis das duas variáveis sem distinção de grupo ou momento experimental.

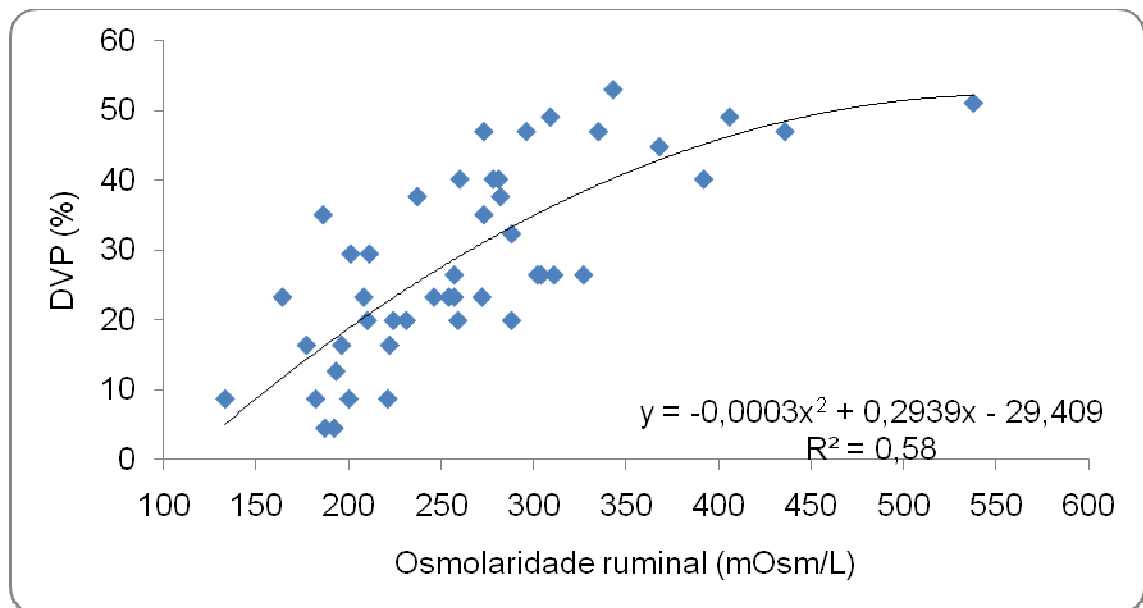


Gráfico 21 - Relação entre osmolaridade ruminal e déficit de volume plasmático dos ovinos no decorrer do experimento – São Paulo – 2011

### 5.5.6 Relação entre Déficit de Volume Plasmático e Frequência Cardíaca

O gráfico 22 apresenta a correlação entre pH e a concentração de lactato-L do conteúdo ruminal nos ovinos. Para esta análise foram considerados todos os dados disponíveis das duas variáveis sem distinção de grupo ou momento experimental.

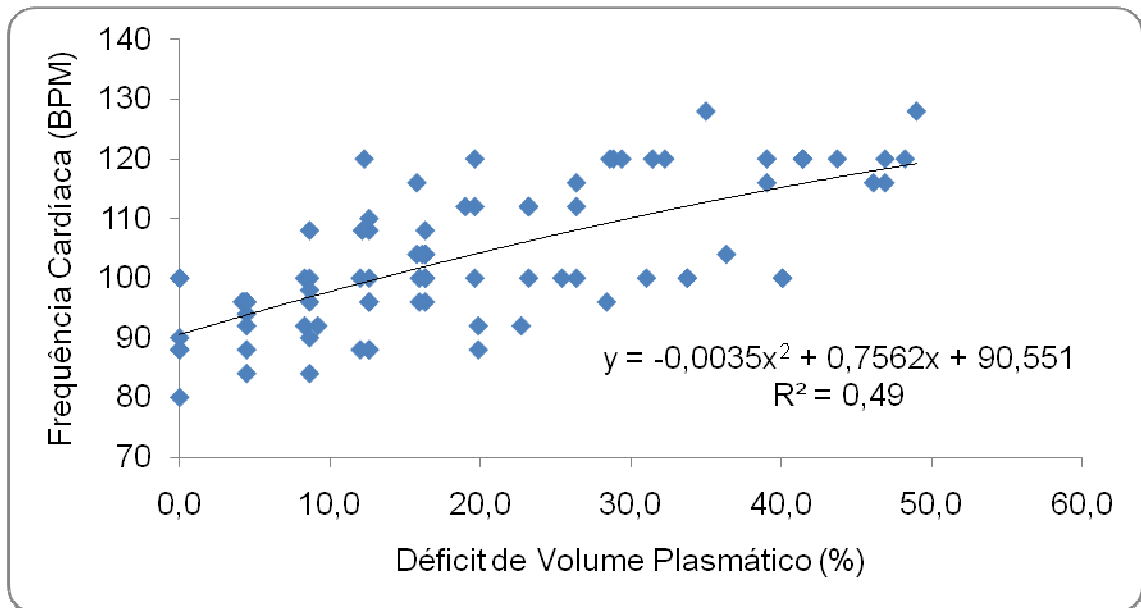


Gráfico 22 - Relação entre déficit de volume plasmático e frequência cardíaca dos ovinos durante os experimentos – São Paulo – 2011

### 5.5.7 Relação entre Déficit de Volume Plasmático e Osmolaridade sérica

O gráfico 23 apresenta a correlação entre o déficit de volume plasmático e osmolaridade sérica dos ovinos dos diferentes grupos experimentais no decorrer do estudo.

