NATALIA SATO MINAMI

**Avaliações clínica e comportamental de bovinos com acidose
ruminal experimental por ácidos graxos de cadeia curta**

São Paulo

2018

NATALIA SATO MINAMI

**Avaliações clínica e comportamental de bovinos com acidose
ruminal experimental por ácidos graxos de cadeia curta**

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

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani

São Paulo

2018

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'Apice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3649
FMVZ

Minami, Natalia Sato
Avaliações clínica e comportamental de bovinos com acidose ruminal experimental
por ácidos graxos de cadeia curta / Natalia Sato Minami. – 2018.
118 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani.

1. Subaguda. 2. Comportamento. 3. Polpa cítrica. 4. Ingestão de alimento. 5. Indução. I.
Título.

São Paulo, 06 de dezembro de 2017
CEUA N 5774270116

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Enrico Lippi Ortolani
Área: Clínica Médica Veterinária
Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani (orientador)

Título da proposta: "Comparação de diferentes aditivos na prevenção da acidose ruminal por ácidos graxos de cadeia curta em bovinos.".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** o Relatório Final (versão de 20/setembro/2017) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "1. Os objetivos propostos foram todos cumpridos? Resp: Sim Os resultados obtidos propiciaram a criação de novos projetos? Resp: Sim 2. O N amostral proposto inicialmente foi suficiente? Qual o N amostral total alocado? Resp: Sim 3. Houve perdas? se sim, quantas? Resp: Não 4. Ocorreu algum evento adverso durante a condução do estudo? Resp: Não 5. Resultados já apresentados em congresso? Resp: Será apresentado no Congresso Nacional de Buiatria o resumo: Comparação de alguns aditivos no controle da acidose ruminal por ácidos graxos voláteis induzida em bovinos de corte. 6. Resultados já publicados? Resp: Sim, na revista Acadêmica Ciência Animal: Comparação de alguns aditivos no controle da acidose ruminal por ácidos graxos voláteis induzida em bovinos de corte.".

Comentário da CEUA: "Aprovado".

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Profa. Dra. Claudia Madalena Cabrera Mori
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MINAMI, Natalia Sato

Título: **Avaliações clínica e comportamental de bovinos com acidose ruminal experimental por ácidos graxos de cadeia curta**

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: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha mãe Maria Sato Minami, por ser este exemplo de perseverança e humildade. Obrigada pela dedicação, carinho e amor.

À minha irmã Raquel Sato Minami, por toda a amizade, serenidade e paciência. Por apoiar minhas ideias e ser um exemplo para mim.

Ao meu pai Paulo Shiniti Minami que ilumina os meus caminhos e sei que está presente nesta minha trajetória, este sonho é nosso.

Aos meus tios: Claudemir, Márcia, Maria Elena e Mirian por auxiliarem em minha educação e por vibrarem com mais esta conquista.

Amo vocês incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

Esta é uma conquista que não se consegue sozinha. Sou grata à todas estas pessoas que de alguma forma ajudaram à concluir este mestrado e fizeram de mim, um ser humano melhor.

À **Deus**, por iluminar meus caminhos, perdoar minhas falhas e encher meu coração de muita fé.

Ao meu orientador **Enrico Lippi Ortolani**, pelos conselhos, incentivos e principalmente pela amizade que construímos neste tempo. Tenho orgulho em dizer que conheci e trabalhei com Enrico Ortolani e levarei seus ensinamentos para sempre. Obrigada pela paciência e momentos de descontração, encontrei muito mais do que um orientador e um mestre, encontrei aquele que comemorou comigo minhas conquistas, como se fossem as dele, o que enriqueceu ainda mais minha admiração e carinho.

À **Rejane dos Santos Sousa** de quem me orgulho pela dedicação e empenho em tudo o que ela se dispõem à fazer, agradeço pelos ensinamentos e amizade, pelo tempo que passamos juntas em Pirassununga, nos laboratórios fazendo análises e pelas histórias compartilhadas. Obrigada Rej!

Ao **Francisco Leonardo Costa de Oliveira** por toda a ajuda durante o experimento e por deixar os momentos de coleta mais descontraídos, pelas caronas e risadas. Dividimos da mesma agonia para entregar nossa dissertação e tese, muita pipoca de micro-ondas e pão de queijo da lanchonete valeram a pena, obrigada por tudo!

Ao **Mailson Rennan Borges Dias**, pela parceria e conversas dos mais diversos assuntos durante nossas observações de consumo, na sala ou durante o café na copa. Um caminho brilhante te espera!

À **Debora Aparecida Cassiano** por toda a ajuda durante o experimento em Pirassununga, pela companhia e sede pelo conhecimento. Uma estagiária diferenciada, você vai longe Dé, será uma excelente veterinária!

À **Carolina de Lara Shecaira**, nossos caminhos se encontraram no meio desta tormenta chamada pós-graduação. Choramos e rimos, sofremos e aprendemos que somos muito mais capazes do que podíamos imaginar. Conte comigo sempre miga. Aurrrr

Ao **Rodrigo Malzoni de Souza**, pelos momentos de alegrias que compartilhamos, não faltaram risadas e dificuldades superadas. Obrigada por tudo, desde as caronas até as situações mais inusitadas nos corredores da FMVZ. Bóra comer uma pizza no Xodó?

À **Camila Cecilia Martin**, que ao longe desses dois anos tornou-se uma grande amiga, para compartilhar momentos de alegrias e tristeza, frustrações e conquistas. Que seu caminho seja sempre iluminado, você vai longe Cá!

À **Aline de Jesus da Silva** por esta amizade que a cada dia ser fortalece e faz com que nossos dias na pós se tornem mais leves. Obrigada por topar minhas ideias e pela parceria nesses últimos meses que a escrita da dissertação me consumiu, conte comigo!

À **Clara Mori** pela ajuda nas análises laboratoriais na FMVZ-USP e também por participar das minhas confraternizações de aniversários ao longo destes dois anos.

As secretárias do departamento de clínica médica: **Adelaide F. J. Borges** e **Silvana Rossi Guedes**, por toda a ajuda durante esses anos.

À equipe técnica da pós-graduação: **Regina de Cássia Valbom**, **Carlos Alberto da Silva Vasconcelos**, **Renato Ferreira Celestino** e aos que não fazem mais parte desta equipe, mas me ajudaram muito durante esses meus dois anos: **Thais** e **Henrique**.

Aos queridos: **Antônio Celso Schmidt** (Schimitex), **Paulo** (Paulito), **João Vítor da Silva**, **Marciano Enais** e **Pedro** do Gado de Corte - USP/Pirassununga. Sem vocês eu não teria conseguido absolutamente...nada!! Meu muito obrigada, vocês fazem parte desta conquista. Saudades!

Aos amigos do CAEP - USP/Pirassununga: **Dr. Ubiraem, Rose, Rosilene, Erica, Paulão, João, Jo**, por toda ajuda e pela companhia nos meses morei em Pirassununga para realizar o experimento.

Aos colegas e sobreviventes da pós-graduação, agradeço a convivência e desejo muitos papers para vocês: **Aline Morgado, Bruna Stanigher, Bruno Toledo, Caroline Harumi, Camila Baccili, Camila Freitas, Cristina Torres, Daniela Tardón, Débora Carvalho, Deisiane Nobre, Edlen Medeiros, Eduardo Marques, Elisa Weiss, Fábio Teixeira, Fabio Sellera, Fernanda Chicharo, Gabriela Gravina, Gabriela Reis, Jéssyca Bellinazzi, Jean Ramos, José Ferronato, Joice Fülber, Juliana Bombardelli, Juliana Junqueira, Kamila Reis, Karen Nascimento, Karinne Ávila, Marcela Romanini, Mariane Franco, Mario Reyes, Natália Gaeta, Natália Sobreira, Pedro Müller, Priscilla do Nascimento, Rafael Françoso, Raquel Szinvelski, Rebecca Bastos e Ronaldo Gargano.**

Aos professores do departamento de clínica médica por todo suporte e aprendizado durante estes anos: **Alice Maria Melville Paiva Della Libera, Carla Bargi Belli, Carlos Eduardo Larsson, Fabio Celidonio Pogliani, Fernando José Benesi, Lilian Gregory, Márcia de Oliveira Sampaio Gomes, Maria Claudia Araripe Sucupira, Raquel Yvonne Arantes Baccarin e Viviani Gomes.**

Às funcionárias do HOVET e do departamento de clínica médica: **Dinha, Doralice, Dona Jo** (Dengosa), **Isaura, Kelly, Helena e Jô**. Obrigada pelas risadas e amizade, vou sentir saudades.

Aos queridos de Pirassununga: **Rafael Teixeira, Vicente Buarque, Lígia Mesquita, Nara Consolo, Camylla Pedrosa, Juliana Santos, Juliana Silva e Tiago Del Valle** por tornarem nossa estadia em Pira, um lugar mais leve, com muitas risadas e amizade.

Ao Dr. **Flávio Perna Júnior** do Laboratório de Nutrição de Ruminantes - USP por toda a paciência e ensino sobre a utilização dos bólus e software da Dascor e Prof. Dr. **Paulo Henrique Mazza Rodrigues** pelo empréstimo dos bólus.

Ao Prof. Dr. **Ives Cláudio da Silva Bueno** e **Priscila Sales Maldonado** do Laboratório de Fermentabilidade Ruminal - USP/Pirassununga pela colaboração nas análises dos ácidos graxos de cadeia curta, essencial para esta dissertação.

À família **Augusto** e **Manholer** pela parceria, aventuras e amor que nunca faltaram quando estive com vocês.

Aos amigos de longa data que Botucatu trouxe e permaneceram durante esta caminhada: **Jhônatas Kuhn**, **Annalú Ferreira**, **Sâmea Joaquim**, **Caroline Kuhn**, **Fabiana Pighini**, **Vanessa Moreira** e **Ivo Lucchesi**.

Aos professores: **Alexandre Secorun Borges**, **Antonio Carlos Paes**, **Celso Antônio Rodrigues**, **Eunice Oba**, **Hélio Langoni**, **João Carlos Pinheiro Ferreira**, **José Paes de Almeida Nogueira Pinto**, **Marcio Garcia Riberio**, **Noeme Sousa Rocha**, **Paulo Francisco Domingues**, **Regina Kiomi Takahira**, **Roberto Calderon Gonçalves**, **Roberto de Oliveira Roça**, **Raimundo Souza Lopes**, **Rogério Martins Amorim**, **Simone Biagio Chiacchio** e **Sony Dimas Bicudo** da FMVZ UNESP-Botucatu que foram a base para eu chegar até aqui.

À **Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado (Processo FAPESP - 2016/02103-0) o que ajudou para que eu pudesse durante estes dois anos investir em minha vida profissional.

À vacas: 1, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 29, 30 e aos bois 4, 5 e 6 que participaram deste estudo. Sou grata por firmarem uma certeza: a medicina veterinária em minha vida! A responsabilidade que minha profissão exige em fazer sempre o melhor em prol à sanidade e bem-estar dos bovinos.

“Eu não devo ter medo. Medo é o assassino da mente. Medo é a pequena morte que leva à aniquilação total. Eu enfrentarei meu medo. Permitirei que passe por cima e me atravesse. E, quando tiver passado, voltarei o olho interior para ver seu rastro. Onde o medo não estiver mais, nada haverá. Somente eu permanecerei.”

Frank Herbert

RESUMO

MINAMI, N.S. Avaliações clínica e comportamental de bovinos com acidose ruminal experimental por ácidos graxos de cadeia curta. [Clinical and behavioral evaluations of cattle with experimental ruminal acidosis by short chain fatty acids]. 2018. 118f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Objetivou-se adequar modelo de indução de acidose ruminal por ácidos graxos de cadeia curta (ARAGCC), com uso de polpa cítrica (PC), para bovinos mais pesados, assim como avaliar o metabolismo ruminal, alterações comportamentais, clínicas e diagnósticas. Para o primeiro objetivo foram utilizadas três vacas Nelore ($544,2 \pm 47$ kg), com cânula ruminal, e alimentadas, duas vezes ao dia, com 75% de feno e de 25% concentrados. A dose fixa de PC (1,65% do peso vivo) administrada na cânula ruminal gerou inicialmente acidose láctica ruminal e após adequações apurou-se a fórmula ($\text{g de PC} = \text{Peso corporal}^{0,75} \times 54,7$) que provocou adequado quadro de ARAGCC (pH ruminal entre 5,8 e 5,2 com duração mínima de 5h). No 2º experimento foram empregados outros 10 animais da mesma raça, sexo e peso semelhantes, com a mesma alimentação, por no mínimo 45 dias antes da indução, acompanhando-se o consumo de matéria seca (CMS). No dia anterior à indução e nos próximos três dias foram registrados, a cada 5 min, o tempo de ruminação (TR), ingestão de alimentos (TIG) e ócio (decúbito e em estação), assim como o pH ruminal, por meio de bólus intraruminal de mensuração contínua. No decorrer do 1º dia foram coletadas amostras de fluido ruminal, sangue, fezes e urina e realizado exame clínico em oito momentos (zero, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 24h). Nove horas após o oferecimento matinal dos alimentos foram mensurados os movimentos ruminais (MR) no 2º e 3º dias. O pH ruminal na ARAGCC foi sempre inferior ao período basal, com duração da acidose de 547 ± 215 min, pH mínimo de $5,38 \pm 0,16$ e pH médio durante a acidose de $5,62 \pm 0,1$. Essa foi provocada principalmente por AGCC (máximo de $118,4 \pm 9,3$ mM/L), com máxima produção de ácido láctico ($7,17$ mM/L) e de ácido láctico D ($0,56$ mM/L) na 6ª h. A osmolaridade foi máxima na 3ª h ($405,5 \pm 45,2$ mOsm/L) influenciada pelo ácido láctico e teor de glicose ruminal. O CMS foi reduzido de $10 \pm 1,23$ kg no período basal em 66,3% no 1º d e 48% no 2º d regularizando-se no 3º. Quanto menor o pH médio da ARAGCC ($R^2 = 0,679$), o TR ($R^2 = 0,807$) a MR ($R^2 = 0,739$) e quanto maior a osmolaridade ruminal ($R^2 = 0,5461$)

menor o CMS. O tempo para consumir 1 kg de MS aumentou de 32 ± 4 min no tempo basal para 94 no 1º d e 90 min no 2º d, normalizando-se no 3º. O TR foi reduzido de 450 ± 68 min no período basal em 58,4% no 1º d, em 48,7% no 2º d e em 20,9% no 3º d e foi influenciado positivamente pelo pH médio ($R^2 = 0,807$). Os animais não modificaram o tempo de ócio em estação, mas aumentaram o tempo o de decúbito em relação ao período basal (380 ± 60 min) em 38,9% no 1º d em 26,6 % no 2º, regularizando-se no 3º. O decúbito foi mais prolongado quanto menor foi o pH ruminal mínimo ($R^2 = 0,466$) e o grau de depressão neurológica ($R^2 = 0,616$). Quanto menor o pH mínimo ($R^2 = 0,639$) e maior o teor de lactato L ruminal ($R^2 = 0,373$) maior o grau de depressão neurológica. O potencial de oxirredução, a acidez titulável e o tempo de redução de azul de metileno, em conjunto com o pH ruminal, podem auxiliar no diagnóstico da ARAGCC.

Palavras-chave: Subaguda. Comportamento. Polpa cítrica. Ingestão de alimento. Indução.