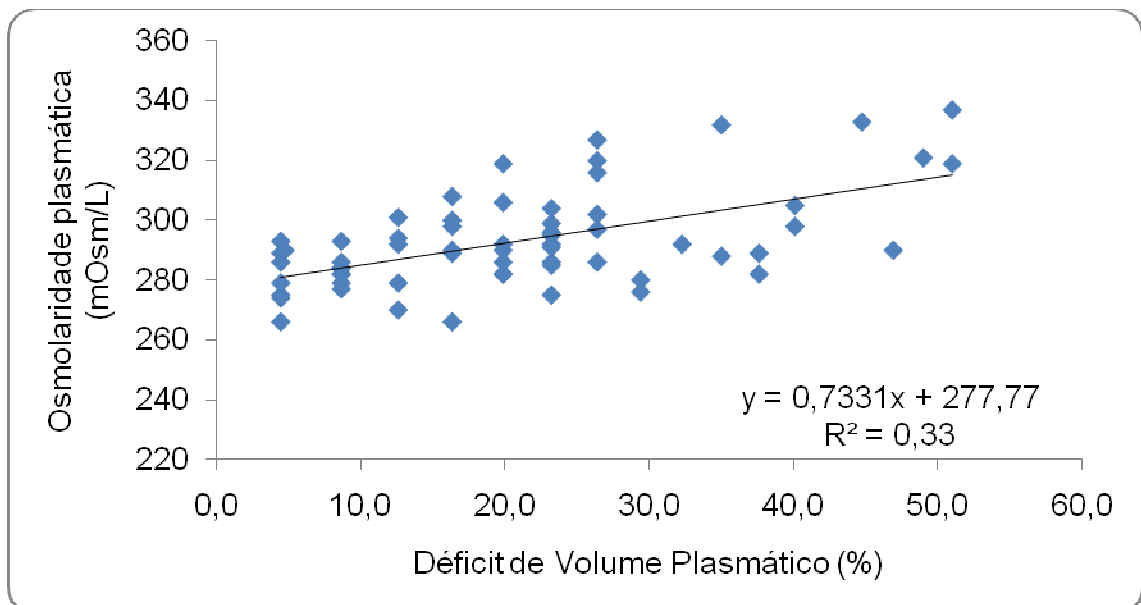


Gráfico 23 - Relação entre déficit de volume plasmático e osmolaridade sérica dos ovinos durante o experimento – São Paulo – 2011

### 5.5.8 Relação entre lactato-L plasmático e concentração de glicose plasmática

O gráfico 25 apresenta a correlação entre pH e a concentração de lactato-L do conteúdo ruminal nos ovinos. Para esta análise foram considerados todos os dados disponíveis das duas variáveis sem distinção de grupo ou momento experimental.

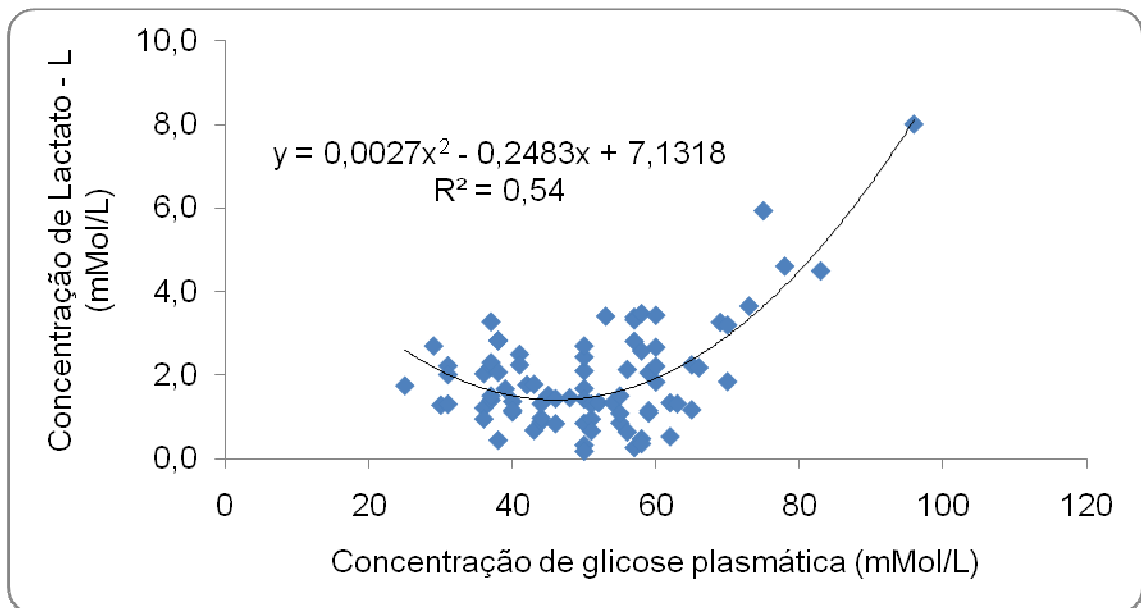


Gráfico 25- Relação entre lactato-L plasmático e concentração de glicose plasmática dos ovinos durante o experimento – São Paulo – 2011



## 6. DISCUSSÃO

A metodologia adotada no presente trabalho (KEZAR e CHURCH, 1979), logrou êxito em sua intenção de induzir acidose láctica ruminal aguda nos ovinos, atingindo valores tão significativos como pH médio 4,25 ,no momento 24 horas no grupo controle. Esse supracitado pH denota uma acidose de grau severo (RADOSTITS et al., 2007). Os resultados intragrupo do grupo controle sugerem que a quantidade de substrato permitiu uma contínua fermentação da sacarose até a 24<sup>a</sup> h (Tab. 1). Ficou claro que, excetuando os horários da 6<sup>a</sup> h e 12<sup>a</sup> h, o abaixamento do pH ruminal foi altamente determinado pelo acúmulo da concentração de ácido láctico no rúmen (Gráfico 17).

Ficou patente, avaliando o pH ruminal, que a monensina interferiu positivamente na 12<sup>a</sup> h não permitindo uma queda drástica do pH, não apenas por uma tendência ( $P > 0,077$ ) na diminuição da produção do lactato L (Tabela 3), assim como pela menor geração de ácidos graxos voláteis de cadeia curta, visto que a monensina modula de alguma forma a função das bactérias lactilíticas, como em especial atenção às produtoras de AGVCC (NAGARAJA et al. 1982). Nesse momento o probiótico parece ter efeito intermediário, agindo de certa forma na estimulação de atividade das bactérias lactilíticas, mas com muito menor ação nas produtoras de AGVCC (PANCHAL et al., 1984).