ABSTRACT

MINAMI, N.S. Clinical and behavioral evaluations of cattle with experimental ruminal acidosis by short chain fatty acids. [Avaliações clínica e comportamental de bovinos com acidose ruminal experimental por ácidos graxos de cadeia curta]. 2018. 118f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Thirteen, rumen cannulated, Nellore cows (544.2 ± 47 kg) were used in two different studies. The first one was carried out to set up a standard model for induction of rumen acidosis by short chain fatty acid (RASCFA) in heavier cattle ($n=3$ cows) with the use of citrus pulp (CF) (1.65% BW of CF into the rumen). The remaining, studied the effect of RASCFA on ruminal metabolism, behavior changes, clinical and diagnostics aspects ($n=10$). The cows were housed in individual tie stalls and fed twice a day 75% coast-cross hay and 25% commercial concentrates, for 45d before the trials, with feed intake (FI) monitored. The standard model caused initially rumen lactic acidosis, but after some corrections ($\text{g CP} = \text{BW}^{0.75} \times 54.7$) induced RASCFA adequately (rumen pH between 5.8 and 5.2 for at least 5h). On the day before and for three consecutive days after induction the following variables were recorded every 5 min: time spending for rumination (TR), for feeding intake (TFI), for idle laying down (ILD) or idle standing (IS). On the day before and during the day of induction an intraruminal bolus for measuring rumen, pH each 5 min, were installed. Rumen fluid, blood, fecal and urine samples were collected and clinical examination carried out every three hour on the day of induction. Rumen movements (RM) were also recorded on the 2nd and 3rd d 9h after the morning feeding. The rumen pH of RASCFA was always lower than the basal time and the lasting of acidosis was 547 ± 215 min, minimum pH 5.38 ± 0.16 and the average pH during acidosis 5.62 ± 0.1 . The rumen acidosis was caused mainly by SCFA (maximum 118.4 ± 9.3 mM/L), L-lactic acid (7.17mM/L) and D-lactic acid (0.56 mM/L) on the 6thh. Osmolality was maximum at the 3rdh (405.5 ± 45.2 mOsm/L) mostly caused by lactic acid and glucose. FI was reduced 66.3 % on the 1std and 48% on the 2ndd returning to normal status on the 3rd d (basal 10 ± 1.23 kg). The FI was positively influenced by the average rumen pH ($R^2 = 0.679$), the RM ($R^2 = 0.807$), and MR ($R^2 = 0.739$), but negatively by the rumen osmolality ($R^2 = 0.546$). The time for consumption of 1 kg DM was higher on the 1std (94 min) and 2nd d (90 min) but recovery on the 3rd d (basal 32 ± 4 min). The TR was

reduced on the 1st d (58.4%), 2nd d (48.7%) and 3rd d (20.9) (basal 450 ± 68 min) and was mostly positively influenced by the average rumen pH ($R^2 = 0.8077$). The IS hasn't change, but ILD time increased by 38.9% on the 1std, 26.6% on the 2ndd returning to normal on the 3rdd (basal 380 ± 60 min). The ILD time was negatively influenced by the minimum rumen pH ($R^2 = 0.466$) and the neurological depression status ($R^2 = 0.616$). The neurological depression status was positively influenced by the rumen minimum pH ($R^2 = 0.639$) and positively by the level of rumen L-lactic acid ($R^2 = 0.3733$). The tests of redox potential, titratable acidity and time for reduction of methylene blue, along with rumen pH, are good alternatives for diagnosing RASCFA.

Keywords: Subacute. Behavior. Citrus pulp. Feed intake. Induction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produção de lactato e ácidos graxos voláteis a partir da fermentação de amido e açúcares solúveis, envolvimento de grupos bacterianos ruminais ácido-resistentes e ácido-sensíveis.....	27
Figura 2 - Principais intermediários metabólicos e grupos de bactérias ruminais envolvidas na fermentação de amido e açúcares solúveis em ácido láctico e AGCC.....	28
Figura 3 - Animais em <i>tie stall</i> isolados em cabrestos para restringir o acesso ao alimento da outra vaca na mesma baia.....	40
Figura 4 - Indução da acidose por AGCC com introdução de polpa cítrica peletizada pela cânula ruminal.....	42
Figura 5 - Comportamento dos animais: acesso ao cocho, ruminação e ócio (animais em pé ou em decúbito).....	43
Figura 6 - Calibração dos sensores para mensuração do pH e colocação do Rumen Logger® pela cânula ruminal.....	44
Figura 7 - Osmômetro The Advanced Micro Osmometer 3300 (Advanced®) para determinação da osmolaridade do fluido ruminal.....	49
Figura 8 - Analisador bioquímico automático RX Daytona (Randox®).....	51
Figura 9 - Coleta de sangue da veia jugular e artéria auricular.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grau de comportamento neurológico dos animais com ARAGCC.....	43
Tabela 2 - Análise da matéria seca (kg) da polpa cítrica.....	45
Tabela 3 - Comparação de pH ruminal de bovinos alimentados com a dieta padrão e no decorrer da indução da ARAGCC.....	54
Tabela 4 - Valores mínimos e médios do pH ruminal no período basal (dieta padrão) e na acidótica (ARAGCC).....	55
Tabela 5 - Concentração dos ácidos orgânicos ruminais: os graxos de cadeia curta, glicose e os isômeros de ácido láctico L e D no decorrer da ARAGCC....	58
Tabela 6 - Diferentes provas ruminais neste fluido no decorrer da indução de ARAGCC em vacas de corte.....	62
Tabela 7 - Correlação entre as variáveis ruminais no decorrer da indução de ARAGCC em vacas de corte.....	65
Tabela 8 - Consumo de Matéria Seca (kg) em kg/24h nos tempos basal e nos três dias consecutivos à indução da ARAGCC.....	66
Tabela 9 - Tempo gasto para consumir 1 kg de Matéria Seca no período basal e nos três dias após indução de ARAGCC.....	71
Tabela 10 - Tempo (min) que os animais ruminaram no período basal e nos dias seguintes da indução de ARAGCC.....	72
Tabela 11 - Tempo (min) que os animais permanecem em ócio, quer seja em decúbito, em pé e somatório das duas posições no momento basal e nos dias subsequente da indução de ARAGCC.....	75
Tabela 12 - Comportamento das variáveis clínicas nas 24 horas após indução de ARAGCC.....	78

Tabela 13 - Comparação do movimento ruminal no período basal e nos dias seguintes da indução de ARAGCC.....79

Tabela 14 - Dinâmica das variáveis sanguíneas e da soma dos ácidos orgânicos e glicose ruminal nas primeiras 24 horas após indução de ARAGCC.....85

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Dinâmica do pH ruminal no decorrer do dia em bovinos hígidos e induzidos com ARAGCC	55
Gráfico 2 - Relação entre o pH mínimo e o pH médio atingido na ARAGCC.....	56
Gráfico 3 - Relação entre o pH mínimo atingido e o tempo de duração (min) que os animais permaneceram em ARAGCC.....	56
Gráfico 4 - Perfil dos principais ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) ruminais no decorrer da indução de ARAGCC em vacas de corte.....	57
Gráfico 5 - Correlação entre os ácidos propiônico e butírico no decorrer da indução de ARAGCC em vacas de corte.....	59
Gráfico 6 - Correlação entre os ácidos propiônico e acético no decorrer da indução de ARAGCC em vacas de corte.....	59
Gráfico 7 - Relação Acetato/Propionato (mM/L) no decorrer da indução de ARAGCC em vacas de corte.....	60
Gráfico 8 - Valores da mediana de Lactato L (mM/L) ruminal no decorrer da indução de ARAGCC em vacas de corte.....	60
Gráfico 9 - Valores de glicose ruminal no fluido ruminal no decorrer da indução de ARAGCC.....	61
Gráfico 10 - Dinâmica do potencial de oxirredução (POR) do conteúdo ruminal no decorrer da indução de ARAGCC.....	63
Gráfico 11 - Registro da prova do tempo de redução de azul de metileno (TRAM) no conteúdo ruminal no decorrer da indução de ARAGCC.....	63
Gráfico 12 - Resultados obtidos na prova da acidez total titulável (AcT) no conteúdo ruminal no decorrer da indução de ARAGCC.....	64
Gráfico 13 - Valores da osmolaridade no fluido ruminal no decorrer da indução de ARAGCC.....	64

Gráfico 14 - Consumo de MS (kg) no momento basal e nos três dias seguintes à indução da ARAGCC.....	66
Gráfico 15 - Relação entre a ingestão de MS (kg) no 1º e 2º da ARAGCC.....	67
Gráfico 16 - Relação entre o pH ruminal mínimo e a ingestão de MS (kg) no primeiro dia de ARAGCC.....	67
Gráfico 17 - Relação entre o pH ruminal mínimo e a ingestão de MS (kg) no segundo dia de ARAGCC.....	68
Gráfico 18 - Relação entre o tempo de duração da acidose e ingestão de MS (kg) no primeiro dia ARAGCC.....	68
Gráfico 19 - Relação entre o tempo de duração da acidose e ingestão de MS (kg) no segundo dia da ARAGCC.....	69
Gráfico 20 - Relação entre a média geral do pH na ARAGCC com a ingestão de MS (kg) no primeiro dia da ARAGCC.....	69
Gráfico 21 -Relação entre a média geral do pH na ARAGCC com a ingestão de MS (kg) no segundo dia da ARAGCC.....	70
Gráfico 22 - Influência da osmolaridade ruminal no tempo basal e sua média com o consumo de MS (kg) no primeiro dia de ARAGCC.....	70
Gráfico 23 - Tempo gasto para consumir 1 kg/MS (kg) no período basal e nos três dias após indução de ARAGCC.....	71
Gráfico 24 - Tempo de ruminação (min) no período basal e nos três dias após indução da ARAGCC.....	72
Gráfico 25 - Relação entre ingestão de alimentos (MS) com o tempo de ruminação (min) no período basal e nos três dias após indução da ARAGCC.....	73
Gráfico 26 - Relação entre o pH ruminal médio com o tempo de ruminação (min) no período basal e no primeiro dia da ARAGCC.....	73

Gráfico 27 - Relação entre o tempo gasto para consumo de 1 kg de MS e o tempo gasto na ruminação no período basal e no primeiro dia de ARAGC.....	74
Gráfico 28 - Tempo de observação (min) do período de ócio total, em pé e em decúbito no momento basal e nos três dias posteriores.....	75
Gráfico 29 - Relação entre o pH mínimo ruminal e o tempo em decúbito no primeiro dia de ARAGCC.....	76
Gráfico 30 - Relação entre a ingestão de alimento (kg) e o tempo em decúbito (min) no momento basal e nos três dias após indução de ARAGCC.....	76
Gráfico 31 - Frequência cardíaca (bpm) nas primeiras 24 horas nos animais induzidos para ARAGCC.....	79
Gráfico 32 - Frequência respiratória (mpm) nas primeiras 24 horas nos animais induzidos para ARAGCC.....	80
Gráfico 33 - Temperatura retal (T°C) nas primeiras 24 horas nos animais induzidos para ARAGCC.....	80
Gráfico 34 - Relação entre a temperatura retal (T°C) e o pH ruminal nos animais induzidos para ARAGCC.....	81
Gráfico 35 - Movimento ruminal (MR/3min) nas primeiras 24 horas nos animais induzidos para ARAGCC.....	81
Gráfico 36 - Relação entre o consumo de MS (kg) com o movimento ruminal nos animais induzidos para ARAGCC.....	82
Gráfico 37 - Relação entre a osmolaridade ruminal média (mOsm/L) no momento basal e na ARAGCC com o movimento ruminal original médio nestes momentos.....	82
Gráfico 38 - Relação entre o pH mínimo ruminal na ARAGCC com o grau de comportamento neurológico na ARAGCC.....	83
Gráfico 39 - Relação entre o tempo de decúbito (min) com o grau de comportamento neurológico na ARAGCC.....	84

Gráfico 40 - Relação entre o teor de lactato D no fluido ruminal com o grau do comportamento neurológico na ARAGCC.....	84
Gráfico 41 - Relação entre o teor de glicose sanguínea com AGCC totais no rúmen.....	85

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
ARAGCC	 Acidose Ruminal por Ácidos Graxos de Cadeia Curta
ALR	Acidose Láctica Ruminal
bpm	 Batimentos por minuto
d	 Dia
h	 Hora
kg	Quilos
min	 Minuto
ml	Mililitro
µl	 Microlitro
mpm	Movimentos por minuto
MR	Movimentos Ruminais
MS	Matéria Seca
°C	 Graus Celsius
PC	 Polpa Cítrica
SARA	Acidose Ruminal Subaguda
TRAM	 Tempo de redução do azul de metileno
TR	 Temperatura Retal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	26
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	Acidose ruminal por ácidos graxos de cadeia curta (ARAGCC)	27
2.2	Avaliação do pH ruminal	32
2.3	Indução da ARAGCC	34
2.4	Comportamento dos bovinos na ARAGCC	35
2.5	Estratégias do manejo nutricional na prevenção da ARAGCC	36
3	HIPÓTESES	38
4	OBJETIVOS	39
5	MATERIAIS E MÉTODOS	40
5.1	Animais	40
5.1.1	Implantação das cânulas ruminais	41
5.2	Alimentação	41
5.3	Delineamento e protocolo experimental	41
5.3.1	Momentos de avaliação clínica e coleta das amostras	42
5.3.2	Momentos para avaliação do comportamento	43
5.3.3	Determinação da acidose ruminal por AGCC	44
5.4	Projeto piloto e condução do experimento	45
5.4.1	Polpa cítrica peletizada	45
5.5	Exame clínico geral	46
5.6	Amostras de fezes	46
5.7	Amostras de urina	47
5.8	Fluido ruminal	47
5.8.1	Coleta e análise	47
5.8.1.1	Acidez titulável (AcT)	47
5.8.1.2	Tempo de redução de azul de metileno (TRAM)	48
5.8.1.3	Osmolaridade	48
5.8.1.4	Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)	49
5.8.1.5	Lactato	50
5.9	Sangue	50
5.9.1	Coleta e análise	50

5.9.2	Tratamento suporte	51
5.10	Análise estatística	52
6.	RESULTADOS	53
6.1	Dose de Polpa Cítrica empregada para induzir ARAGCC	53
6.2.	Comportamento de variáveis ruminais	54
6.2.1	pH ruminal no decorrer da indução	54
6.2.2	Comportamento das variáveis ruminais	57
6.2.3	Demais variáveis ruminais	62
6.3	Comportamento ingestivo	66
6.4	Exame clínico geral	77
6.5	Comportamento das variáveis sanguíneas	85
7.	DISCUSSÃO	86
7.1	Avaliação do modelo para indução de ARAGCC	86
7.2	Dinâmica das variáveis ruminais: pH, ácidos orgânicos e glicose	87
7.3	Provas ruminais	92
7.4	Comportamento ingestivo	97
7.5	Dinâmica das variáveis do exame clínico geral	103
7.6	Dinâmica das variáveis sanguíneas	107
8.	CONCLUSÃO	109
9.	REFERÊNCIAS	111

1. INTRODUÇÃO

A pecuária de corte no Brasil tem aumentado nas últimas décadas a produtividade do seu rebanho. Com o intuito de obter no confinamento e semi-confinamento animais que produzam mais em menor tempo, as estratégias adotadas têm sido a associação de técnicas no manejo sanitário e nutricional. Destaca-se o emprego de dietas cada vez mais energéticas, rica em concentrado para obter os resultados desejados. Se por um lado os animais são mais rendosos, por outro, aumenta-se a frequência de enfermidades digestivas com a introdução deste novo modelo de dieta, dentre elas as acidoses ruminais (MILLEN et al., 2009; ORTOLANI et al., 2015).

Os quadros de acidose são gerados pela intensa fermentação ruminal de carboidratos solúveis presentes nos grãos ricos em amido, como milho, sorgo e rações peletizadas de polpa cítrica. Há uma produção exacerbada de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) produzindo uma acidose mais moderada, com pouca manifestação clínica nos animais acometidos, o que dificulta um diagnóstico mais precoce (CULLEN et al., 1986; NAGARAJA; LECHTENBERG, 2007).

Como as manifestações da ARAGCC no rebanho são mais sutis, os animais podem apresentar repetidamente esses quadros considerados silenciosos e a longo prazo, vão diminuindo o seu desempenho com baixo ganho de peso e cada vez mais predispostos à quadros mais intensos, como a acidose láctica ruminal (SNYDER; CREDILLI, 2017).

Devido à complexidade da ARAGCC, dificuldade de ferramentas diagnósticas e marcadores clínicos desta doença nos bovinos confinados, uma revisão de literatura sobre o assunto será abordada no capítulo à seguir.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Acidose ruminal por ácidos graxos de cadeia curta (ARAGCC)

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são por definição de Marzzoco & Torres (2007) estruturas que possuem de um a seis átomos de carbonos em sua cadeia. Dentre os mais representativos e estudados na fermentação ruminal podemos citar os ácidos: acético (C:2), propiônico (C:3), butírico (C:4), iso-butírico (C:4), valérico (C:5), iso-valérico (C:5). Estes AGCC são produtos da fermentação microbiana e absorvidos na parede ruminal, representando a maior fonte energética para os ruminantes (BERCHIELLI et al., 2006). A absorção ocorre naturalmente por um processo de absorção passiva na parede do rúmen e no epitélio intestinal (TAMMINGA; VAN VUUREN, 1988; OWENS et al., 1998).

Figura 1 - Produção de lactato e ácidos graxos voláteis a partir da fermentação de amido e açúcares solúveis, envolvimento de grupos bacterianos ruminais ácido-resistentes e ácido-sensíveis.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018) adaptado de Nagaraja; Lechtenberg (2007).

Figura 2 - Principais intermediários metabólicos e grupos de bactérias ruminais envolvidas na fermentação de amido e açúcares solúveis em ácido láctico e AGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018) adaptado de Nagaraja; Lechtenberg (2007).

Segundo Berchielli et al. (2006) a formação destes AGCC dependem do tipo de alimentação que os animais recebem no confinamento, portanto, as relações acetato:propionato:butirato variam conforme a dieta ministrada aos bovinos, sendo que naquelas rica em grãos pode-se chegar à uma proporção de 75:15:10 e nas dietas mais rica em fibras, uma relação de 40:40:20.

Dietas ricas em concentrado como milho, sorgo, cevada e polpa cítrica têm sido uma das estratégias dos nutricionistas para a melhoria das exigências energéticas nos animais confinados, com o intuito de aumentar a produção em um menor tempo. Desta forma, se por um lado os animais ganham rapidamente mais peso, por outro aumenta-se o risco de doenças nutricionais e metabólicas causadas

por este novo manejo alimentar, dentre elas a mais comum é a acidose ruminal. Neste caso, a produção destes AGCC ocorre de forma exacerbada e associada ao baixo fornecimento de fibra detergente neutra efetivo (FDNef), os animais ficam mais predispostos à esta enfermidade (MILLEN et al., 2009; ORTOLANI et al., 2015). Há duas classificações para a doença e está intimamente relacionada ao seu grau de intensidade. A primeira está presente de uma forma mais grave, denominada de acidose láctica ruminal (ALR), apresenta uma sintomatologia bem evidente, com diarreia, apatia, baixo ganho de peso, emagrecimento, queda no desempenho, depressão e nos casos de consumo abrupto destes grãos, até a morte destes animais (CONSTABLE et al., 2017).

Nos casos de ALR, por suas manifestações serem mais acentuadas e pela quantidade de estudos em torno desta enfermidade, os animais são mais facilmente diagnosticados e tratados. A outra forma, denominada de acidose ruminal por ácidos graxos de cadeia curta (ARAGCC) ou também popularmente conhecida por acidose ruminal subaguda (SARA), segundo a nomenclatura da escola americana (OWENS et al., 1998; ENEMARK et al., 2002; ENEMARK, 2009). Este termo subagudo refere-se à forma muitas vezes silenciosa, branda ou sub-diagnosticada deste quadro por médicos veterinários e técnicos à campo.

Se os quadros de ALR são bem estudados, os de ARAGCC ficam em sua maioria, negligenciados. Os casos de ALR acometem cerca de 0,17 a 0,42 % dos bovinos confinados, já a morbidade da ARAGCC é de 10 a 50% dos animais, sendo que quanto maior o rebanho, maiores são os casos deste tipo de acidose ruminal (GALYEAN; RIVERA, 2002; CONSTABLE et al., 2017). A letalidade da ALR chega a ser de 90% dentre os animais não tratados, já na ARAGCC este número é baixo,

porém seus efeitos econômicos no rebanho são devastadores, com queda do desempenho dos animais e baixo ganho de peso (OETZEL, 2017).

A longo prazo, estas manifestações clínicas podem se fazer presentes nos animais acometidos na forma de quadros inflamatórios de laminite e ruminite. Em estudo de Vechiato (2009), foi encontrado nos bovinos confinados abatidos, 12% de lesões inflamatórias na parede do rúmen, sendo que as ruminites são em sua grande maioria causadas pelos quadros de ARAGCC. Estas lesões começam a diminuir a absorção de nutrientes, fazendo com que os animais não tenham o desempenho desejado (NOCEK, 1997).

Segundo estudo recente de Zebeli et al. (2012), o autor conceituado que a ARAGCC é caracterizada por um pH ruminal entre 5,8 a 5,2, por um tempo mínimo de 5h de duração. Nesta faixa de pH há morte de bactérias Gram-negativas, liberando endotoxinas de suas membranas citoplasmáticas (LPS) com o aumento de algumas proteínas de fase aguda, como a substância amiloide A. Cria-se um cenário inflamatório com lesão das papilas ruminais, responsáveis pela absorção dos nutrientes (BERCHIELLI et al., 2006).

As causas são as mais diversas, em vacas leiteiras a dieta rica em concentrado no período pós-parto para aumentar a produção de leite no início da lactação, pode acarretar nos crescentes casos de acidose por AGCC no rebanho. Em bovinos de corte confinados, ocorre algo semelhante, os animais saem do pasto e recebem uma dieta altamente energética, visando um melhor rendimento e ganho de peso. O erro de manejo alimentar é a grande responsável pela incidência de acidose ruminal por ARAGCC, com a administração da dieta rica em concentrado em grande quantidade sem um período de adaptação ou a distribuição não

fracionada sendo fornecido apenas uma vez pela manhã no cocho (KRAUSE; OETZEL, 2006; OETZEL, 2017).

Estas constantes falhas iniciam um ambiente ruminal propício para o favorecimento de determinadas bactérias que em seu metabolismo degradam esses grãos e produzem os AGCC em maior quantidade, principalmente de ácidos como o propiônico, butírico e em menor quantidade o acético (ORTOLANI, 2015). Estas bactérias Gram-positivas, principalmente a *Streptococcus bovis* que quebram o amido ou outro açúcar solúvel disponível, em ácido propiônico, fazendo com que o pH ruminal diminua consideravelmente dos valores basais (pH = 7,1 - 5,8) para abaixo de 5,8 com produção dos AGCC, causando a grande acidificação do ambiente ruminal (NAGARAJA; LECHTENBERG, 2007; ZEBELI et al., 2012).

Os receptores epiteliais detectam quaisquer variações relacionadas ao aumento da concentração destes ácidos. Há uma considerável redução da população de bactérias celulolíticas responsáveis pela degradação dos carboidratos estruturais, por não sobreviverem neste pH mais ácido, a relação acetato:propionato, diminui (NAGARAJA et al., 1997). Favorece o crescimento de uma nova população bacteriana, chamadas de amilolíticas, destancando-se a *Streptococcus bovis*. Este tipo de bactéria em pH por volta de 6,0 produzem acetato, porém no pH da ARAGCC, entre 5,8 a 5,2, produzem como produto final, o lactato. Com o aumento da população de bactérias produtoras de lactato, este pH máximo de 6,2 a 5,8 diminui o número de bactérias que degradam esse ácido para mais fracos como o propiônico, tais como *Megasphaera elsdenii* e *Selenomonas ruminantium* (NAGARAJA; LECHTENBERG, 2007; NAGARAJA et al., 1992).

Vale ressaltar que a força dos ácidos interfere diretamente nos quadros de acidose ruminal. A força dos ácidos é medida em pK, quanto menor seu valor, mais

forte é o ácido em questão. O lactato é um ácido extremamente forte ($pK = 3,7$) quando comparado ao propiônio e butírico com pK de 4,9 e 4,8, respectivamente. Assim, os ácidos mais fortes provocam um maior desequilíbrio fisiológico no meio ruminal, com maiores manifestações clínicas e laboratoriais nos animais acometidos. Na ARAGCC, diferentemente da acidose láctica em que há crescente de ácido láctico produzido pelas bactérias Gram-negativas que toleram o pH mais baixo e aumentam assim sua população, tais como *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus* sp. Além de sobreviverem neste pH mais desafiante, ainda são mais estimuladas à produzirem ainda mais lactato (DUNLOP, 1972; OWENS et al., 1998; ORTOLANI et al., 2016).

Em condições normais estes ácidos são produzidos pela microbiota ruminal e sua quantidade está relacionada com a motilidade do rúmen. Se a concentração destes ácidos aumenta, os receptores do epitélio ruminal respondem através de estímulos mecânicos com diminuição da sua atividade (CONSTABLE et al., 2017).

2.2 Avaliação do pH ruminal

O monitoramento do pH nos casos de ARAGCC é a principal ferramenta para um controle e diagnóstico mais preciso. Para a coleta deste conteúdo ruminal, a forma menos invasiva é através da coleta via sonda esofagiana, porém, esta pode ser contaminada pela ação da saliva, aumentando o pH final da amostra obtida (ORTOLANI, 1981; ENEMARK et al., 2002).

Outra técnica muito utilizada à campo é a ruminocentese através da coleta de fluido ruminal pela aspiração percutânea da região caudoventral do rúmen. Porém é um procedimento considerado bem invasivo, com formação de hematomas e abscessos na região, com casos de peritonite séptica causadas pelo procedimento.

Há relatos de até 16% de abscessos causados pelas ruminocenteses (ACETO et al., 2000; DUFFIELD et al., 2004; MORGANTE et al., 2007; STRABEL et al., 2007).

O método mais preconizado para detecção do pH ruminal é a coleta do fluido através da fístula ou cânula ruminal com auxílio de medidores de pH alocados no rúmen. Esta metodologia tem obtido ótimos resultados e adaptação dos animais submetidos a esse tipo de cirurgia (MATERA, 1989; GOZHO et al., 2007). Os sensores de medição contínua são alocados na cavidade retículo ruminal através de dispositivo via nasofaringe. São também conhecidos por bólus e são calibrados para captar o pH ruminal a cada cinco minutos ou a média deste por 24 horas, armazenando os dados por diversos dias. Os registros são transmitidos automaticamente através de uma rede sem fio para uma estação base que são desta forma, registrados e armazenados (GASTEINER et al., 2015; SATO, 2016).

Nos animais sadios, o pH do líquido ruminal está em torno de 6,2 a 7,2 com variação deste pH conforme aos alimentos que são oferecidos aos bovinos. Valores mais altos significam um estado em que ocorre a degradação das proteínas ruminais e valores abaixo já indicam uma alimentação com excesso de carboidratos, na qual os animais estão mais predispostos aos quadros de acidose ruminal (CONSTABLE et al., 2017).

Com o estudo de Zebeli et al. (2012) a avaliação dos quadros de ARAGCC foi determinada pelo tempo e pH dos animais com este tipo de acidose. Neste contexto da rápida identificação e monitoramento dos quadros de ARAGCC, tal avaliação serve para a confirmação de quadros de ARAGCC, caracterizado pelo faixa de pH entre 5,8 a 5,2, pelo menos por 5h (ENEMARK, 2009; DANSCHER et al., 2015).

2.3 Indução da ARAGCC

Barrêto Júnior et al. (2008) determinaram um protocolo de indução da ARAGCC com a administração de polpa cítrica, numa dose única, em animais com 180 kg/PC obtendo o pleno sucesso na indução. Esse modelo é muito prático, pois diferente dos modelos tradicionais não é fornecido prolongadamente substratos com carboidratos solúveis. Contudo, Ortolani (1995) comprovou que a indução com um único substrato empregando dose fixa por kg/PC, que quanto mais pesado for o animal, principalmente em pesos muito discrepantes que o pH ruminal diminuía intensamente, ou seja, quanto mais pesado for o animal maior o risco dele apresentar acidose ruminal. Assim, caso o modelo de Barrêto Júnior et al. (2008) seja utilizado em bovinos muito mais pesados há necessidade de ser recalculado a quantidade de polpa cítrica a ser empregada para continuar a provocar ARAGCC.

A polpa cítrica peletizada é utilizada como alimento energético para bovinos confinados por diversas vantagens, sejam econômicas, por ser um subproduto das indústrias que utilizam a laranja para a produção de suco, tendo um valor comercial bem acessível aos produtores assim como, por suas características nutricionais. É constituída pelo bagaço, casca e sementes, com 89-90% de MS após seu processo de secagem e posteriormente peletização, possui também alta palatabilidade para o consumo. Em relação às outras análises bromatológicas, apresenta 7% de proteína bruta (PB), 24% de fibra em detergente neutro (FDN) e cerca de 77% de nutrientes digestíveis totais (NDT) (KEENER et al., 1957; BRANCO et al., 1994).

É rica em pectina, um carboidrato não estrutural parcialmente solúvel em água e completamente solúvel em detergente neutro, de rápida degradação no rúmen, com índices que alcançam 90 a 100%. A polpa cítrica é a fonte mais rica em pectina dentre os alimentos oferecidos na dieta dos ruminantes confinados. Sua

molécula está ligada com a celulose e hemicelulose, formando a estrutura da parede celular dos vegetais, juntamente com a lignina e glicoproteínas. A pectina tem como característica não ser digerida por nenhuma enzima animal, assim, seu metabolismo ocorre pela ação de bactérias anaeróbicas que em sua biotransformação da pectina produzem os AGCC (BERCHIELLI et al., 2011).

Neste processo, diversos AGCC são produzidos, mas destacamos que o ácido acético é o em maior quantidade, perfazendo que o pH diminua, mas não seja superior aos efeitos deletérios que grandes quantidades de ácidos propiônico e láctico ocasionam no ambiente ruminal. A digestibilidade da pectina é maior no intestino (ceco e cólon) devido à menor disponibilidade energética no rúmen pela grande produção de AGCC (BEN-GHEDALIA et al., 1989; SANTOS et al., 2001).

2.4 Comportamento dos bovinos na ARAGCC

Enquanto que a primeira forma de ALR é bem mais fácil de ser diagnosticada, devido ao surgimento de sintomas claros e evidentes, a ARAGCC apresenta um quadro clínico de difícil diagnóstico com o surgimento de sinais sutis, tais como: diminuição da ingestão de alimentos, ou ingestão cíclica de alimentos, discretas alterações na amplitude e força de contração ruminal, baixa ou até mesmo ausente distensão abdominal com conteúdo ligeiramente pastoso à palpação, eliminação temporária de fezes ligeiramente pastosas, e moderada depressão na produção de gordura láctea. Animais com ARAGCC permanecem mais tempo em ócio deitados e diminuem a ruminação. Os trabalhos feitos para compreensão da influência da ARAGCC sobre o comportamento geral ou ingestivo foram feitos na sua grande

maioria em vacas leiteiras, necessitando ainda estudos em bovinos de corte (DEVRIES et al., 2009, OETZEL, 2017).

2.5 Estratégias do manejo nutricional na prevenção da ARAGCC

Como vimos, as manifestações clínicas da ARAGCC são pouco evidentes e se confundem com outras doenças de perfil metabólico e nutricional. Neste caso, a melhor estratégia é a prevenção do rebanho. Fisiologicamente, os bovinos produzem a saliva, um tamponante natural para combater o baixo pH ocasionado pelo excesso de ácidos produzidos pelas bactérias fermentadoras dos carboidratos. A ingestão de uma dieta balanceada na quantidade de grãos somada ao oferecimento de fibras estimula assim, a salivação e manutenção destes ácidos produzidos demasiadamente (DUFFIELD et al., 2004).

Outro fator importante, é a adaptação alimentar dos bovinos confinados, seja pela administração de doses fracionadas, duas vezes por dia, por exemplo, ou a implantação contínua na dieta, iniciando com uma quantidade menor do que a necessária e aumentando com o passar dos dias. Além disso, a manutenção das bactérias lactilíticas que transformam os ácidos mais fortes como o láctico em ácidos mais fracos, auxiliam no controle dos efeitos destes ácidos na sanidade da microbiota ruminal (ORTOLANI et al., 2016). Neste contexto da prevenção, o tamponamento destes ácidos é o mais visado pelos nutricionistas e técnicos à campo. Nas últimas décadas o uso de aditivos na dieta dos bovinos confinados tanto de leite como no gado de corte, tem sido utilizado como uma ferramenta estratégica para a melhoria do desempenho nutricional dos animais confinados, mas também para a prevenção de algumas doenças. Tem sido recomendado pelos técnicos e médicos veterinários à campo e bem aceita pelos produtores rurais. Porém, estudos

recentes indicam um novo uso desta ferramenta como estratégia para a prevenção de casos de ALR e ARAGCC, utilizando cerca de 2% de concentrado energético associados à monensina e a virginiamicina para melhorar no ganho de peso e auxiliando estrategicamente no crescimento de bactérias Gram-positivas, cada qual atuando diferentemente no metabolismo ruminal (SANTOS et al., 2015).

Na prevenção da ALR o uso isolado da monensina e virginiamicina, assim como sua associação têm obtido resultados positivos. O teor de lactato ruminal foi inferior significativamente no grupo da associação dos dois aditivos em relação aos demais grupos, reforçando a ideia que deva ter ocorrido uma ação aditiva na prevenção (OLIVEIRA et al., 2016; 2017). O uso de aditivos alimentares na limitação da produção excessiva de ácidos ruminais tem sido amplamente estudado em gado confinado. Os mais utilizados nos confinamentos nacionais são os ionóforos, destacando-se a monensina, lasalocida e salinomina. Sua ação de antibiótico lipofílico é capaz de realizar o transporte de íons da membrana celular de uma determinada classe de bactérias Gram-positivas, com entrada no citoplasma bacteriano de Na^+ e H^+ e saída de K^+ , alterando desta forma o pH. O gasto energético das bactérias que era destinado para sua manutenção, é destinada para o reestabelecimento do pH. Este meio diminui o número destas bactérias que produzem ácido láctico e metano, e favorecem o aumento da população bacteriana produtora de ácido mais fraco como o propiônico, quando comparado com o láctico (COE et al., 1999; SANTOS et al., ORTOLANI, 2015).

3. HIPÓTESES

Acredita-se que o modelo de indução de ARGCC com polpa cítrica, originário do trabalho de Barrêto Júnior e colaboradores (2008), necessite de adequações quantitativas para corrigir maiores pesos corpóreos, a fim de provocar adequado grau de ARAGCC.

Trabalha-se com a hipótese que esse modelo de indução possa provocar acidose ruminal por acúmulo de AGCC e alguma produção de ácido láctico, elevando a osmolaridade do fluido e provocando alterações no comportamento ingestivo, nos tempos de ruminação, decúbito e ócio como um todo.

Supõe-se que a acidose possa provocar alterações clínicas, em especial diminuição do movimento ruminal, elevação da temperatura retal e possa acarretar alguma modificação no estado comportamental geral.

Conjectura-se que provas como potencial de oxirredução, acidez titulável e tempo de redução de azul de metileno possam auxiliar no diagnóstico da doença.