Na 24<sup>a</sup> h , quando a concentração de ácidos atingiu seu ápice, o probiótico promoveu indiretamente uma tendência ( $P > 0,092$ ) para que o pH ruminal fosse maior advindo de uma significativa redução na produção de ácido láctico L ( $P < 0,023$ ), e quiçá do isômero D, pois Maruta (2000) não encontrou diferença na produção ruminal destes dois isômeros em bovinos com ALRA. Provavelmente, este efeito ocorreu por competição das leveduras do probiótico com as bactérias fermentadoras que tem como produto final o ácido láctico, em especial o *Lactobacillus sp.* (HUNGATE, 1966). Efeito muito maior do probiótico foi verificado após as 24 h, até a 48<sup>a</sup> h, durante a recuperação da acidose ruminal. Nesse período a diminuição nas concentrações de ácido láctico L acumulado no rúmen foi marcante no grupo probiótico (Tab 3;  $P < 0,003$ ). Segundo Martin (1991) e Callaway e Martin (1997) as leveduras do utilizado probiótico têm uma ação positiva e sinérgica sobre as bactérias lactilíticas. Essa influência parece ter sido maior após o T18 quando o pH ruminal médio atingiu o valor de 4,5 , exatamente o ideal para a multiplicação

dessas leveduras no ambiente (LUND, 1974). Essa drástica redução na concentração de ácido láctico L e elevação do pH ruminal indicam que o uso desse probiótico é altamente recomendável para o tratamento de ALRA, em especial no combate da acidose ruminal. Como o *Saccharomyces cerevisiae* é bastante lábil e tem vida curta dentro do rúmen recomenda-se que o mesmo seja empregado quando do diagnóstico de ALRA como tratamento auxiliar.

Esperava-se que a monensina pudesse ter tal efeito terapêutico, porém animais tratados com este aditivo na 24<sup>a</sup> h tiveram diminuição dos teores de lactato L ruminal e elevação do pH ruminal semelhante ao grupo controle. Assim, os presentes resultado confirmam a ação da monensina como um aditivo preventivo da acidose ruminal, porém a mesma não tem ação curativa.

Isso provavelmente se deve ao fato de que apesar da monensina sódica reduzir a quantidade de bactérias produtoras de ácido láctico, a quantidade necessária de substrato fermentável capaz de induzir a acidose láctica ruminal aguda é elevada. A disponibilidade de substrato de crescimento faz com que algumas horas após a administração seja suficiente para equilibrar população de *Megasphaera elsdenii*, *Selenomonas ruminantium*, *Streptococcus bovis*, e *Lactobacillus sp* entre os grupos estudados.

Em um experimento realizado por Newbold e Wallace (1988) avaliando os efeitos *in vitro* da monensina sódica e de outro ionóforo, o tetronasin na cultura de *Megasphaera elsdenii*, *Selenomonas ruminantium*, *Streptococcus bovis*, and *Lactobacillus sp*. cepa LB17, foram encontrado valores mínimos de pH para o grupo controle de 4,56 e de 4,71 na cultura com 0,5 $\mu$ g e de 4,50 na cultura contendo 1 $\mu$ g de monensina. Neste experimento a população de praticamente todas as espécies produtoras de ácido láctico estudadas apresentaram aumento, similar durante as primeiras horas, vindo a apresentar concentração diminuída de *S. bovis* somente no tempo 12 horas no grupo monensina.

A temperatura ruminal é uma variável que até recentemente foi pouco considerada, principalmente pela dificuldade de obtenção de seus dados. Um recente trabalho sugere que a temperatura pode ser um parâmetro útil no auxílio ao diagnóstico da Acidose Ruminal por ácidos graxos voláteis (ARAGV) (subaguda) (Alzahal, Kebreab et al., 2008). Segundo estes autores nessa condição ruminal (pH inferior a 5,6 até 5,0) a temperatura ruminal se eleva além de 39,2<sup>o</sup> C atingindo até 41<sup>o</sup> C, numa correlação negativa com o pH ( $r = 0,87$ ) . No presente trabalho os

resultados foram mais abrangentes, pois além de ARAGV, também provocado ALRA, com pH inferior a 5,0. Até o momento, nenhum outro autor descreveu a temperatura na ALRA, daí a importância dessa dissertação.

Os presentes resultados da relação pH e temperatura ruminais demonstraram a existência de um comportamento quadrático (Gráfico 17). No auge da fermentação, quando o pH alcançou os valores médios ao redor de 4,9, a temperatura ruminal também obteve seu ápice (40,5° C) denotando a intrínseca relação entre estas variáveis. No T12 ovinos suplementados com monensina tiveram temperaturas médias mais baixas (Tab. 4;  $P < 0,019$ ) que as obtidas por animais controle, reforçando o conceito que este aditivo diminuí neste momento a fermentação ruminal, como verificado pela análise do pH (Tab. 1).

Por outro lado, nos valores muito baixos de pH, em especial na 24<sup>a</sup> h, foram encontrados também grande queda na temperatura ruminal (Gráfico. 20). Provavelmente, isso ocorreu porque o substrato infundido, a sacarose, já tenha sido inteiramente consumido alterando a flora e a fauna normais e gerando uma inatividade ruminal, principalmente no grupo controle.

As temperaturas médias ruminais constatadas nos tempos 36 e 48 h do grupo controle ficaram aquém das dos grupos monensina e probiótico, indicando que ocorria provavelmente uma insuficiência bioquímica da flora ruminal no primeiro grupo.

Coincidentemente, foi realizada nesses dois últimos tempos a prova de redução do azul de metileno do suco de rúmen de amostras dos três grupos, não descrita *in totum* nesta dissertação. A prova de redução de azul de metileno é indicativa da atividade das bactérias redutoras de oxigênio e quanto mais rápida for o tempo de redução mais funcional estará a flora ruminal, sendo considerado o tempo de 3 min como adequado (ROSEMBERGER, 1983). Na acidose ruminal o tempo de redução estará significativamente aumentado, pois ocorrerá acúmulo de oxigênio no ambiente e morte de boa parte das bactérias redutoras. Enquanto que nas amostras do grupo probiótico os tempos de redução nas 36<sup>a</sup> e 48<sup>a</sup> foram de 5 min. e menos de 3 min. respectivamente, no grupo monensina estes resultados foram 30 min. e 10 min., enquanto que no grupo controle ausência de redução em 60 min e tempo de reação de 20 min., respectivamente.