4. OBJETIVOS

Propor um modelo de indução de ARAGCC para bovinos adultos mais pesados.

Registrar o grau da fermentação ruminal, correlacionando-a com os ácidos orgânicos aí produzidos.

Acompanhar possíveis alterações comportamentais, clínicas e laboratoriais para melhor identificar as consequências da acidose.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizadas 13 fêmeas da raça Nelore, com três anos de idade e peso médio de $544,21 \pm 46,83$ kg. Permaneceram em *tie stall* (baías individuais) instaladas no confinamento do Laboratório de Pesquisa em Gado de Corte (LPGC) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-USP), no Campus Pirassununga-São Paulo (Figura 3).

Figura 3 - Animais em *tie stall* isolados em cabrestos para restringir o acesso ao alimento da outra vaca na mesma baia.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Todos os animais foram identificados com brinco plástico, numerados de 1 a 13, vermifugados com Doramectina.

5.1.1 Implantação das cânulas ruminais

Com 30 dias de adaptação alimentar, os animais foram submetidos à implantação cirúrgica de cânula ruminal, tendo os animais recebido à aplicação de anti-inflamatórios não esteróides e antibioticoterapia por três dias. A limpeza e observação diária da ferida cirúrgica foi realizada para evitar possíveis infecções.

5.2 Alimentação

Durante 30 dias os animais receberam uma adaptação alimentar, com dieta basal calculada em 2,5% do peso vivo, composta de 75% da matéria seca (MS) de feno capim de “coast-cross” (*Cynodon dactylon*) e 25% de ração concentrada comercial. Esta, composta de 80% de milho farelado e 20% de farelo de soja, sendo fornecida de forma fracionada, duas vezes ao dia. Tiveram livre acesso à água (*Ad libitum*) e ao suplemento mineral comercial.

5.3 Delineamento e protocolo experimental

Após este período de adaptação de 30 dias da dieta citada acima, foi realizado o modelo de indução experimental para a acidose ruminal por AGCC, através da administração súbita intra-ruminal de polpa cítrica na base de 1,65% do peso vivo, conforme a seguinte fórmula:

$$Y \text{ (g)} = \text{Peso Corporal}^{0,75} \times 54,7$$

onde Y = gramas de PC.; peso corporal ^{0,75} o peso metabólico , empregado para correção de pesos muito dispares e 54,7 como um fator corretivo.

O protocolo utilizado foi descrito por Barrêto Júnior et al. (2008), que constatou o surgimento de pH ruminal entre 5,6 e 5,1 com duração igual ou superior a três ou cinco horas.

5.3.1 Momentos de avaliação clínica e coleta das amostras

Os tempos para a realização dos exames físicos, coleta de conteúdo ruminal e sangue, foram realizados nos seguintes momentos:

- ❖ Período de indução (T0): Considerado o momento basal de cada animal. A coleta foi realizada antes da introdução da polpa cítrica pela cânula ruminal para a indução da acidose por AGCC (Figura 4).

Figura 4 - Indução da acidose por AGCC com introdução de polpa cítrica peletizada pela cânula ruminal.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

- ❖ Período de observação: coleta a cada três horas após a indução da acidose ruminal por AGCC → (T3, T6, T9, T12, T15, T18 e T24).

Os animais permaneceram em suas respectivas baias e retornavam para as mesmas após a coleta, tendo acesso ao feno e água (*Ad libitum*).

5.3.2 Momentos para avaliação do comportamento

O comportamento dos animais foi avaliado a cada cinco minutos por 24 horas observaram-se: **acesso ao cocho** (consumo de MS), **ruminação** (animais em pé ou decúbito ruminando), **ócio em pé e em decúbito** (Figura 5).

Figura 5 - Comportamento dos animais: acesso ao cocho, ruminação e ócio (animais em pé ou em decúbito).

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

- ❖ Momento basal: observação do consumo dos animais sadios, 24 horas antes da indução da acidose por AGCC.
- ❖ Momentos pós-indução: 24, 48 e 72 horas após a indução da ARAGCC.

Os animais também foram avaliados pelo grau de comportamento neurológico na ARAGCC, segundo Danscher et al. (2015) (Tabela 1).

Tabela 1 - Grau de comportamento neurológico dos animais com ARAGCC.

GRAU	CLASSIFICAÇÃO
4	Alerta e responsivo
3	Ligeiramente deprimido
2	Muito deprimido
1	Moribundo

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018) adaptado de Danscher et al. (2015)

5.3.3 Determinação da acidose ruminal por AGCC

- ❖ Medidor de pH de Bancada: pH entre 5,8 a 5,2 durante as coletas, pelo menos cinco horas depois da indução (ZEBELI et al., 2012).
- ❖ Rumen Logger (DASCOR®): sensor de medição contínua do pH, calibrado com o Software M5-v760 (DASCOR®) para mensuração a cada cinco minutos do pH ruminal. Alojado no saco ventral dorsal, para que o sensor permanecesse durante todo o período experimental em contato com o fluido ruminal (Figura 6).

Figura 6 - Calibração dos sensores para mensuração do pH e colocação do Rumen Logger® pela cânula ruminal.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

5.4 Projeto piloto e condução do experimento

Foi realizado três pilotos antes do início do experimento, para a certificação do modelo proposto de indução da acidose ruminal por ácidos graxos de cadeia curta, segundo protocolo descrito por Barrêto Júnior et al. (2008) com a administração intra-ruminal de polpa cítrica peletizada.

Com a indução experimental da acidose ruminal nos pilotos (três reses canuladas) conseguiu-se o resultado esperado do pH ruminal entre 5,8 e 5,2 durante no mínimo cinco horas através da análise do líquido ruminal (ZEBELI et al., 2012). Após a análise dos resultados dos pilotos, iniciou-se a indução da acidose do primeiro grupo experimental.

5.4.1 Polpa cítrica peletizada

A polpa cítrica peletizada utilizada para a indução foi adquirida da Fazenda Santa Rita/Agrindus S.A., localizada em Descalvado-SP, 37 km do Campus de Pirassununga. A análise bromatológica foi realizada no Laboratório de Doenças Nutricionais e Metabólicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-USP). Foram enviadas duas amostras (PCG1 e PCG2), com porcentagem de matéria seca (%MS) média de $87,60 \pm 0,35$ (Tabela 2).

Tabela 2 - Análise da matéria seca (kg) da polpa cítrica.

Amostra	%MS	%MU	%MM	%PB	%EE	%Cá	%Fós.	%Mag.	%FB	%FDA	%FDN
PCG1	87,85	12,15	10,87	8,61	2,48	1,45	0,17	0,12	17,84	27,00	20,75
PCG2	87,35	12,65	10,67	8,69	2,64	1,40	0,20	0,11	15,76	27,53	21,75

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

5.5 Exame clínico geral

O exame clínico dos animais foi realizado nos momentos (TO, T3, T6, T9, T12, T15, T18 e T24) segundo Dirksen (2008) e Rosenberger (1983) com aferições das seguintes variáveis:

- ❖ Frequência cardíaca (FC): batimentos por minuto
- ❖ Frequência respiratória (FR): movimentos respiratórios por minuto
- ❖ Temperatura retal (TR): em graus centígrados
- ❖ Movimento de rúmen em três minutos

Devido ao achado de Danscher et al. (2015) de que a ARAGCC interferia na contração ruminal nos dias subsequentes a indução, optou-se por avaliar no período basal, 2º e 3º dia o movimento de rúmen na 9ª h após a ingestão matinal de alimentos e confrontá-los com o resultado no mesmo momento no 1º dia de ARAGCC.

5.6 Amostras de fezes

As amostras de fezes foram coletadas em copo coletor e analisado o pH no pHmetro de bancada (DM-22, Digimed® Analítica Ltda, São Paulo/SP, Brasil). A consistência destas fezes também foi avaliada na seguinte escala de escore de fezes (EF):

- 1) diarreicas
- 2) pastosas
- 3) ligeiramente firmes
- 4) endurecida

5.7 Amostras de urina

A urina foi coletada em copo coletor e em seguida analisada o pH em pHmetro de bancada (DM-22, Digimed[®] Analítica Ltda, São Paulo/SP, Brasil). A densidade urinária foi analisada por refratômetro (Atago[®] t2, ne Clinical, Atago Brasil, Ribeirão Preto/SP, Brasil).

5.8 Fluido ruminal

5.8.1 Coleta e análise

Nos momentos citados (T0, T3, T6, T9, T12, T15, T18 e T24), foram obtidas amostras do fluido ruminal, para a análise das variáveis: potencial hidrogeniônico (pH), potencial de oxirredução (POR), tempo de redução do azul de metileno (TRAM), acidez titulável (AcT), osmolaridade (mOsm/L), lactato D e L (levógiro).

As amostras foram coletadas de três regiões diferentes no rúmen: cranial, media e caudal. O conteúdo foi imediatamente coado em tecido estéril de algodão e no suco obtido, realizado a análise do pH ruminal, POR, TRAM e AcT em pHmetro de bancada (DM-22, Digimed[®]). Para a determinação da osmolaridade, do Lactato D e L as amostras foram armazenadas à - 20°C.

5.8.1.1 Acidez titulável (AcT)

A acidez titulável (AcT) foi determinada de acordo com a técnica de Jonov, citada por Rosenberger (1983) e Slanina; Rossow (1964). O teste consiste na titulação de duas gotas de fenolftaleína (10% em álcool metílico) em 10 ml de fluido ruminal. A solução N/10 para a titulação foi o hidróxido de sódio (NaOH 0,1%),

considerando-se o ponto de viragem dessa solução semelhante à cor “carne”. O volume da solução, expresso em ml, foi multiplicado por 10, resultante nas unidades de acidez total (UA).

5.8.1.2 Tempo de Redução de Azul de Metileno (TRAM)

O azul de metileno (AM) é um composto solúvel em água, produzindo uma solução de cor azul esverdeada (forma oxidada) quando em contato com o líquido ruminal. O AM é um indicador bacteriológico, pois a solução fica incolor na sua forma hidrogenada, representando qualitativamente a presença das bactérias ruminais. Para a determinação do TRAM foi utilizado 20 ml de líquido ruminal com 4 ml de azul de metileno (0,01%). A interpretação foi através do tempo necessário para que a cor do líquido volte a original, na qual até 3 min corresponde à uma microflora normal, entre 3 e 6 min processos com alterações digestivas e mais que 6 min uma acidose aguda (RADOSTITS et al., 2007).

5.8.1.3 Osmolaridade

Foi realizada sua determinação através do ponto de congelamento no osmômetro The Advanced Micro Osmometer 3300 (Advanced®) localizado no Laboratório de Doenças Nutricionais e Metabólicas (DNM) da Faculdade de Medicina e Zootecnia – USP (Figura 7) por amostras de líquido ruminal.

Figura 7 - Osmômetro The Advanced Micro Osmometer 3300 (Advanced®) para determinação da osmolaridade do fluido ruminal.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

5.8.1.4 Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

Amostras de fluido ruminal foram coletadas e de cada uma, 50 ml foi centrifugada a 3.500 rpm por 15 min e 1600 µL do sobrenadante com 400 µL de ácido fórmico foram armazenados em Eppendorf® para posterior análise. A determinação de AGCC foi realizada através de cromatografia gasosa segundo metodologia de Erwin et al. (1961). A análise foi realizada no Laboratório de Fermentabilidade Ruminal (LFR), localizado da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo – Campus Pirassununga.

5.8.1.5 Lactato

Para esta análise, uma alíquota de 100µL de fluido ruminal em 900 µL de água destilada. Para o lactato L foi utilizado kit comercial de determinação enzimática (L-Lactate - LAC, Randox[®]) no analisador bioquímico automático (Figura 8) modelo RX Daytona (Randox[®]). Para o lactato D foi utilizado o ensaio enzimático (D- Lactate Assay Kit; k667. BioVision[®];USA).

Figura 8 - Analisador bioquímico automático RX Daytona (Randox[®])

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

5.9 Sangue

5.9.1 Coleta e Análise

O sangue foi coletado da veia jugular por agulha Vacutainer[®] em dois tipos de tubos: sem anticoagulante e o com fluoreto de sódio.

A hemogasometria foi realizada por aparelho portátil (i-STAT 1, ABBOTT[®]) no momento basal e nos tempos mais críticos (T3, T6, T9), em que os animais podiam apresentar uma acidose por AGCC mais intensa e necessitar de tratamento. Para isso, foi coletado sangue da artéria auricular esquerda com escalpe e seringa contendo heparina sódica (Figura 9). A leitura foi realizada através de uma gota de sangue no cartucho ECG8+ (ABBOTT[®]).

Figura 9 - Coleta de sangue da veia jugular e artéria auricular.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

O sangue do tubo sem anticoagulante foi mantido em temperatura ambiente, com a formação do coágulo e posteriormente centrifugado por 10 minutos a 1400xg. O soro foi aliquotado e preservado em freezer -20°C para posterior análise da osmolaridade sérica. Esta foi analisada no osmômetro The Advanced Micro Osmometer 3300 (Advanced®).

O plasma obtido do tubo de fluoreto de sódio foi utilizado para determinar a concentração de ácido láctico L e glicose. Foram utilizados kits comerciais Randox® no analisador bioquímico automático (Modelo RX, Daytona (Randox®)).

5.9.2 Tratamento suporte

Caso algum animal, através da avaliação hemogasométrica, nos momentos mais críticos (T3, T6, T9 e T12) apresentassem pH sanguíneo inferior à 7,2 seriam medicados com 1ml/kg de solução de bicarbonato de sódio (8,4%) e solução salina isotônica (NaCl 0,9%).

Não houve necessidade de tratamento em nenhum dos animais neste estudo.

5.10

Análise estatística

Os dados foram inicialmente avaliados quanto as suas distribuições pelo teste de normalidade de Kolgomorov-Smirnov. Os dados paramétricos tiveram sua variância repetida no tempo e analisados pelo teste de comparação das médias de Tukey, na qual avaliou-se a diferença entre os grupos experimentais em seus diferentes tempos de coleta. Testes de regressão linear foram feitos para prever duas variáveis. A avaliação de dados não-paramétricos foi inicialmente submetido ao teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney.

O estudo da influência entre as relações das duas variáveis foram calculadas os coeficientes de correlação (r) de Sperman e de determinação (R^2). O grau de significância adotado foi de 5%. Os testes foram analisados no pacote estatístico Minitab release 14 (Minitab®).

Devido a presença de vários resultados nulos o movimento ruminal necessitou de ser corrigido pela fórmula $(\sqrt{x} + \sqrt{x} + 1)$, para a análise estatística ser significativa, animais que apresentaram 0, 1, 2, 3 e 4 movimentos ruminais em três minutos, receberam valores de 1; 2,41; 3,14; 3,73 e 4,34 respectivamente.

6. RESULTADOS

6.1 Dose de Polpa Cítrica empregada para induzir ARAGCC

Antes do início do experimento foi testado o protocolo de indução proposto por Barrêto Júnior et al. (2008) que provocou efetivamente ARAGCC, porém em garrotes de 160 kg, no qual se introduzia subitamente 1,65% de peso corporal de polpa cítrica (PC) no interior do rúmen. Por isso, foi testado inicialmente em uma vaca de 450 kg a quantidade correspondente de PC preconizada acima. Como o pH ruminal alcançou a partir da 9ª h valores inferiores a 5,2, atingindo o pH de 4,74 na 18ª, típico de acidose láctica ruminal, passou-se no estudo deste piloto a empregar doses menores de PC. Após testes em outras três vacas semelhantes, atingiu-se pH ruminal entre a 3ª h e a 9ª h dentro da amplitude caracterizada como ARAGCC, ou seja, de pH 5,8 a 5,2 pelo período mínimo de 5h (ZEBELI et al., 2012). A partir desses três resultados foi calculada uma equação com a seguinte fórmula:

$$Y \text{ (g)} = \text{Peso Corporal}^{0,75} \times 54,7$$

onde Y = gramas de PC.; peso corporal^{0,75} = peso metabólico, empregado para correção de pesos muito dispares, e 54,7 como um fator corretivo.

6.2 Comportamento das variáveis ruminais

6.2.1 pH ruminal no decorrer da indução

Na Tabela 3 e no Gráfico 1 estão representados os valores médios de pH ruminal dos animais que receberam a dieta padrão e dos mesmos seguida da indução de ARAGCC com polpa cítrica peletizada. Quando confrontadas entre si nos mesmos momentos apenas existiu semelhança no tempo zero ($p = 0,158$), sendo o pH na ARAGCC sempre inferior ao padrão no decorrer dos demais momentos ($p < 0,0001$).

Tabela 3 - Comparação de pH ruminal de bovinos alimentados com a dieta padrão e no decorrer da indução da ARAGCC.

TRATAMENTO	TEMPO (HORAS)							
	0	3	6	9	12	15	18	24
DIETA PADRÃO	6,85 ± 0,1 Aa	6,41 ± 0,04 BCa	6,57 ± 0,11 Ba	6,67 ± 0,1 Aba	6,31 ± 0,12 Ca	6,53 ± 0,15 Ba	6,71 ± 0,09 Aa	6,88 ± 0,08 Aa
ARAGCC *	6,93 ± 0,13 Aa	5,84 ± 0,05 Cb	5,5 ± 0,05 Eb	5,59 ± 0,24 DEb	5,82 ± 0,2 CDb	6,02 ± 0,21 BCb	6,16 ± 0,19 Bb	6,36 ± 0,26 Bb

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Notas: Letras minúsculas distintas nas linhas significam diferença estatística entre grupos.

Letras maiúsculas distintas nas colunas significam diferença entre os tempos de coleta.

* $p < 0,0001$

Dentro do grupo dieta padrão, maiores valores de pH foram encontrados no momento basal e na 9^a, 18^a e 24^a h, ocorrendo diminuição destes nos demais momentos ($p = 0,01$). A mesma comparação no grupo ARAGCC revelou que o maior pH ocorreu no tempo basal, diminuindo em seguida e atingindo os menores resultados entre a 6^a e 9^a h ($p < 0,0001$).

Gráfico 1 - Dinâmica do pH ruminal no decorrer do dia em bovinos hígidos e induzidos com ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Ainda no tocante o pH, constatou-se concentração hidrogeniônica inferior a 5,8, mas igual ou superior a 5,2 apenas no grupo induzido, com tempo de permanência nesta faixa de 547 ± 215 min (305 - 940min).

Os valores mínimos de pH durante a ARAGCC foram bem inferiores aos valores encontrados na dieta padrão, assim como o pH médio nos animais acidóticos (Tabela 4, Gráfico 2).

Tabela 4 - Valores mínimos e médios do pH ruminal no período basal (dieta padrão) e na acidótica (ARAGCC).

DIETAS	pH MÍNIMO	pH MÉDIO
PADRÃO	$6,31 \pm 0,12$ A	$6,61 \pm 0,30$ A
ACIDÓTICA	$5,38 \pm 0,16$ B	$5,62 \pm 0,10$ B

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Notas: Letras maiúsculas distintas significam diferença estatística entre grupos.

$p < 0,0001$

Gráfico 2 - Relação entre o pH mínimo e o pH médio atingido na ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Ocorreu uma relação altamente significativa e positiva ($r = 0,907$; $p < 0,0001$) entre o pH mínimo e a média do pH ruminal no decorrer do 1º dia de ARAGCC (Gráfico 2). Existiu uma relação significativa e negativa entre o pH mínimo encontrado e o tempo de duração do ARAGCC ($r = -0,688$; $p = 0,013$) (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Relação entre o pH mínimo atingido e o tempo de duração (min) que os animais permaneceram em ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

6.2.2 Comportamento das variáveis ruminais

Os teores médios de ácido acético foram máximos na 3ª h ($p < 0,0001$), sendo seguidos dos demais momentos do experimento, os quais foram superiores ao tempo basal (Tabela 5; Gráfico 4).

As concentrações ruminais de ácido propiônico foram menores ($p < 0,0001$) no tempo basal que nos demais tempos, os quais foram semelhantes entre si. Os teores de ácido butírico ($p < 0,0001$) flutuaram discretamente no decorrer do ensaio, mas de forma geral todos os momentos foram superiores ao tempo basal, sendo que na 12ª e 14ª os valores foram maiores que a 3ª h (Tabela 5; Gráfico 4).

Não existiram diferenças nas concentrações do ácido iso-butírico ($p = 0,167$). Os teores de iso-valérico ($p < 0,0001$) foram superiores nos momentos basal e na 3ª h que nos tempos seguintes. O total de AGCC foi inferior ($p < 0,0001$) no tempo basal que nos demais tempos, assim como a somatória de AGCC + lactato L ($p < 0,0001$) (Tabela 5).

Gráfico 4 - Perfil dos principais ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) ruminais no decorrer da indução de ARAGCC em vacas de corte.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Tabela 5 – Concentração dos ácidos orgânicos ruminais: os graxos de cadeia curta, glicose e os isômeros de ácido láctico L e D no decorrer da ARAGCC.

ÁCIDOS E GLICOSE	TEMPO (HORAS)							
	0	3	6	9	12	15	18	24
ác. Acético (mM/L) *	55,11 ± 6,26 C	83,85 ± 7,23 A	69,46 ± 4,78 B	70,37 ± 8,45 B	66,27 ± 7,05 B	71,59 ± 6,68 B	73,49 ± 9,08 B	71,98 ± 8,39 B
ác. Propiônico (mM/L) *	12,01 ± 2,27 B	22,46 ± 3,71 A	21,18 ± 3,60 A	24,77 ± 4,75 A	25,69 ± 3,72 A	29,00 ± 5,30 A	26,39 ± 5,59 A	24,24 ± 6,57 A
ác. Butírico (mM/L) *	5,77 ± 0,93 D	9,98 ± 1,24 C	11,18 ± 1,65 BC	13,55 ± 2,47 BC	13,91 ± 3,75 AB	14,07 ± 3,23 AB	13,37 ± 3,85 BC	10,37 ± 3,86 BC
ác. Iso-Butírico (mM/L) p = 0,167	0,95 ± 0,07 A	1,21 ± 0,53 A	0,96 ± 0,21 A	0,93 ± 0,19 A	0,91 ± 0,35 A	0,99 ± 0,38 A	1,38 ± 0,61 A	1,04 ± 0,23 A
ác. Valérico (mM/L) p = 0,022	0,43 ± 0,10 B	1,23 ± 0,15 AB	1,27 ± 0,22 AB	1,35 ± 0,27 A	1,33 ± 0,42 AB	1,35 ± 0,33 A	1,50 ± 1,11 AB	1,25 ± 1,13 AB
ác. Iso-Valérico (mM/L) *	1,30 ± 0,21 A	1,30 ± 0,40 A	0,86 ± 0,15 B	0,84 ± 0,19 B	0,74 ± 0,11 B	0,70 ± 0,15 B	0,69 ± 0,13 B	0,85 ± 0,15 B
AGCC totais (mM/L) *	75,1 ± 9,3 B	117,3 ± 13,3 A	103,7 ± 9,4 A	111,2 ± 14,1 A	101,8 ± 21,4 A	117,20 ± 7,5 A	118,4 ± 9,3 A	109,6 ± 14,4 A
AGCC totais + Lactato L (mM/L) *	75,2 ± 9,3 B	119,1 ± 14,1 A	110,9 ± 8,6 A	117,3 ± 13,7 A	112,3 ± 9,1 A	117,7 ± 7,5 A	118,5 ± 9,3 A	109,6 ± 14,4 A
Ácidos orgânicos + Glicose (mM/L) *	76,0 ± 9,3 B	119,9 ± 14,0 A	111,6 ± 8,5 A	118,1 ± 13,6 A	113,3 ± 8,7 A	118,4 ± 7,4 A	119,3 ± 9,3 A	110,4 ± 14,4 A
Rel. Ac./Prop *	4,7 ± 0,8 A	3,7 ± 0,7 B	3,3 ± 0,4 BC	2,9 ± 0,3 C	2,6 ± 0,3 C	2,6 ± 0,8 C	2,9 ± 0,7 C	3,1 ± 0,8 BC
Glicose (mM/L) *	0,74 ± 0,06 B	7,07 ± 5,52 A	0,80 ± 0,07 B	0,81 ± 0,11 B	0,79 ± 0,09 B	0,81 ± 0,12 B	0,77 ± 0,09 B	0,73 ± 0,08 B
Lactato L (mM/L) * @	0,12 C	1,17 B	7,17 A	6,16 A	3,07 B	0,49 BC	0,09 C	0,05 C
Lactato D (mM/L) ** @	0,07 B	0,42 A	0,56 A	0,47 A	-	-	-	-

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Notas: Letras maiúsculas distintas significam diferença estatística entre os tempos de coleta.

* p < 0,0001; ** p = 0,022 @ dados de mediana

Quanto maior a concentração de ácido propiônico maior a de ácido butírico ($r = 0,643$; $p < 0,0001$) e de ácido acético ($r = 0,46$; $p < 0,0001$), conforme apresentado nos gráficos 5 e 6, respectivamente. Embora tenha existido uma relação positiva e significativa ($p = 0,02$) entre o ácido acético e butírico o coeficiente de correlação foi considerado baixo ($r = 0,261$).

Gráfico 5 - Correlação entre os ácidos propiônico e butírico no decorrer da indução de ARAGCC em vacas de corte.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Gráfico 6 - Correlação entre os ácidos propiônico e acético no decorrer da indução de ARAGCC em vacas de corte.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

A razão Acetato/Propionato foi menor ($p < 0,0001$) entre os tempos 9 a 18 h em relação aos tempos basal e a 3ª h (Tabela 5; Gráfico 7).

Gráfico 7 - Relação Acetato/Propionato (mM/L) no decorrer da indução de ARAGCC em vacas de corte.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Os teores de lactato L atingiram seu ápice na 6ª e 9ª h ($p < 0,0001$), sendo superior aos demais tempos (Tabela 5; Gráfico 8). Os teores de lactato D foram menores ($p = 0,022$) no tempo basal em comparação com a 3ª, 6ª e 9ª h (Tabela 5).

Gráfico 8 - Valores da mediana de Lactato L (mM/L) ruminal no decorrer da indução de ARAGCC em vacas de corte.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

O teor médio de glicose ruminal foi mais alto ($p < 0,0001$) na 3ª h que nos demais tempos (Tabela 5; Gráfico 9).

Gráfico 9 - Valores de glicose ruminal no fluido ruminal no decorrer da indução de ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

6.2.3 Demais variáveis ruminais

O potencial de oxirredução (POR) foi superior ($p < 0,0001$) no tempo 6^a h em relação a todos os demais, com exceção da 9^a h, o qual foi maior ao tempo basal, 15^a, 18^a e 24^a h; o valor de POR na 12^a h foi mais elevado que o momento zero, 18^a e 24^a h; o tempo basal foi inferior a esses últimos dois momentos (Tabela 6; Gráfico 10).

O tempo de redução de azul de metileno foi maior ($p < 0,0001$) nos momentos 3, 6 e 9 em relação ao tempo basal e a 24^a h (Tabela 6; Gráfico 11). Gastou-se mais tampão ($p < 0,0001$) na acidez titulável (AcT) dos tempos 3, 6 e 9 que na 15^a, 18^a, 24^a h e no tempo basal; esta variável foi superior na 12^a e 15^a em relação à 24^a h e ao tempo basal (Tabela 6; Gráfico 12). A osmolaridade foi superior ($p < 0,0001$) nos tempos 3 e 6 que em todos aos demais momentos, com exceção da 9^a h que foi maior que os outros momentos analisados (Tabela 6; Gráfico 13).

Tabela 6 - Diferentes provas ruminais neste fluido no decorrer da indução de ARAGCC em vacas de corte.

VARIÁVEIS	TEMPO (HORAS)							
	0	3	6	9	12	15	18	24
POR (mV) *	4,00 ± 7,3 E	65,2 ± 20,8 C	95,9 ± 15,6 A	89,5 ± 16,1 AB	75,7 ± 13,1 BC	64,8 ± 14,3 CD	56,3 ± 13,1 CD	47,5 ± 19,9 D
TRAM (min) *	2,6 ± 0,9 C	6,1 ± 0,7 B	5,8 ± 2,5 AB	5,8 ± 3,0 AB	4,6 ± 2,8 BC	3,7 ± 1,5 BC	3,9 ± 0,8 BC	2,8 ± 1,1 C
Acidez Titulável (UA) *	3,6 ± 0,7 C	6,1 ± 1,1 A	7,0 ± 1,7 A	6,2 ± 1,5 A	5,1 ± 1,3 AB	4,1 ± 1,2 B	3,7 ± 1,3 BC	3,4 ± 1,1 C
Osmolaridade (mOsm/L) *	276,8 ± 30,5 C	405,5 ± 45,2 A	377,7 ± 23,9 A	335,2 ± 27,5 AB	304,8 ± 18,3 BC	290,5 ± 20,1 C	284,0 ± 14,8 C	279,1 ± 7,2 C

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Notas: Letras maiúsculas distintas significam diferença estatística entre os tempos de coleta.

* $p < 0,0001$

Gráfico 10 - Dinâmica do potencial de oxirredução (POR) do conteúdo ruminal no decorrer da indução de ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Gráfico 11 - Registro da prova do tempo de redução de azul de metileno (TRAM) no conteúdo ruminal no decorrer da indução de ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Gráfico 12 - Resultados obtidos na prova da acidez total titulável (AcT) no conteúdo ruminal no decorrer da indução de ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Gráfico 13 - Valores da osmolaridade no fluido ruminal no decorrer da indução de ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Na tabela 7 encontram-se os resultados obtidos dos coeficientes de correlação e seus respectivos graus de significância entre as diversas variáveis ruminais.

Tabela 7 - Correlação entre as variáveis ruminais no decorrer da indução de ARAGCC em vacas de corte.

VARIÁVEIS	TEMPO (HORAS)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
pH (1)	1	-0,97 p<0,0001	-0,53 p<0,0001	-0,69 p<0,0001	-0,64 p<0,0001	-0,08 p=0,500	-0,56 p<0,0001	-0,54 p<0,0001	0,02 p=0,89	-0,37 p<0,0001	-0,52 p<0,0001	0,55 p<0,0001	-0,65 p<0,0001	-0,65 p<0,0001
POR (2)		1	0,50 p<0,0001	0,68 p<0,0001	0,54 p<0,0001	0,06 p=0,57	0,59 p<0,0001	0,59 p<0,0001	-0,01 p=0,97	0,34 p=0,01	0,55 p<0,0001	-0,62 p<0,0001	0,67 p<0,0001	0,68 p<0,0001
TRAM (3)			1	0,32 p<0,0001	0,15 p=0,19	-0,20 p=0,08	0,37 p<0,0001	0,18 p=0,20	0,05 p=0,69	0,04 p=0,76	0,09 p=0,45	-0,24 p=0,03	0,22 p=0,05	0,22 p=0,05
AcT (4)				1	0,76 p<0,0001	0,34 p=0,34	0,77 p<0,0001	0,17 p=0,14	0,11 p=0,34	0,14 p=0,24	0,16 p=0,15	-0,19 p=0,09	0,30 p=0,01	0,30 p=0,007
Osm. (5)					1	0,63 p<0,0001	0,67 p<0,0001	0,08 p=0,50	0,01 p=0,96	0,41 p<0,0001	0,26 p=0,02	0,03 p=0,80	0,35 p=0,002	0,35 p=0,002
Glicose (6)						1	0,25 p=0,03	0,02 p=0,89	-0,12 p=0,30	0,43 p<0,0001	0,24 p=0,03	0,14 p=0,23	0,22 p=0,05	0,21 p=0,06
Lactato L (7)							1	-0,02 p=0,88	-0,01 p=0,98	0,02 p=0,86	-0,05 p=0,67	-0,18 p=0,11	0,16 p=0,17	0,16 p=0,16
ác. Prop. (8)								1	0,57 p<0,0001	0,46 p<0,0001	0,81 p<0,0001	-0,87 p<0,0001	0,81 p<0,0001	0,81 p<0,0001
ác. But. (9)									1	0,26 p=0,02	0,64 p<0,0001	-0,59 p<0,0001	0,64 p<0,0001	0,64 p<0,0001
ác. Acet (10)										1	0,83 p<0,0001	-0,10 p=0,40	0,80 p<0,0001	0,80 p<0,0001
AGCC totais (11)											1	-0,57 p<0,0001	0,98 p<0,0001	0,98 p<0,0001
Rel. Ac./Prop. (12)												1	-0,60 p<0,0001	-0,61 p<0,0001
ác. Org. (13)													1	1,00 p<0,0001
ác. Org. + gli (14)														1

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

6.3 COMPORTAMENTO INGESTIVO

A ingestão de alimentos foi inferior ($p = 0,004$) nas primeiras 24 h de acidose e no dia seguinte em relação ao tempo basal e ao 3º dia pós-indução (Tabela 8; Gráfico 14).

Tabela 8 - Consumo de Matéria Seca (kg) em kg/24h nos tempos basal e nos três dias consecutivos à indução da ARAGCC.

	Consumo de MS (kg)
Basal	$10 \pm 1,23$ A
1º dia	$3,4 \pm 1,9$ B
2º dia	$5,2 \pm 2,98$ B
3º dia	$8,82 \pm 1,87$ A

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Notas: Letras maiúsculas distintas significam diferença estatística entre os tempos.
 $p = 0,004$

Gráfico 14 - Consumo de Matéria Seca (kg) no momento basal e nos três dias seguintes à indução da ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Quanto menor foi a ingestão de matéria seca no 1º dia da indução menor também foi no 2º dia ($r = 0,823$; $p < 0,0001$) (Gráfico 15).

Gráfico 15 - Relação entre a Ingestão de Matéria Seca (kg) no 1º e 2º da ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

A ingestão de MS nos primeiros dois dias de ARAGCC (1º dia $r = 0,63$ $p = 0,05$, Gráfico 16; 2º dia $r = 0,65$ $p = 0,042$; Gráfico 17) foi diretamente correlacionada com o pH ruminal mínimo da enfermidade.