Esses resultados de redução de azul de metileno somados com os da temperatura ruminal indicam que o probiótico favoreceu a recuperação da flora

ruminal de várias formas, pois o *S. cerevisiae* tem em sua atividade bioquímica grande consumo de oxigênio, favorecendo a recuperação do status normal do ambiente ruminal, em especial no concernente da anaerobiose ruminal, permitindo em concomitância a rápida recuperação das colônias de bactérias redutoras, consumidoras de ácido láctico e quiçá de outros grupos de microorganismos usualmente encontrados em animais hígidos.

Essa melhora do ambiente ruminal provavelmente tenha favorecido o apetite dos animais, visto que nenhum animal do grupo probiótico apresentou marcante hiporexia, quadro este exibido em 50% dos animais do grupo controle e 33 % do grupo monensina (Quadro 2).

Como era de se esperar, a concentração de lactato L ruminal interferiu de maneira significativa na osmolaridade ruminal (Gráfico 18;  $R^2 = 0,53$ ). Mesmo assim, o ápice dos valores de osmolaridade foi obtido no tempo T6 quando a produção de ácidos graxos voláteis de cadeia curta era alta e provavelmente a sacarose infundida também auxiliava no incremento da osmolaridade (Tabela 5) (DUNLOP, 1972). É digno de nota que no tempo T6 a monensina provocou, em relação ao grupo controle, uma diminuição na osmolaridade ( $P < 0,018$ ) sugerindo que este aditivo interferiu na produção de ácidos graxos voláteis de cadeia curta (Tabela 5), mas não no ácido láctico L (Tabela 3). Chamou a atenção que em vários momentos (T0; T24; T 36 e T48) a osmolaridade do grupo probiótico foi inferior ao grupo controle, chamando a atenção o baixo valor basal gerado nos suplementados com o probiótico. O exato motivo dessa diferença não é conhecido e maiores estudos são necessários para entender esses resultados.

O presente trabalho também foi feliz em comparar pela primeira vez no Brasil o pH ruminal obtido por aferição contínua por telemetria e por pHmetro de bancada (Tabela 2 e gráfico 3), e em ordem internacional em ovinos acometido com exclusivamente com ALRA. Semelhante a outros resultados internacionais os resultados globais de pH, nas diferentes faixas de pH, foram sempre superiores no pH de bancada em relação a telemetria (MACLEOD, 1983; ENEMARK, et al., 2003; DUFFIELD et al., 2004). A explicação para essa diferença é que enquanto o aparelho de telemetria permanece no fundo do saco ventral do rúmen o conteúdo de rúmen obtido para a determinação por pHmetro de bancada, por mais cuidado que se tenha sempre é contaminado por suco ruminal de áreas mais dorsais do rúmen e nessa área o pH é sabidamente mais alcalino que nos segmentos ventrais

(GARRETT et al., 1999). Outro fator que pode ter influenciado é que durante a coleta de material e a mensuração do pH por bancada ocorre perda inevitável de  $\text{CO}_2$  e de ácidos graxos voláteis de cadeia curta, conferindo ao conteúdo um pH ligeiramente mais alcalino (GARRETT et al., 1999).

Contudo, quando são comparadas as médias de pH em condições normais ( $> 5,6$ ), em pH compatível com acidose ruminal por ácidos graxos voláteis de cadeia curta (ARAGVCC) ( $5,0 - 5,6$ ) e em acidose marcante verificada na ALRA ( $< 5,0$ ), constatou-se uma diferença numérica maior entre as médias ( $0,6 \times 0,22$  e  $0,20$ ) e um grau de significância menor ( $P < 0,047 \times 0,002$  e  $0,001$ ) no ARAGVCC em comparação com outras bandas de pH (Tabela 2). Embora a diferença continue significativa nessa faixa intermediária deve-se tomar todo o cuidado possível na determinação do pH de bancada para que a diferença entre as medidas não seja alargada. Nessa faixa de pH a concentração de ácidos graxos voláteis de cadeia curta é muito maior, que na ALRA e em condições normais, o que facilitaria em tese a volatilização e conseqüente alcalinização da amostra. Na ALRA o ácido preponderante é o láctico que não é volátil tornando o pH da amostra aparentemente mais estável.

Todos os animais no decorrer do experimento exibiram aumentos nos valores de déficit do volume plasmático (Tabela 6). Alguns deles, do grupo controle e da monensina, ultrapassaram a porcentagem de 40 % exibindo também quadros de desidratação mais pronunciados, caracterizados por enoftalmia e perda marcante da elasticidade da pele (Quadro2) (RADOSTITS et al., 2007).

Mais uma vez ficou patente que animais que receberam probiótico apresentaram de alguma forma um quadro clínico mais brando de acidose, neste caso caracterizado pelo menor grau de desidratação. O presente experimento demonstrou claramente que existiu uma relação direta entre a osmolaridade ruminal e o déficit de volume plasmático (Gráfico 21;  $R^2 = 0,58$ ). A desidratação causada na acidose ruminal é proveniente do aumento pronunciado da osmolaridade ruminal em relação à sanguínea, a qual leva a passagem de fluidos para o rúmen (ORTOLANI et al., 2010). Como nos momentos estudados, nessa supracitada relação, o principal causador do aumento da osmolaridade foi o ácido láctico e este ácido se apresentou em menor concentração nos animais que receberam probiótico na 24<sup>a</sup> h e nas horas posteriores (Tabela 3) pode-se concluir que existiu um efeito benéfico do uso do probiótico. Deve-se ressaltar que mesmo com o tratamento com infusão de fluidos

na 24<sup>a</sup> h os animais parecem não se recuperar até a 48<sup>a</sup> h, provavelmente porque permaneceram ainda nos grupos controle e monensina teores consideráveis de ácido láctico no interior do rúmen (Tabela 3).

O grau de desidratação, aqui avaliada pelo déficit de volume plasmático, influenciou positivamente o número de batimentos cardíacos (Gráfico 22,  $R^2=0,49$ ), variável esta que na 36<sup>a</sup> hora foi inferior nos animais que receberam probiótico (Tabela 14). Em trabalho anterior também foi constatada essa relação positiva entre o déficit de volume plasmático e frequência cardíaca em bovinos com ALRA (ORTOLANI et al., 2010). O aumento da frequência cardíaca (Tabela 13) pode ser interpretado como uma resposta compensatória sistêmica à hipovolemia, a qual leva a uma diminuição da pressão arterial que por sua vez produz uma taquicardia sinusal (ORTOLANI et al., 2010).