Gráfico 16 - Relação entre o pH ruminal mínimo e a ingestão de Matéria Seca (kg) no primeiro dia de ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Gráfico 17 - Relação entre o pH ruminal mínimo e a ingestão de Matéria Seca (kg) no segundo dia de ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

A ingestão de MS nos dois primeiros dias de acidose (1º dia $r = -0,473$ $p = 0,033$; Gráfico 18; 2º dia $r = -0,514$ $p = 0,035$; Gráfico 19) foi inversamente correlacionada com o tempo de duração da ARAGCC.

Gráfico 18 - Relação entre o tempo de duração da acidose e ingestão de Matéria Seca (kg) no primeiro dia ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Gráfico 19 - Relação entre o tempo de duração da acidose e ingestão de Matéria Seca (kg) no segundo dia da ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Quanto menor a média geral de pH durante a ARAGCC, maior foi a depressão no apetite dos animais enfermos no 1º ($r = -0,823$; $p = 0,009$) (Gráfico 20) e 2º dia ($r = -0,63$; $p = 0,012$) (Gráfico 21).

Gráfico 20 - Relação entre a média geral do pH na ARAGCC com a ingestão de Matéria Seca (kg) no primeiro dia da ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Gráfico 21 - Relação entre a média geral do pH na ARAGCC com a ingestão de Matéria Seca (kg) no segundo dia da ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Constatou-se que quanto maior a osmolaridade ruminal média individual no 1º dia no decorrer da ARAGCC e no momento basal menor a ingestão de matéria seca ($r = -0,739$; $p < 0,0001$) (Gráfico 22).

Gráfico 22 - Influência da osmolaridade ruminal no tempo basal e sua média com o consumo de Matéria Seca (kg) no primeiro dia de ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

O tempo gasto para consumir 1 kg de Matéria Seca foi maior ($p = 0,035$) no 1º e no 2º dia da ARAGCC que no período basal e no 3º dia, sendo que estes últimos dois dias foram semelhantes ($p = 0,825$) (Tabela 9; Gráfico 23).

Tabela 9 - Tempo gasto para consumir 1 kg de Matéria Seca no período basal e nos três dias após indução de ARAGCC.

	Tempo de consumo (min)
Basal	32 ± 4 A
1º dia	94 ± 23 B
2º dia	90 ± 31 B
3º dia	$28,5 \pm 3,4$ A

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Notas: Letras maiúsculas distintas significam diferença estatística entre os tempos.
 $p = 0,035$

Gráfico 23 - Tempo gasto para consumir 1 kg/MS (kg) no período basal e nos três dias após indução de ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

O tempo devotado à ruminação foi maior ($p < 0,0001$) no período basal, o qual foi superior ao 3º dia, que por seu turno foi maior que no 1º e 2º pós-indução de ARAGCC (Tabela 10; Gráfico 24).

Tabela 10 - Tempo (min) que os animais ruminaram no período basal e nos dias seguintes da indução de ARAGCC.

	Tempo de ruminação (min)
Basal	450 ± 68 A
1º dia	187 ± 63 C
2º dia	231 ± 87 C
3º dia	356 ± 67 B

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Notas: Letras maiúsculas significam diferença estatística entre os tempos.
 $p < 0,0001$

Gráfico 24 - Tempo de ruminação (min) no período basal e nos três dias após indução da ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Quanto maior a ingestão de alimentos, independente da condição ruminal, maior o tempo devotado à ruminação ($r = 0,84$; $p < 0,0001$; Gráfico 25).

Gráfico 25 - Relação entre ingestão de alimentos (MS) com o tempo de ruminação (min) no período basal e nos três dias após indução da ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Existiu uma relação positiva entre o pH ruminal médio obtido no período basal e durante a presença de ARAGCC com o tempo de ruminação em minutos nestes períodos ($r = 0,899$; $p < 0,0001$; Gráfico 26).

Gráfico 26 - Relação entre o pH ruminal médio com o tempo de ruminação (min) no período basal e no primeiro dia da ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Quanto mais lenta (min) foi a ingestão de 1 kg de Matéria Seca menor foi o tempo devotado à ruminação nos períodos basal e no 1º dia de indução da ARAGCC ($r = -0,717$; $p < 0,0001$; Gráfico 27).

Gráfico 27 - Relação entre o tempo gasto para consumo de 1 kg/MS e o tempo gasto na ruminação no período basal e no primeiro dia de ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

O tempo total de ócio foi maior no 1º dia de ARAGCC em relação ao período basal e 3º dia ($p = 0,002$). Não existiu diferença na duração do ócio com os animais em pé nos diferentes períodos ($p = 0,679$). Contudo, o tempo de ócio em decúbito foi mais prolongado no 1º dia que nos períodos basal e no 3º dia; com o 2º dia sendo maior que o basal ($p = 0,001$). (Tabela 11; Gráfico 28).

Tabela 11 - Tempo (min) que os animais permanecem em ócio, quer seja em decúbito, em pé e somatório das duas posições no momento basal e nos dias subsequente da indução de ARAGCC.

PERÍODO	OBSERVAÇÃO		
	Ócio total*	Ócio em pé**	Ócio decúbito***
Basal	600 ± 101 c	220 ± 76 a	380 ± 60 c
1º dia	779 ± 178 ab	251 ± 109 a	528 ± 127 a
2º dia	731 ± 46 bc	250 ± 12 a	481 ± 34 ab
3º dia	628 ± 71 c	229 ± 14 a	418 ± 55 bc

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Notas: Letras minúsculas distintas nas linhas significam diferença estatística entre os tempos.

* p = 0,002; ** p = 0,679; *** p = 0,001

Gráfico 28 - Tempo de observação (min) do período de ócio total, em pé e em decúbito no momento basal e nos três dias posteriores.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Quanto menor o pH mínimo ruminal na ARAGCC maior o tempo em que os bovinos permaneceram em decúbito no 1º dia ($r = -0,683$; $p = 0,03$) (Gráfico 29).

Gráfico 29 - Relação entre o pH mínimo ruminal e o tempo em decúbito no primeiro dia de ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Nos vários períodos, quanto maior foi o apetite menor foi o tempo em que os permaneceram em decúbito ($r = -0,716$; $p < 0,0001$; Gráfico 30).

Gráfico 30 - Relação entre a ingestão de alimento (kg) e o tempo em decúbito (min) no momento basal e nos três dias após indução de ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

6.4 EXAME CLÍNICO GERAL

Ocorreu aumento pontual na frequência cardíaca ($p = 0,016$) na 9ª h em relação ao momento zero (Tabela 12; Gráfico 31). A frequência respiratória foi maior ($p = 0,002$) na 6ª e 9ª h em relação ao momento zero (Tabela 12, Gráfico 32). A temperatura retal foi maior na 6ª e 9ª em relação a todos os tempos, com exceção da 12ª h que foi idêntico aos demais momentos, porém superior ao tempo zero ($p < 0,0001$) (Tabela 12; Gráfico 33).

Quando avaliada a relação do pH ruminal no dia da ARAGCC e a temperatura retal apurou-se uma correlação negativa e significativa ($r = - 0,714$; $p < 0,0001$) (Gráfico 34).

O movimento ruminal no momento zero foi superior aos demais tempos no decorrer do 1º dia ($p < 0,0001$) (Tabela 12, Gráfico 35). Quando foram comparados os valores transformados ($\sqrt{x} + \sqrt{x} + 1$) de movimento de rúmen obtidos na 9ª h após o oferecimento do alimento com a dieta padrão, e no 1º, 2º e 3º dias da indução de ARAGCC constatou-se que os movimentos obtidos com a dieta padrão foram superiores aos detectados nos dias 1 e 2, porém iguais ao 3º dia, que por seu turno foi superior ao dia 1º ($p = 0,001$) (Tabela 13).

Quanto maior foi a ingestão de matéria seca no decorrer do experimento, maior foi o número de movimentos ruminais ($r = 0,860$; $p = 0,0001$) (Gráfico 36).

Não ocorreram diferenças no escore ($p = 0,98$) e no pH fecal ($p = 0,79$) no decorrer do 1º dia ARAGCC. Em relação ao pH urinário existiu diferença significativa ($p < 0,0001$) entre os momentos, sendo que os valores obtidos nos tempos zero e 3ªh foram inferiores aos demais momentos a seguir. Não existiram diferenças ($p = 0,925$) na densidade urinária no decorrer da indução da ARAGCC (Tabela 12).

Tabela 12 - Comportamento das variáveis clínicas nas 24 horas após indução de ARAGCC.

VARIÁVEIS CLÍNICAS	TEMPO (HORAS)							
	0	3	6	9	12	15	18	24
FC (bpm)	78 ± 6 B	90 ± 14 AB	89 ± 14 AB	96 ± 16 A	89 ± 12 AB	86 ± 14 AB	81 ± 9 AB	80 ± 7 A
FR (mpm)	22 ± 4 A	31 ± 9 AB	33 ± 9 A	33 ± 9 A	29 ± 6 AB	26 ± 7 AB	24 ± 5 AB	25 ± 4 AB
T°C	38,2 ± 0,3 C	38,6 ± 0,4 BC	39,4 ± 0,3 A	39,2 ± 0,4 A	39,0 ± 0,4 AB	38,7 ± 0,4 BC	38,4 ± 0,3 BC	38,3 ± 0,3 BC
MR@	3,56 ± 0,4 A	2,0 ± 0,7 B	1,56 ± 0,7 B	2,21 ± 0,9 B	2,13 ± 0,8 B	2,21 ± 0,9 B	2,27 ± 0,4 B	2,13 ± 0,8 B
pH fezes	6,65 ± 0,4 A	6,69 ± 0,4 A	6,76 ± 0,3 A	6,76 ± 0,2 A	6,85 ± 0,3 A	6,72 ± 0,3 A	6,76 ± 0,3 A	6,67 ± 0,3 A
Escore de fezes	2 ± 0,6 A	2 ± 0,5 A	2 ± 0,5 A	2 ± 0,7 A	2 ± 0,5 A	2 ± 0,7 A	2 ± 0,5 A	2 ± 0,5 A
pH urina *	5,79 ± 0,4 B	5,79 ± 0,4 B	6,81 ± 0,8 A	7,28 ± 0,9 A	7,28 ± 0,7 A	6,87 ± 0,7 A	6,82 ± 0,8 A	7,20 ± 0,7 A
Densidade urinaria	1028 ± 14 A	1028 ± 11 A	1031 ± 11 A	1031 ± 9 A	1030 ± 12 A	1035 ± 16 A	1032 ± 15 A	1030 ± 13 A

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Nota: Letras maiúsculas distintas significam diferença entre os tempos de coleta.

@ MR real e convertido: zero = 1; 1= 2,41; 2 = 3,41; 3 = 3,73; 4 = 4,34

* p < 0,0001

Tabela 13 - Comparação do movimento ruminal no período basal e nos dias seguintes da indução de ARAGCC.

PERÍODO	MOVIMENTOS RUMINAIS
Basal	3,56 ± 0,40 A
1º dia	1,56 ± 0,73 C
2º dia	2,77 ± 0,76 B
3º dia	3,19 ± 0,37 AB

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Notas: Letras maiúsculas distintas significam diferença estatística entre os tempos.

MR real e convertido: zero = 1; 1 = 2,41; 2 = 3,41; 3 = 3,73; 4 = 4,34

p < 0,0001

Gráfico 31 - Frequência cardíaca (bpm) nas primeiras 24 horas nos animais induzidos para ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Gráfico 32 – Frequência respiratória (mpm) nas primeiras 24 horas nos animais induzidos para ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Gráfico 33 - Temperatura retal (T°C) nas primeiras 24 horas nos animais induzidos para ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Gráfico 34 - Relação entre a temperatura retal (T°C) e o pH ruminal nos animais induzidos para ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Gráfico 35 - Movimento ruminal (MR/3min) nas primeiras 24 horas nos animais induzidos para ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Dados originais não convertidos

Gráfico 36 - Relação entre o consumo de MS (kg) com o movimento ruminal nos animais induzidos para ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

No Gráfico 37 encontra-se a relação entre a osmolaridade ruminal média no momento basal e 1ª dia de ARAGCC com o movimento ruminal médio nestes momentos, na qual se detecta uma correlação negativa ($r = -0,712$; $p < 0,0001$).

Gráfico 37 - Relação entre a osmolaridade ruminal média (mOsm/L) no momento basal e na ARAGCC com o movimento ruminal original médio nestes momentos.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Quando avaliado o estado comportamental dos bovinos constatou-se que existiu no decorrer do primeiro dia de acidose diferentes graus de alteração neurológica, de duração temporária, assim descrito: 4 = alerta e responsivo; 3 = ligeiramente deprimido; 2 = deprimido e 1 = muito deprimido.

Estudou-se a relação destes diferentes graus de alterações neurológicas com algumas variáveis, descritas a seguir. Quanto menor o pH ruminal mínimo menor o grau de estado comportamental ($r = 0,80$; $p = 0,002$) (Gráfico 38). Quanto maior o tempo de decúbito maior menor o grau deste estado comportamental ($r = - 0,785$; $p = 0,002$) (Gráfico 39). Quanto maior o máximo teor de lactato D ruminal menor o estado comportamental ($r = - 0,621$; $p = 0,05$) (Gráfico 40).

Gráfico 38 - Relação entre o pH mínimo ruminal na ARAGCC com o grau de comportamento neurológico na ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Gráfico 39 - Relação entre o tempo de decúbito (min) com o grau de comportamento neurológico na ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Gráfico 40 - Relação entre o teor de lactato D no fluido ruminal com o grau do comportamento neurológico na ARAGCC.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

6.5 COMPORTAMENTO DAS VARIÁVEIS SANGUÍNEAS

A glicemia foi superior no momento 18^a h em relação ao momento zero ($p = 0,044$) (Tabela 14). Não existiram diferenças entre as concentrações de lactato L sanguíneo no decorrer da ARAGCC ($p = 0,474$; Tabela 14). Existiu uma relação positiva entre a somatória dos ácidos orgânicos e a glicose ruminal com o teor de glicose sanguínea ($r = 0,436$; $p < 0,0001$) (Tabela 14, Gráfico 41).

Tabela 14 - Dinâmica das variáveis sanguíneas e da soma dos ácidos orgânicos e glicose ruminal nas primeiras 24 horas após indução de ARAGCC.

VARIÁVEIS	TEMPO (HORAS)							
	0	3	6	9	12	15	18	24
Glicose (mM/L) *	4,33 ± 0,27 C	4,94 ± 0,77 BC	5,05 ± 0,53 BC	4,74 ± 0,65 BC	4,88 ± 0,56 BC	5,01 ± 0,48 BC	5,12 ± 0,62 AB	4,71 ± 0,29 BC
Lactato L (mM/L)	1,37 ± 0,46 A	1,32 ± 0,40 A	1,52 ± 0,52 A	1,77 ± 0,63 A	1,48 ± 0,57 A	1,56 ± 0,63 A	1,35 ± 0,43 A	1,26 ± 0,57 A

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

Nota: Letras maiúsculas distintas significam diferença estatística entre os tempos de coleta.

* $p < 0,044$

Gráfico 41 - Relação entre o teor de glicose sanguínea com AGCC totais no rúmen.

Fonte: (MINAMI, N.S., 2018)

7. DISCUSSÃO

A presente discussão será dividida em segmentos de acordo com a sequência de resultados e a temática abordada.

7.1 Avaliação do modelo proposto para indução de ARAGCC

Como descrito nos materiais e métodos e resultados, foi **necessária uma remodelação do protocolo** proposto por Barrêto Júnior et al. (2008) para indução da referida enfermidade. O ponto central dessa reformulação esteve centrado no peso dos animais selecionados para o experimento, muito maior que os empregados pelos autores supracitados.

A fundamentação desse problema foi devidamente descrita e desvendada por Ortolani (1995), o qual testou modelo de indução de ALR, com sacarose, em bovinos com pesos bem díspares, desde 175 a 700 kg de peso corporal e identificou que nestes últimos a acidose era bem mais intensa, caso fosse empregada quantidade fixa de açúcar por quilograma de peso animal, concluindo que reses mais pesadas são mais predispostas à acidose ruminal como um todo. Para resolver essa problemática o autor testou a correção da quantidade de sacarose fixa empregada inicialmente pelo peso metabólico e com melhor resultado quando este era ajustado com fórmula corretiva, possibilitando a indução mais uniforme, independente do peso corporal.

Assim, no primeiro animal testado com a quantidade original de polpa cítrica proposta por Barrêto Júnior e colaboradores gerou uma ALR manifesta. Frente a isso, **recalculou-se** hipoteticamente **a dose de polpa cítrica**, segundo a fórmula:

$Y (g) = \text{Peso Corporal}^{0,75} \times 54,7$, **obtendo-se sucesso**, em dois bovinos, **em alcançar as premissas conceituais da ARAGCC**, ou seja: obter pH ruminal entre 5,8 a 5,2 por no mínimo 5 h, preconizado por Zebeli et al. (2012). Mesmo assim, como descrito nos resultados, existiu uma variação biológica nos efeitos da fermentação ruminal e nas manifestações clínicas, embora todos os 10 animais em teste se enquadraram nas premissas supracitadas.

7.2 Dinâmica das variáveis ruminais: pH, ácidos orgânicos e glicose

Como já citada por Zebeli et al. (2012), a indução foi bem sucedida em provocar um pH ácido com intervalo relativamente pequeno (pH 5,8 a 5,2). Com a possibilidade de contar com um pHmetro fixo ruminal, que aferia a cada 5 min, foi possível acompanhar mais detalhadamente a dinâmica desta pivotante variável, o que aumentou os horizontes da pesquisa.

Como esperado a indução provocou, em relação ao grupo controle, uma diminuição do pH ruminal em praticamente todos os tempos, com exceção do momento zero, tal qual o descrito por Barrêto Júnior e colaboradores em 2008. O Gráfico 1 não deixa dúvidas que **a indução gerou comportamento quadrático do pH ruminal**, mostrando tipicamente a queda temporária do pH inferior a 5,8 num tempo superior a 5 h **caracterizando**, de acordo com Zebeli et al. (2012), **a acidose por AGCC**. Sem dúvida, o pico da fermentação ocorreu 6ª hora com lenta inflexão da curva nos tempos seguintes, voltando ao pH normal a partir da 15ª h.

Pouco se fala da polpa cítrica ser um possível causador de acidose ruminal. Pelo contrário, a maioria advoga o uso deste alimento exatamente como preventivo da acidose, pois o mesmo gera abundantemente ácido acético além de estimular a ruminação (WING, 1982; BERCHIELLI et al., 2006). O único trabalho, com exceção

de Barrêto Júnior et al. (2008), que emprega altas quantidades de polpa cítrica é o de Ben-Ghedalia et al. (1989) que ofereceram uma dieta com 84,4 % de polpa cítrica mas também rica em farelo soja e em óxido de magnésio, não encontrando um pH ruminal baixo (6,42). O uso destes dois últimos ingredientes mitigou uma possível ocorrência de acidose, pois a hidrólise da proteína contida na soja, que gera amônia, e o próprio tampão atuam substancialmente como alcalinizantes impedindo a diminuição drástica do pH.

Os dados de pH ruminal, deste trabalho, identificaram um pH mínimo de 5,38 $\pm$ 0,16; pH médio durante a acidose 5,62 $\pm$ 0,1 e um tempo de duração da ARAGCC de 547 $\pm$ 215 min. Os conceitos de faixa de pH mínimo e máximo da ARAGCC variam de autor para autor, com faixas máximas de 6,0 a 5,6 e mínimas de 5,2 a 5,0 o que torna complexa a comparação *pari pássio* com esses resultados. Esse grau de acidose foi aparentemente mais intenso que a maioria dos vários pesquisadores que estudaram o assunto, os quais sempre trabalharam com número inferior de bovinos. Gozho et al. (2007); Khafipour et al. (2009); Li et al. (2012) e Danscher et al. (2015) obtiveram, numa indução semelhante com uso de trigo e cevada, pH mínimo superior (5,6 a 5,1), na maioria dos casos superior ao encontrado no presente trabalho e um deles abaixo de 5,1; um pH médio que girou de 5,8 a 5,40 e um tempo médio de duração de acidose abaixo de 490 min. Num trabalho com casos clínicos Morgante et al. (2007) encontraram pontualmente pH médio de 5,68.

A geração total de AGCC encontrada nessa dissertação teve valores máximos de 118,4 mM/L, semelhante ao descrito por Danscher et al. (2015) (123,6 mM/L) e Li et al. (2012) (111,1 mM/L). Porém, Khafipour et al. (2009) e Gozho et al. (2007) constataram concentrações bem maiores (130,5 mM/L e 137,2 mM/L, respectivamente), o que gerou pHs mais baixos, como 5,1 encontrado pelos

primeiros autores. Gozho et al. (2007) empregaram duas dietas, um controle (129,7 mL/L) e outra acidótica (137,2 mM/L), mas não identificaram diferença no total de AGCC entre elas, embora apenas numa delas ocorresse pH ruminal baixo. Os autores sugeriram que na dieta acidótica isso ocorreu pelo fato da ração ser oferecida na forma de pellets, o que sabidamente diminui a produção de saliva e a capacidade tampão (MAEKAWA et al., 2002).

O excesso de polpa cítrica administrado no rúmen gerou uma rápida e grande fermentação de sua principal fonte de carboidrato: a pectina. Esse açúcar quando fermentado é transformado em grande parte em ácido acético, mas também pode gerar ácido propiônico, ácido butírico e até mesmo ácido láctico (CULLEN et al., 1986; BEN-GHEDALIA et al., 1989). Assim, como esperado **a fermentação da polpa cítrica gerou um grande aumento nos teores desses três AGCC, em especial o ácido acético, produzindo também alguma quantidade de ácido láctico** (Tabela 5).

Num experimento *in vitro* Cullen et al. (1986) identificaram que o extrato solúvel em água da polpa cítrica pode ter grande fermentação ruminal, dentro de 12 h, diminuindo o pH do meio para 5,13 com alta produção de ácido láctico L e em menor grau de ácido láctico D. O presente experimento de certa forma gerou situação semelhante a descrita por esses autores, pois o excesso de polpa cítrica decresceu o pH ruminal sensivelmente, e devido a este abaixamento de pH proporcionou possibilidade de produção significativa de ácido láctico, atingindo em alguns casos valores superiores a 50 mM/L de ácido láctico L e 13 mM/L de ácido láctico D, sempre na 6ª, quando o pH foi mais baixo. De fato, em situações em que o pH é inferior a 5,5 ocorre a diminuição da atividade das bactérias lactilíticas com grande crescimento de *Lactobacillus* e alguma atividade do *Streptococcus bovis*

produzindo ácido láctico L e em menor grau D (RUSSEL; HINO, 1985; NAGARAJA; LECHTENBERG, 2007). Porém, esse processo de diminuição do pH na 6ª não continuou, se elevando gradativamente (Tabela 3).

Especula-se que o primeiro fator para explicar esse aumento do pH seja o sensível exaurimento do substrato energético, medido indiretamente pela glicose ruminal, que já na 6ª hora retorna aos valores basais não proporcionando assim fonte energética para geração de ácido láctico (Tabela 5; Gráfico 9). Um segundo fator é a absorção dos AGCC que retira do rúmen quantidades significativas dos vários ácidos. Em revisão sobre o assunto, Pitt et al. (1996) registraram que quanto menor o pH ruminal, em especial quando este tange 5,5 maior a absorção dos ácidos, com destaque ao butírico e propiônico. Finalmente, deve influído o retorno gradativo da ruminação, embora em tempo bem inferior ao período basal, que está diretamente ligado a secreção de saliva provocando um tamponamento do meio.

Surpreendentemente, a queda no pH ruminal não foi só causada pela somatória de AGCC, ou isoladamente pelos seus principais ácidos, mas também pela participação do ácido láctico L e D (Tabela 5, Gráfico 8). O coeficiente de determinação (R^2), obtido dessa tabela, identificou que **31% da queda do pH foi causada pela produção de ácido láctico, 29% pelo ácido propiônico e 25% pelo ácido acético**. Embora a concentração de ácido láctico fosse bem inferior aos principais AGCC o poder do ácido (pK) do ácido láctico é cerca de 10 vezes superior ao propiônico e acético (ORTOLANI et al., 2016). Assim, seria errôneo afirmar que em pH mínimos como 5,38, aqui detectados, que apenas o AGCC é responsável pela acidose, como afirmam Nagaraja; Lechtenberg (2007), demonstrando o papel importante do ácido láctico na ARAGCC, principalmente quando o pH alcança os valores próximos a faixa inferior nesta categoria de acidose. Mesmo assim, Oetzel

(2017) chama a atenção que o ácido láctico pode surgir temporariamente em forma de pico, atingindo até 40 mM/L, semelhante ao aqui descrito, podendo diminuir muito o pH.

Embora o ácido acético fosse mais produzido que o ácido propiônico (Tabela 5, Gráfico 4) não foi de se espantar que o último ácido (29%) foi ligeiramente mais significativo que o acético (25%) na diminuição do pH ruminal, pois o pK do ácido de três carbonos (4,8) é menor que o de dois carbonos (5,0), ou seja, a força do ácido propiônico é 1,6 vezes superior ao acético.

Novamente, os resultados aqui encontrados, no concernente aos máximos teores de ácido propiônico (29 mM/L) e a menor relação acético/propiônico (2,6) (Tabela 5) foram semelhantes aos registrados por Li et al. (2012) (26,4 mM/L; 2,7) e Danscher et al. (2015) (30,4 mM/L; 2,5). Porém, Gozho et al. (2007) (39,8 mM/L; 2,2) e Khafipour et al. (2009) (38,3 mM/L; 2,0) encontraram valores mais extremos em relação ao presente experimento, o qual associado ao pH inferior a 5,2 sugerem que ambos provocaram um quadro inicial de acidose láctica ruminal tornando difícil a comparação com seus resultados. Por sinal, ambos não analisaram os teores de ácido láctico ruminal.

Existiu uma relação entre o aumento de produção de ácidos propiônico e butírico (Gráfico 5) e propiônico e acético (Gráfico 6). Ben-Ghedalia et al. (1989) ofereceram uma dieta rica em polpa cítrica e observaram que conjuntamente com aumento de ácido propiônico se elevaram os teores de ácido butírico. Numa revisão sobre o assunto Wing (1982) constatou que quanto mais se aumenta a quantidade de polpa cítrica mais tende a diminuir a relação ácido acético/propiônico.

Dentre os AGCC analisados menos expressivos numericamente (Tabela 5), chama a atenção **o ácido valérico, o qual tem maior concentração na 9ª e 12ª h**

em relação ao momento zero. Segundo Oetzel (2017) o aumento ocorre por atividade das bactérias lactilíticas que transformam em menor grau o ácido láctico em ácido valérico, podendo ter algum significado diagnóstico. Mesmo assim, é digno de nota, que tal achado não foi constatado pelos trabalhos Li et al. (2012) e Danscher et al. (2015).

7.3 Provas ruminais

O potencial de oxirredução **(POR)** apresentou **interessantes resultados** (Tabela 6), pois **foi muito influenciado pelo pH ruminal** ($r = - 0,98$; $R^2 = 0,94$) **e se tornou muito positivo no decorrer do quadro de ARAGCC**. Numa revisão sobre o assunto Huang et al. (2018) também registraram que quanto menor o pH ruminal maior o POR, aumentando esse valor em 60% quando o pH decrescia de 6,8 para 5,8. Um único estudo acompanhou o POR de vacas com ARAGCC (MARDEN et al., 2013), nele o pH ruminal mínimo atingiu $5,8 \pm 0,2$ e os autores verificaram também este aumento.

Dentre os vários processos de homeostase ruminal o potencial de oxirredução também tem sua importância capital, pois a maioria dos microrganismos requerem ambientes de microanaerobiose com baixa tensão de oxigênio, num meio reduzido. Uma grande quantidade de oxigênio adentra o rúmen quando da ingestão de alimento e da ruminação. Porém, existem bactérias redutoras, Gram-negativas, habitante da parede ruminal e em menor no fluido deste órgão, que transformam o oxigênio em CO_2 (HUNGATE, 1966). Contribui também para esse ambiente reduzido a quantidade de H_2 presente no meio, o qual facilita a formação de metano. O H_2 pode ser gerado quando da formação de acetato, porém ela é altamente consumida

quando da produção de propionato (HUANG et al., 2018). No presente trabalho existiu uma relação positiva e significativa ($r = 0,59$) com o propionato, também apresentando uma relação negativa ($r = - 0,62$) quanto menor foi a razão do Acetato/Propionato.

Na acidose há uma enorme transformação na microbiota ruminal, com grande diminuição das bactérias Gram-negativas e enorme incremento das Gram-positivas, em especial o *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus* sp passíveis de crescerem num ambiente bem mais aeróbico. Com a diminuição do pH no meio existe a morte ou menor atividade das bactérias Gram-negativas, em especial as redutoras, aumentando o tensão de O_2 no meio e assim o POR (HUNGATE, 1966). Desta forma, foi bastante expressiva e lógica a correlação positiva entre os teores de lactato L ($r = 0,59$) e acidez total (0,68) e total de AGCC ($r = 0,55$). Especula-se que o aumento da POR foi mais influenciado até pela presença de lactato no rúmen até a 9ª hora, deste momento até o final do experimento a exibir altos valores pela maior formação de propionato.

Esse teste poderia resolver a grande dificuldade dos autores em encontrar uma prova prática, objetiva e pouco invasiva para o diagnóstico da ARAGCC, que ainda deve ser baseado no pH obtido na ruminocentese (ENEMARK, 2009). Foi testado no presente experimento a mensuração de POR em suco ruminal obtido com sonda esofágica, mas infelizmente os resultados foram muito insatisfatórios, pois a contaminação do conteúdo ruminal com a saliva aumentou os valores de POR e do pH frustrando o uso do teste de oxirredução numa eventual prova de eleição (dados não exibidos).

Uma prova que espelha de alguma forma o POR é o tempo de redução do azul de metileno no suco ruminal (TRAM). O azul de metileno se apresenta na forma

oxidada, o qual funciona como o oxigênio, e por ação das bactérias redutoras é reduzido num novo composto incolor (SOARES et al., 2006). Considera-se um tempo normal de redução até 3 min, ocorrendo essa reação mais precocemente em bovinos bem adaptados às dietas contendo concentrados, em quantidades balanceadas (RADOSTITS et al., 2007; RODRIGUES et al., 2011). **No decorrer da ARAGCC ocorreu um aumento do TRAM, coincidindo com o auge da acidose, entre a 3ª e 9ª h.** Esse resultado identificou que nesse período a atividade das bactérias redutoras esteve diminuída, a qual foi reativada gradativamente horas mais tarde, até o final do experimento. Resultado semelhante foi descrito por Rodrigues et al. (2013) em vacas leiteiras supostamente com ARAGCC. Estranhamente, Petrovski (2017) descreveu esta prova registrando que o teste é inválido para situações em que o pH ruminal é inferior a 5,5, como verificado em muita situações no presente experimento.

É interessante confrontar os presentes resultados com os obtidos por Sousa (2017) que induziu ALR em bovinos de corte. O tempo de redução no ápice da acidose (pH = 4,12) atingiu 52 min, decrescendo muito lentamente até o final do experimento. Esse trabalho mostrou que embora o pH fosse altamente deletério para a atividade das bactérias redutoras, as mesmas não foram aniquiladas e mortas, como a maioria dos autores supõem que ocorra na acidose (DUNLOP, 1972; OWENS 1998). Essa comparação de dois tipos diferentes de acidose identifica que a ARAGCC tem uma negativa muito temporária sobre parte da flora ruminal, em especial as bactérias Gram-negativas.

A acidez titulável praticamente dobrou na 6ª hora em relação ao momento basal identificando claramente o incremento da quantidade total de ácidos

produzidos no rúmen. Surpreendentemente, esta prova nunca foi realizada em bovinos com ARAGCC.

A acidez titulável refletiu bem o pH ruminal ($r = 0,69$), o **POR** ($r = 0,68$), a osmolaridade ($r = 0,76$) e os teores de **lactato L** ($r = 0,77$), mas a **correlação foi pobre** com o **total de AGCC** ($r = 0,17$), e **individualmente com os AGCC** (Ác. Propiônico $r = 0,17$; Ác. Acético $r = 0,14$ e Ác. Butírico $r = 0,11$). A explicação do porque a acidez titulável refletir o ácido forte e não os mais fracos é puramente química. Num pH moderadamente ácido (5,8 a 5,2) os AGCC estão grandemente associados, ou seja, não-ionizados, pois essa concentração hidrogeniônica é próxima de seus pKs (acético = pk 5,0; propiônico 4,8; butírico 4,7) e dessa forma não combinam completamente com a base empregada no teste (hidróxido de sódio). Por outro lado, nesse pH ruminal as moléculas de ácido láctico se encontram bastante não-associadas, pois seu pK é 3,7 reagindo bem com o hidróxido de sódio.

Outro fator importante é que na amplitude de pH supracitado e com presença de ácido láctico os AGCC passam a ter um papel de tampão do ácido mais forte não reagindo adequadamente com o NaOH, empregado nessa prova (BROSSARD et al., 2003). Finalmente, por serem fracos os AGCC precisam de pequena quantidade de base para atingir o pH 7,0, ponto de viragem da prova, fato inverso do ácido láctico (OLIVEIRA, 2018).

A osmolaridade obtida foi surpreendentemente alta pontualmente entre a 3ª e 6ª h quando a acidose foi máxima. Tal variável tem sido relegada ao segundo plano no estudo dos pesquisadores que reproduziram experimentalmente a ARAGCC. A correlação entre a osmolaridade e as demais variáveis ruminais ajudam a explicar o aumento dessa concentração de moléculas no fluido ruminal. Chama a atenção o coeficiente de correlação com o ácido láctico L ($r = 0,67$), a glicose ($r =$

0,63) e o ácido acético ($r = 0,41$). Coincidentemente, a osmolaridade (Tabela 6, Gráfico 13) foi numericamente maior na 3ª h quando o teor de glicose ruminal teve um pico isolado (Tabela 5, Gráfico 9).