A ALRA provocou na maioria dos animais uma acidose sistêmica de grau moderado a médio, com exceção de um ovino do grupo controle que na 24<sup>a</sup> hora apresentou pH sanguíneo 7,07 (Tabela 7) considerado severo. O mesmo ocorreu com os teores de excesso de ácido-base (Tabela 8) e de bicarbonato (Tabela 9). Mesmo assim, após o tratamento com tampão corretivo a base de bicarbonato de sódio a acidose sistêmica ficou parcialmente corrigida nos grupos controle e monensina na 36<sup>a</sup> h, tendendo a voltar às condições basais nos animais, sugerindo que a permanência de quantidade residual de ácido láctico ruminal (Tabela 3) de alguma forma interferia na perfeita correção do pH sistêmico. Chama a atenção que os animais que receberam probiótico tiveram maiores valores de bicarbonato e de excesso de ácido-base a partir da 24<sup>a</sup> hora até a 36<sup>a</sup> hora, coincidentemente quando os teores de ácido láctico L ruminais eram menores neste grupo (Tabela 3).

Do ponto de vista clínico é importante frisar que o animal que morreu ou aqueles que manifestavam depressões no estado geral (Quadro 2) eram marcados pelo quadro de desidratação e não pela acidose sistêmica. O animal supracitado que teve o pH sanguíneo mais baixo (7,07) se recuperou de forma satisfatória, porém os animais mais afetados tiveram na sua totalidade déficit de volume plasmático superior a 40 % e teores de ácido láctico ruminal mais altos após a 24<sup>a</sup> h, porém o pH sanguíneo próximos da normalidade. Nos ovinos mais acometidos pela depressão foram determinados os teores séricos de uréia e creatinina, os quais se encontravam invariavelmente elevados (3,2- 4,7 mMol/L).

Todos os três animais (Quadro 2) que exibiram diarreia não tiveram quadros de desidratação muito desenvolvidos. Estudo perpetrado por Maruta; Ortolani (2002) com bovinos com ALRA também concluiu o mesmo achado. Enquanto que no presente trabalho apenas 16 % dos ovinos apresentaram diarreia modelo parecido de indução em bovinos provocou este sintomas em 100% dos animais (ORTOLANI et al., 2010). A laminite foi verificada em quatro casos (22,2%) dos 18 casos de acidose ruminal, num animal controle e outros três suplementados com monensina, de 18 ovinos que tiveram acidose ruminal. Segundo NOCEK (1997), a acidose ruminal pode provocar a geração de endotoxinas ruminais provenientes de morte bacteriana, as quais absorvidas podem gerar quadro inflamatório asséptico na lâmina sensitiva e coriônica em alguns animais com ALRA.

Existiu uma tendência ( $P > 0,064$ ) que ocorresse aumento nos teores de lactato L plasmático nos ovinos do grupo controle (Tabela 10). Certamente, a origem deste lactato plasmático foi proveniente desta substância gerada no rúmen, pois o coeficiente de determinação entre estas variáveis foi 0,77 (Gráfico 19). Esse lactato L ruminal gerou algum aumento na concentração de glicose sanguínea em especial no grupo controle (Tabela 12), pois existiu uma relação quadrática ( $R^2 = 0,54$ ) entre estas duas variáveis (Gráfico 25).

O movimento ruminal, como era de se esperar diminuiu no decorrer da indução (Tabela 16). Segundo, HUBER (1976) a parada ruminal é uma defesa do animal, pois quando maior for a motilidade ruminal maior será a absorção de ácido láctico ruminal, em especial o isômero D (MARUTA; ORTOLANI, 2002). Curiosamente, no T18 ovinos que ingeriram probiótico tiveram maior movimento ruminal que os outros demais grupos, porém esse fato não gerou conseqüências clínicas maiores nos animais do primeiro grupo.

## 7. CONCLUSÕES

O uso de probiótico proporcionou a partir da 18<sup>a</sup> h de indução a ocorrência de um quadro de ALRA mais brando, por promover um menor acúmulo de ácido láctico no rúmen, com conseqüente diminuição do pH e da osmolaridade ruminais, e de acarretar um menor grau de desidratação e de acidose sistêmica. Essas constatações indicam que o probiótico pode ser utilizado com vantagens no tratamento de ovinos com ALRA.

O uso de monensina aliviou pontualmente, na altura da 12<sup>a</sup> hora da indução, a acidose ruminal por uma redução na velocidade de queda do pH ruminal, mas não impediu que esse quadro ocorresse e que evitasse o surgimento de complicações clínicas decorrentes da ALRA.

O pH ruminal mensurado continuamente pelo sistema de aquisição de dados por telemetria produziu significativamente valores mais baixos que os determinados com pHmetro de bancada, tanto em condições normais com em situações de acidose ruminal por ácidos graxos voláteis de cadeia curta, como por ALRA.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, J. A. B. et al. Metabolismo oxidativo dos neutrófilos de ovinos tratados com monensina sódica e experimentalmente submetidos à acidose ruminal. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, p. 129-134, 2002.

AIUMLAMAI, S. et al. The role of endotoxins in induced ruminal acidosis in calves. **Acta Vet Scand**, v. 33, n. 2, p. 117-27, 1992.

ALLISON, M. J.; BUCKLIN, J. A.; DOUGHERTY, R. W. Ruminal Changes after Overfeeding with Wheat and the Effect of Intraruminal Inoculation on Adaptation to a Ration Containing Wheat. **Journal of Animal Science**, v. 23, n. 4, p. 1164-1171, 1964.

ALZAHAL, O.; RUSTUOMO, B.; ODONGO, N.E ; DUFFIELD, T.F.; MCBRIDE. B.W. Technical note: A system for continuous recording of ruminal pH in cattle. In: (Ed.). **Journal of Animal Science**. United States, v.85, p.213-7, 2007.

ANDERSEN, P. H.; HESSELHOLT, M.; JARLOV, N. Endotoxin and arachidonic acid metabolites in portal, hepatic and arterial blood of cattle with acute ruminal acidosis. **Acta Vet Scand**, v. 35, n. 3, p. 223-34, 1994.

ANUALPEC. **Anuário Da Pecuária Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Agroinformativos, 2005, 400p.

ARORA, R. G.; ANDERSON, L.; BUCHT, R. S.; FRANK, A.; KRONEVI, T. Chronic copper toxicosis in sheep. **Nordisk Veterinaer Medicin**, v. 29, n. 4-5, p. 181-187, 1977.

ASANUMA, N.; HINO, T. Regulation of fermentation in a ruminal bacterium, *Streptococcus bovis*, with special reference to rumen acidosis. **Animal Science Journal**, v. 73, n. 5, p. 313-325, 2002.

BACH, A.; IGLESIAS, C.; DEVANT, M. Daily rumen pH pattern of loose-housed dairy cattle as affected by feeding pattern and live yeast supplementation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 136, n. 1-2, p. 146-153, 2007.

BARAN, M.; BOĎA, K.; SIROKA, P. The effect of monensin on rumen fermentation in sheep fed on all-roughage and barley/roughage diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 15, n. 1, p. 7-12, 1986.

BORGES, L.F.O.; **Efeitos da enramicina ou da monensina sódica sobre a fermentação ruminal e a digestão total em bovinos.** Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo. Dissertação (Mestrado). Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga – São Paulo, 2006.

BEAUCHEMIN, K. A.; YANG, W. Z. Effects of physically effective fiber on intake, chewing activity, and ruminal acidosis for dairy cows fed diets based on corn silage. **Journal of Dairy Science**, United States, v. 88, n. 6, p. 2117-29, 2005.

BEAUCHEMIN, K. A.; YANG, W. Z.; RODE, L. M. Effects of particle size of alfalfa-based dairy cow diets on chewing activity, ruminal fermentation, and milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 2, p. 630-643, 2003.

BENTON, J. R. **Interaction Between Roughages and Corn Milling Byproducts in Finishing Cattle Diets.** 2010. 160 (Doctor of Philosophy). Animal Science Department, University of Nebraska, Lincoln.

BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, v. 70, n. 2, p. 567-590, 1990.

BROSSARD, L. et al. Dose effect of live yeasts on rumen microbial communities and fermentations during butyric latent acidosis in sheep: new type of interaction. **Animal Science**, v. 82, n. 06, p. 829-836, 2006.

CALLAWAY, E. S.; MARTIN, S. A. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. **J Dairy Sci**, United States, v. 80, n. 9, p. 2035-44, 1997.

CARTER, R. R.; GROVUM, W. L. A review of the physiological significance of hypertonic body fluids on feed intake and ruminal function: salivation, motility and microbes. **J Anim Sci**, v. 68, n. 9, p. 2811-32, Sep 1990.

CARVALHO, C. A. B. D. et al. Carboidratos não estruturais e acúmulo de forragem em pastagens de *Cynodon* spp. sob lotação contínua. **Scientia Agricola**, v. 58, p. 667-674, 2001.

CHIQUETTE, J. Evaluation of the protective effect of probiotics fed to dairy cows during a subacute ruminal acidosis challenge. **Animal Feed Science and Technology**, v. 153, n. 3-4, p. 278-291, 2009.

CZERKAWSKI, J. W. **An introduction to rumen studies**. Oxford: Pergamon, 1986. x,236p.

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

DE VETH, M. J.; KOLVER, E. S. Digestion of ryegrass pasture in response to change in pH in continuous culture. **J Dairy Sci**, United States, v. 84, n. 6, p. 1449-57, 2001.

DIJKSTRA, J.; J.M., F.; FRANCE, J. **Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism (Cabi)**. CABI, 2005. 736p

DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H. D.; STÖBER, M. **Medicina Interna y Cirugia del Bovino**. 4. Buenos Aires: Intermédica, 2005. 632p

DIRKSEN, G.; SMITH, M. C. Acquisition and analysis of bovine rumen fluid. **The Bovine practitioner**, Beltsville, v. 22, p. 8, 1987.

DUCKETT, S. K. et al. Effects of time on feed on beef nutrient composition. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 8, p. 2079-2088, 1993.

DUFFIELD, T. et al. Comparison of techniques for measurement of rumen pH in lactating dairy cows. **J Dairy Sci**, United States, v. 87, n. 1, p. 59-66, 2004.

DUKES, H. H.; SWENSON, M. J. **Dukes Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1988. ISBN 8527700956 9788527700955.

DUNLOP, R. H. Pathogenesis of ruminant lactic acidosis. **Adv Vet Sci Comp Med**, v. 16, p. 259-302, 1972.

ENEMARK, J. M. D.; PETERS, G.; JØRGENSEN, R. J. Continuous Monitoring of Rumen pH – A Case Study With Cattle. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 50, n. 2, p. 62-66, 2003.

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

EWASCHUK, J. B.; NAYLOR, J. M.; ZELLO, G. A. D-Lactate in Human and Ruminant Metabolism. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 7, p. 1619-1625, 2005.

FARNWORTH, E. R. **Handbook of fermented functional foods**. Taylor and Francis, 2008.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R. D.; SILVA, F. D. C. D. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, v. 32, p. 623-638, 2009.

FLINT, H. J. The rumen microbial ecosystem--some recent developments. **Trends in Microbiology**, v. 5, n. 12, p. 483-488, 1997.

FRANCIS, T. A. **Handbook of Chemistry and Physics**. RATON, C. P. B. Internet Version: CRC Press Boca Raton 2011.

FRANCO, M. Alto grão x alto volumoso. **Revista DBO**. (Matéria de capa) n.308, ano 25, p.54–58, 2006.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J Appl Bacteriol**, v. 66, n. 5, p. 365-78, May 1989.

GALYEAN, M. L.; ENG, K. S. Application of research findings and summary of research needs: Bud Britton Memorial Symposium on Metabolic Disorders of Feedlot Cattle. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 1, p. 323-7, Jan 1998.

GARRETT, E. F. et al. Diagnostic Methods for the Detection of Subacute Ruminant Acidosis in Dairy Cows. **Journal of dairy science**, v. 82, n. 6, p. 1170-1178, 1999.

GEISHAUSER, T.; MANNHARDT, K. [Methods for the determination of pH value and redox potential in the rumen fluid of adult cattle]. **Tierarztl Prax**, v. 22, n. 5, p. 443-9, Oct 1994.

GILL, H. S.; SHU, Q.; LENG, R. A. Immunization with *Streptococcus bovis* protects against lactic acidosis in sheep. **Vaccine**, England, v. 18, n. 23, p. 2541-8, 2000.

HAMILTON-MILLER, J. M. T.; GIBSON, G. R.; BRUCK, W. Some insights into the derivation and early uses of the word 'probiotic'. **British Journal of Nutrition**, v. 90, p. 1, 2003.

HENDERSON, C. The Influence of Extracellular Hydrogen on the Metabolism of *Bacteroides ruminicola*, *Anaerovibrio lipolytica* and *Selenomonas ruminantium*. **Journal of General Microbiology**, v. 119, n. 2, p. 485-491, 1980.

HOFÍREK, B.; HAAS, D. Comparative Studies of Ruminal Fluid Collected by Stomach Tube or by Puncture of the Caudoventral Ruminal Sac. **Acta Veterinaria Brunensis**, Brno, v. 70, n. 1, p. 7, 2001.

HUBER, T. L. Physiological Effects of Acidosis on Feedlot Cattle. **Journal of Animal Science**, v. 43, n. 4, p. 902-909, 1976.

HUNGATE, R. E. Symposium: selected topics in microbial ecology. I. Microbial ecology of the rumen. **Bacteriol Rev**, v. 24, n. 4, p. 353-64, 1960.

HUNGATE, R.E. **The rumen and its microbes**. New York: Academic Press, 1966.

JANSSEN, P. H.; KIRS, M. Structure of the archaeal community of the rumen. **Appl Environ Microbiol**, v. 74, n. 12, p. 3619-25, Jun 2008.

JOHNSON, V. W.; SUTTON, J. D. The continuous recording of the pH in the bovine rumen. In: (Ed.). **British Journal of Nutrition**. England, v.22, p.303-6,.1968.

KEZAR, W. W.; CHURCH, D. C. Ruminal changes during the onset and recovery of induced lactic acidosis in sheep. **Journal of Animal Science**, v. 49, n. 5, p. 1161-7, 1979.

KOMAREK, R. J. Rumen and abomasal cannulation of sheep with specially designed cannulas and a cannula insertion instrument. **Journal of Animal Science**, v. 53, n. 3, p. 790-5, 1981.

KRAUSE, K. M.; OETZEL, G. R. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 126, n. 3, p. 215-236, 2006.

LEAL, M. L. R.; MARUTA, C. A.; ORTOLANI, E. L. Uso de bicarbonato e lactato-L para correção da acidose metabólica sistêmica em bovinos com acidose láctica ruminal aguda. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 971-976, 2007

LISBÔA, J. A. N. et al. Tempo de viabilidade de amostras de sangue venoso bovino destinadas ao exame hemogasométrico, quando mantidas sob conservação em água gelada. **Ciência Rural**, v. 31, p. 271-276, 2001

LONES, T. E. **Aristotle's researches in natural science**. London, : West, Newman & co., 1912. viii, 274 p.

LUND, A. Yeasts and Moulds in the Bovine Rumen. **Journal of General Microbiology**, v. 81, n. 2, p. 453-462, 1974.

MAROUNE, M.; BARTOS, S. Interactions between rumen amylolytic and lactate-utilizing bacteria in growth on starch. **Journal of Applied Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 233-238, 1987

MARUTA, C. A. **Comparação da susceptibilidade de bovinos das raças Jersey e Gir à acidose láctica ruminal, induzida experimentalmente com sacarose**. 2000. 120 (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MARUTA, C. A.; ORTOLANI, E. L. SUSCEPTIBILIDADE DE BOVINOS DAS RAÇAS JERSEY E GIR À ACIDOSE LÁCTICA RUMINAL: I - VARIÁVEIS RUMINAIS E FECAIS. **Ciência Rural**, v. 32, p. 55-59, 2002

MARTHUR, J. M.; MILTIMORE, J. E. CONTINUOUS RECORDING OF THE IN VIVO RUMEN pH IN FISTULATED CATTLE. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 48, n. 2, p. 237-240, 1968/06/01 1968

MCNULTY, N. P. et al. The Impact of a Consortium of Fermented Milk Strains on the Gut Microbiome of Gnotobiotic Mice and Monozygotic Twins. **Science Translational Medicine**, v. 3, n. 106, p. 106, 2011.

MEDEL, P.; CARRASCO, C.; GARRIDO, S.. Actualización en aditivos y modificadores del metabolismo. Normativas y restricciones de uso en la Unión Europea, **I Congreso Argentino de Nutrición Animal**. 2007 Buenos Aires

MUIR, L. A.; BARRETTO, A. Sensitivity of Streptococcus Bovis to Various Antibiotics. **Journal of Animal Science**, v. 48, n. 3, p. 468-473, 1979

MUIR, L. A. L.A.; RICKES,E.L.; DUQUETTE, P.F.; SMITH, G.E.. Prevention of induced lactic acidosis in cattle by thiopeptin. **Journal of Animal Science**, v. 52, n. 3, p. 635-43, Mar 1981

MUZZI, L. A. L.; MUZZI, R. A. L.; GABELLINI, E. L. A. Técnica de fistulação e canulação do rúmen em bovinos e ovinos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 2059-2064, 2009.

NAGARAJA, T. G.; AVERY T.B.; BARTLEY E.E.; ROOF S.K.; DAYTON A.D., Effect of lasalocid, monensin or thiopeptin on lactic acidosis in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 54, n. 3, p. 649-58, 1982.

NAGARAJA, T.G. . Effect of ionophore antibiotics on experimentally induced lactic acidosis in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 12, p. 2444-52, Dec 1985

NAGARAJA, T. G.; CHENGAPPA, M. M. Liver abscesses in feedlot cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 1, p. 287-298, 1998.

NAGARAJA, T. G.; LECHTENBERG, K. F. Acidosis in feedlot cattle. In: (Ed.). **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice** . United States, v.23,. p.333-50, 2007

NAGARAJA, T. G.; TAYLOR, M. B. Susceptibility and resistance of ruminal bacteria to antimicrobial feed additives. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 7, p. 1620-5, Jul 1987.



NAGARAJA, T. G.; TITGEMEYER, E. C. Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. In: (Ed.). **Journal of Dairy Science**. United States, v.90 Suppl 1, p.E17-38. 2007.

NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J. Effects of the ionophores monensin and tetronasin on simulated development of ruminal lactic acidosis in vitro. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 12, p. 2981-5, 1988

NISBET, D. J.; MARTIN, S. A. Factors affecting L-lactate utilization by *Selenomonas ruminantium*. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 5, p. 1355-1361, 1994.

NOCEK, J. E. Bovine acidosis: implications on laminitis. **Journal of Dairy Science**, United States, v. 80, n. 5, p. 1005-28, 1997

OBA, M.; WERTZ-LUTZ, A. E. RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM: Acidosis: New insights into the persistent problem. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 4, p. 1090-1091, 2011

OLDHAM, J.D. **The rumen microbial ecosystem**. Edited by P. N. Hobson. Elsevier Applied Science, London, 1988. 527 pp.

ORTOLANI, E. L. Induction of lactic acidosis in cattle with sucrose: relationship between dose, rumen fluid pH and animal size. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 37, n. 5, p. 462-4, 1995.

OWENS, F. N. et al. Acidosis in cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 1, p. 275-286, 1998

PHILLIPSON, A. T.; MCANALLY, R. A. Studies on the Fate of Carbohydrates in the Rumen of the Sheep. **Journal of Experimental Biology**, v. 19, n. 2, p. 199-214, 1942.

PRESSMAN, B. C.; FAHIM, M. PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY OF THE MONO-VALENT CARBOXYLIC IONOPHORES. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 22, p. 465-490, 1982.

PULINA, G. **Dairy Sheep Nutrition**. 1. Oxfordshire: CABI, 2005. 240p

RADOSTITS, O. M. et al. **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats, and horses**. London: Elsevier Health Sciences, 2007

REINHARDT, C. D. et al. Effect of steam-flaked sorghum grain density on performance, milk production rate, and subacute acidosis in feedlot steers. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 11, p. 2852-2857, 1997.

RICKE, S. C.; MARTIN, S. A.; NISBET, D. J. Ecology, metabolism, and genetics of ruminal selenomonads. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 27-56, 1996.

RODRIGUES, F. A. M. L. **Tratamento adicional da acidose láctica ruminal aguda em bovinos por meio de infusão de solução salina hipertônica (7,2%)**. 2009. 118 Dissertação (Master). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ROSEMBERGER, G. **Exame Clínico dos Bovinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. 429p.

RUSSELL, J. B. Intracellular pH of acid-tolerant ruminal bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 11, p. 3383-4, Nov 1991.

RUSSELL, J. R.; HINO, T. Regulation of lactate production in *Streptococcus bovis*: A spiraling effect that contributes to rumen acidosis. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 7, p. 1712-21, 1985.

SCHILCHER, B.; BAUMGARTNER, K.; LIESEGANG, A. Investigations on rumen and claw health of different wild ruminants related to subacute ruminal acidosis.,

International Conference on Diseases of Zoo and Wild Animals, 2010. Madrid. 275: **Proceedings of the International Conference on Diseases of Zoo and Wild Animals.**

SHU, Q. et al. Immunisation against lactic acidosis in cattle. **Research in Veterinary Science**, England, v. 67, n. 1, p. 65-71, 1999.

SLYTER, L. L. Influence of Acidosis on Rumen function. **Journal of Animal Science**, v. 43, n. 4, p. 910-929, October 1, 1976

SLYTER, L. L.; RUMSEY, T. S. Effect of coliform bacteria, feed deprivation, and pH on ruminal D-lactic acid production by steer or continuous-culture microbial populations changed from forage to concentrates. **Journal of Animal Science**, v. 69, n. 7, p. 3055-3066, 1991.

SMITH, P. H.; HUNGATE, R. E. Isolation and characterization of *Methanobacterium ruminantium* n. sp. **Journal of Bacteriology** v. 75, n. 6, p. 713-8, Jun 1958.

SOLARI, S.; BAKER, R. J. Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. **Journal of Mammalogy**, v. 88, n. 3, p. 824-830, 2007/06/01 2007.

SONG, H.; LEE, S. Y. Production of succinic acid by bacterial fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 3, p. 352-361, 2006.

SUCUPIRA, M. C. A.; ORTOLANI, E. L. Uso de sangue arterial e venoso no exame do equilíbrio ácido-básico de novilhos normais ou com acidose metabólica. **Ciência Rural**, v. 33, p. 863-868, 2003.

SUN, Y. Z.; MAO, S. Y.; ZHU, W. Y. Rumen chemical and bacterial changes during stepwise adaptation to a high-concentrate diet in goats. **Animal**, v. 4, n. 02, p. 210-217, 2010.

TEIXEIRA, M. A. V.; CIACCO, C.F; TAVARES, D.Q; BONEZZI, A.N.,. OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DO AMIDO RESISTENTE EM AMIDOS DE MILHO E DE BANANA. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, p. 246-246, 1998

UHART, B. A.; CARROLL, F. D. Acidosis in Beef Steers. **Journal of Animal Science**, v. 26, n. 5, p. 1195-1198, 1967.

UNDERWOOD, W. J. Rumen lactic acidosis. II. Clinical signs, diagnosis, treatment, and prevention. **Compendium on continuing education for the practicing veterinarian.**, v. v. 14, n. 9, p. 5, 1992. ISSN 0193-1903.

VASCONCELOS, J. T.; GALYEAN, M. L. ASAS Centennial Paper: Contributions in the Journal of Animal Science to understanding cattle metabolic and digestive disorders. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 7, p. 1711-1721, 2008.

VECHIATO, T. D. A. D. F. **Estudo retrospectivo e prospectivo da presença de abscessos hepáticos em bovinos abatidos em um frigorífico paulista**. 2009. 102 (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

YANG, W. Z. et al. Effects of direct-fed microbial supplementation on ruminal acidosis, digestibility, and bacterial protein synthesis in continuous culture. **Animal Feed Science and Technology**, v. 114, n. 1-4, p. 179-193, 2004.

ØRSKOV, E. R. Starch Digestion and Utilization in Ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 63, n. 5, p. 1624-1633, 1986.