O coeficiente de determinação (R^2) identificou que majoritariamente **o lactato L foi responsável por 44,89% da osmolaridade e a glicose por 39,69 %**, cabendo aos demais AGCC apenas 6,76 %, num total de 88,34 % da causa. Possivelmente, o restante (11,66%) se oriundo de íons H^+ livres no rúmen, ou outras moléculas não identificadas. Esperava-se que o total do AGCC contribuísse mais para a elevação da osmolaridade, mas por motivos desconhecidos isso não ocorreu. **Assim, embora pouco destacados na ARAGCC, os açúcares, em especial a glicose e o ácido láctico passam a ter um papel importante na patogenia da ARAGCC.**

Porém, esse aumento temporário da osmolaridade aparentemente não interferiu no surgimento de uma possível desidratação detectável (dados não explicitados). É conhecido que os primeiros sintomas de desidratação apenas surgem após a perda de pelo menos 5% dos fluidos corpóreos via sequestro para outras cavidades, como, por exemplo, o rúmen, ou perda de fluidos por aumento de secreção e excreções (CONSTABLE et al., 2017).

7.4 Comportamento ingestivo

Essas variáveis foram um dos pontos altos da presente dissertação, já que foram acompanhadas por três dias após a indução da ARAGCC, e comparadas com um período basal de cada animal.

O ponto central dessas observações foi o acompanhamento da ingestão de matéria seca no decorrer do quadro. **Foi nítida que a ARAGCC provocou diminuição da ingestão de alimento nos primeiros dois dias** (Tabela 8; Gráfico 14), reduzindo o apetite substancialmente no primeiro dia (66,34%) e segundo (48%) se elevando ao patamar de normalidade já no 3º d. Tal constatação foi decantada e descrita por alguns autores, registrados em clássicas revisões sobre o assunto (ENEMARK, 2009; OETZEL, 2017). No trabalho que gerou o atual modelo experimental, Barrêto Júnior et al. (2008) constataram uma diminuição no apetite de 48% no 1º d e de 26% no 2º d, porém o pH ruminal mínimo foi 5,5, superior ao valor de 5,38 indicando que o atual ensaio provocou uma acidose mais intensa que no trabalho original.

Grande parte desses autores citados nas revisões utilizaram vacas leiteiras, porém destaca-se um trabalho com garrotes de corte, Brown et al. (2000), na qual foi gerada acidose com uso de administração ruminal de 50% de grãos energético. O apetite só foi restabelecido no 3º d, porém a diminuição na ingestão de alimento não foi tão marcante (1ºd 36%, e 2ºd 23%), provavelmente, pois, os animais tiveram um pH ruminal mínimo de 5,68, baixos teores de ácido láctico ruminal, em torno de 1,7 mM/L e osmolaridade em torno de 330 mOsm/L, indicando que a acidose provocada não foi tão marcante como nos presentes resultados.

Segundo Oetzel (2017) os seguintes fatores podem inibir a ingestão de alimentos: baixo pH, principalmente quando este é menor que 5,5, aumento dos teores de lactato ruminal, incremento da pressão osmótica, menor frequência e amplitude da contração ruminal e inflamação do epitélio ruminal. De fato, o presente trabalho confirma algumas dessas afirmações trazendo mais elementos e detalhes sobre essas influências.

O primeiro fato que deve ser pontuado, é que **o grau de hiporexia ($R^2 = 0,679$) no primeiro dia condiciona o que acontecerá na ingestão de alimentos no 2º da ARAGCC** (Gráfico 15), fato não descrito anteriormente. Ou seja, quanto maior a agressão física e química da ARAGCC no momento do apogeu da doença maior será a interferência no dia subsequente. O apetite é uma das variáveis mais sensíveis e passíveis de mudanças frente às injúrias provocadas pelas doenças, pela dor, pelo estresse e outras respostas inflamatórias (CONSTABLE et al., 2017). Infelizmente, a quantificação da ingestão de alimento é pouco contemplada e analisada no exame clínico rotineiro em grandes animais, podendo oferecer importantes informações ao clínico, como constatado no presente trabalho.

O atual experimento trouxe elementos comparativos de três avaliações do comportamento do pH ruminal durante a ARAGCC sobre a ingestão de alimento: 1) influência do pH mínimo, 2) tempo de duração do pH acidótico e 3) pH médio no decorrer da acidose e não no decorrer de todo o dia da acidose como a maioria dos trabalhos contemplam.

Os resultados do primeiro dia da ARAGCC são mais emblemáticos que no 2º dia. Assim, **o pH mínimo ($R^2 = 0,397$) (Gráfico 16), foi menos influente na ingestão de matéria seca que o pH médio da acidose ($R^2 = 0,679$) (Gráfico 20) tendo papel menor o tempo de duração da acidose ($R^2 = 0,224$) (Gráfico 18).**

Esperava-se que o pH mínimo fosse o ponto central na redução do apetite, porém, surpreendentemente, ele foi de menor monta que o pH médio. Analisando os dados no Gráfico 16 constata-se que um ou outro animal com pH abaixo de 5,3 apresentou uma ingestão de alimento relativamente alta interferindo definitivamente nesse coeficiente, enquanto que outros três com pH mínimo maior ingeriram menor ou igual quantidade que animais com baixíssimo pH. Assim sendo, o pH médio avaliou a ingestão de alimentos de maneira mais direta e ponderada (Gráfico 20) corrigindo eventuais discrepâncias verificadas no pH mínimo.

No segundo dia da ARAGCC tanto o pH mínimo ($R^2 = 0,423$) (Gráfico 17) como o médio ($R^2 = 0,3981$) (Gráfico 21) tiveram influências semelhantes na ingestão de alimentos, com a duração da acidose continuando a ter baixo impacto no consumo alimentar ($R^2 = 0,2641$) (Gráfico 19).

Oetzel (2017), baseado num achado em cabras com ARAGCC feito por Desnoyers et al. (2009), afirma que baixas frequência e amplitude do movimento ruminal gerado pela enfermidade potencializa a redução de consumo de matéria seca em bovinos acidóticos. De fato, **o presente trabalho identifica**, de forma clara, **que quanto menor a movimentação ruminal, menor a ingestão de alimento** ($R^2 = 0,7393$) (Gráfico 36). Segundo Braun et al. (1992) a menor frequência e amplitude do movimento ruminal secundário da acidose ruminal aumentaria o volume ruminal, quiçá diminuindo a taxa de saída do digesta, que provocaria diminuição na ingestão de alimentos. O mesmo fenômeno ocorre em bovinos que recebem dieta muito rica em fibra detergente ácida, de difícil digestão ruminal, aumentando o tempo de retenção no rúmen e diminuindo a ingestão de matéria seca (ROBINSON et al., 1985).

Outra possibilidade aventada por Desnoyers et al. (2009) e apoiada por Oetzel (2017) é que o aumento da osmolaridade ruminal poderia interferir na ingestão de alimento. De fato, **quanto maior a osmolaridade média no decorrer da ARAGCC no primeiro dia menor a ingestão de alimentos** ($R^2 = 0,5461$) (Gráfico 22). Revisando o assunto Carter; Grovum (1990) identificaram que na musculatura do saco cranial do rúmen e no retículo existem barorreceptores (receptores de tensão) que detectam a osmolaridade até 500 mOsm/L, sendo que existe uma relação negativa acima de 300 mOsm/L com a ingestão do consumo de alimentos.

Outro dado constatado no presente trabalho é o tempo em que se demora em ingerir 1 kg de matéria seca (Tabela 9; Gráfico 23). **No 1º e 2º dia da ARAGCC a ingestão de igual quantidade de alimento foi bem mais lenta que no período basal e no 3º dia** ($p = 0,035$). Constatou-se na observação do comportamento que os bovinos que mais sentiram a ARAGCC, em especial os mais letárgicos e deprimidos, não comiam automaticamente quando era oferecido o alimento de pronto, demorando mais para fazê-lo, além do fato que ingeriam de maneira mais caprichosa e em alguns casos derrubando o alimento da boca enquanto da ingestão. Notadamente, isso acontecia no período noturno do primeiro dia e na manhã do início do segundo dia quando os efeitos da acidose eram mais sentidos, voltando gradativamente a aumentar nos períodos subsequentes.

Esses presentes resultados confirmam as observações feitas por DeVries et al. (2009) em vacas de leite holandesas e por Moya et al. (2011) em novilhas de corte taurinas que no dia da ARAGCC aumentaram o tempo gasto com a ingestão de alimentos em 22% e 16,5%, respectivamente. É interessante frisar que os

mesmos momentos observados de menor ingestão de alimentos seguidos da acidose foram também descritos por DeVries et al. (2009).

O tempo devotado à ruminação foi menor nos dois primeiros dias da ARAGCC que no período basal e no 3º dia (Tabela 10; Gráfico 24). DeVries et al. (2009) constataram a mesma evidência em vacas no primeiro dia de acidose, mas não no segundo dia, enfatizando que a queda do tempo de ruminação no trabalho canadense atingiu 18%, enquanto no presente ensaio foi da ordem de 58%.

O tempo de ruminação guardou íntima relação positiva ($R^2 = 0,703$) com a ingestão de alimentos (Gráfico 25) e com o pH médio ruminal ($R^2 = 0,807$) (Gráfico 26), porém essa relação foi negativa ($R^2 = 0,513$) com o tempo de ingestão de 1 kg de matéria seca (Gráfico 27).

Num trabalho clássico de revisão do assunto, os autores identificam que quanto maior a ingestão de alimento, numa dieta balanceada, como a empregada na dieta-padrão, maior o estímulo ao tempo devotado à ruminação (GONZÁLES et al., 2012).

Em nenhum trabalho pesquisado foi correlacionado a influência do pH médio ruminal sobre o tempo de ruminação. Entretanto, DeVries et al., (2009) constataram uma altíssima influência positiva do tempo em horas cujo pH se encontrava abaixo de 5,8 e o tempo devotado à ruminação em vacas leiteiras, com alto risco de acidose. Esses mesmos autores constataram um menor tempo de ruminação por quilograma de matéria seca no primeiro dia. Curiosamente, eles observaram que ocorria o fato inverso no segundo dia da ARAGCC devido a uma tendência dessas vacas de selecionarem as partículas maiores de forragem, o que estimularia um aumento na ruminação. Advoga-se que pelo fato dos animais do presente experimento ingerirem pouca quantidade de dieta no segundo dia tal tendência não

possa ter ocorrido, ou fica mais difícil de ser observado devido a maior quantidade de sobras de alimento.

Vacas no 1º dia da ARAGCC aumentaram, em relação ao período basal e ao 3º dia, o tempo de ócio total, principalmente pela maior permanência em decúbito, ocorrendo o mesmo fato no 2º dia em comparação com o período basal (Tabela 11; Gráfico 28). Não ocorreu influência da ARAGCC sobre o tempo em que o animal permanecia em pé (Tabela 11).

O único estudo que avalia idênticas variáveis é o trabalho canadense de DeVries et al. (2009). Surpreendentemente, seus resultados foram o oposto do presente ensaio, ou seja, animais acidóticos ficam mais tempo em pé e se deitam menos que antes da acidose. Tais resultados levaram Oetzel (2017) afirmar em importante revisão que a acidose pouco altera o comportamento dos animais, com exceção de pequena diminuição do tempo de ruminação.

Foi digno de nota, que na observação do comportamento, que os bovinos mais deprimidos e que mais sentiram os efeitos deletérios da ARAGCC eram os que mais prolongadamente ficavam em decúbito. De fato, **quanto menor foi o pH ruminal mínimo no 1º dia maior o tempo em que o animal ficava em decúbito nesse período** ($R^2 = 0,466$) (Gráfico 29).

Tais resultados descontraídos merecem alguma discussão. Sem dúvida, a ARAGCC, por menor que seja seu grau, provoca no animal dor e certo desconforto. Segundo Constable et al. (2017), quanto mais intensa é a acidose ruminal maior é a depressão do estado geral. Num outro segmento desse importante livro, que não na acidose ruminal, os autores afirmam que quanto maior o grau de depressão, associado a dor, maior a tendência de o animal permanecer em decúbito, atitude esta que teria um efeito analgésico. Assim, seria lógico de se esperar um aumento

no tempo de decúbito a despeito dos achados de DeVries et al. (2009) e das afirmações taxativas de Oetzel (2017).

Nesse quesito controverso o trabalho em questão traz um novo elemento mostrando que **quanto maior a depressão neurológica maior o tempo em que o animal fica em decúbito** ($R^2 = 0,616$) (Gráfico 39) obtendo respaldo nos aforismos de Constable et al. (2017) sobre depressão, dor e permanência em decúbito.

7.5 Dinâmica das variáveis do exame clínico geral

A frequência cardíaca teve um discreto aumento significativo na 9ª h em relação ao tempo basal (Tabela 12; Gráfico 31). O aumento pontual dessa frequência não representa um achado importante do ponto de vista de um bom marcador clínico da doença. Semelhante a variável cardíaca, a frequência respiratória foi de aumento pontual e discreto na 6ª e 9ª h sem grande valor diagnóstico (Tabela 12; Gráfico 32).

Tal qual a frequência respiratória a temperatura retal também se elevou na 6ª e 9ª ($p < 0,0001$), atingindo em alguns casos ($n=5$) os valores superiores a normalidade de 39,5 (Tabela 12; Gráfico 33). Essa discreta hipertermia não foi encontrada por Gozho et al. (2007) e por Danscher et al. (2015) que não verificaram diferença em relação ao grupo controle. **A temperatura retal se correlacionou negativamente com o pH ruminal** ($R^2 = 0,510$) (Gráfico 33) indicando que o aumento da temperatura gerada por grande fermentação ruminal interfere de alguma forma na temperatura sistêmica. Esse achado foi anteriormente constatado por Reis (2011) que induziu ALR em ovinos e detectou que no auge da fermentação ruminal (pH 4,8 a 5,5) a temperatura ruminal se elevava para 40,5°C aumentando a temperatura sistêmica. Assim, embora de forma pontual a temperatura retal

aumentada, em conjunto com outros sinais, poderia levar o observador clínico a suspeitar de um quadro de ARAGCC.

Por outro lado, a análise do movimento de rúmen trouxe elementos importantes no exame clínico. **O movimento de rúmen foi sempre superior no momento zero em relação a todas as avaliações do 1º dia da ARAGCC** (Tabela 12; Gráfico 35). Quando avaliado no decorrer de vários dias constatou-se que **o menor movimento ruminal foi detectado no 1º dia de acidose, sendo que no 2º as frequências foram inferiores ao período basal** ($p < 0,0001$) (Tabela 14).

No experimento de Danscher et al. (2015) os autores detectaram uma ligeira diminuição do movimento secundário ruminal, por cinco dias, porém não descreveram casos de atonia. Por outro lado Li et al. (2012) encontraram aumento na motilidade ruminal na acidose. No presente experimento já no 3º dia a movimentação ruminal voltou ao normal, porém no 1º e 2º dias a diminuição nos movimentos foram muito mais pronunciados, que no experimento dinamarquês, observando-se que oito dos 10 animais apresentaram em algum momento atonia temporária no 1º dia, fato não contemplado em nenhum experimento de ARAGCC.

Ortolani et al. (2010) discutindo os efeitos comparativos da ALR em taurinos e zebuínos descreveu que os primeiros mantêm alguma motilidade ruminal independente do grau de acidose, enquanto que os zebuínos invariavelmente apresentam atonia, o que é um bom prognóstico pois, evita a absorção de ácido láctico. Esse mecanismo específico do zebuíno altera a patogenia da acidose ruminal, pois se por um lado a menor absorção de ácido láctico reduz o risco de ocorrência de acidose metabólica sistêmica, por outro, aumenta a osmolaridade ruminal podendo exacerbar a presença de desidratação temporária por maior

passagem de fluidos para o rúmen (ORTOLANI et al., 2010; SOUSA, 2017; OLIVEIRA, 2018).

O pH fecal e escore de fezes não se alteraram no decorrer da ARAGCC (Tabela 12), diferente do que foi descrito por Danscher et al. (2015) que verificaram discreta queda no pH fecal e presença de fezes mais amolecidas no decorrer de alguns do quadro. Quanto ao pH fecal Enemark (2009) comenta que este se apresenta mais acidótico apenas em casos em que a presença de açúcares solúveis seja alta devido a passagem automática (*by-pass*) pelo rúmen, o que nem sempre acontece na ARAGCC. Li et al. (2012) e Gakhar et al. (2008) também não encontraram tal alteração. Embora alguns autores tenham identificado a presença de fezes amolecidas no curto período da ARAGCC, Abdela (2016) comenta que apenas alguns animais podem ter essa alteração por curto período de tempo, podendo passar despercebida.

A densidade urinária não se alterou no decorrer da ARAGCC (tabela 12). Quanto à densidade é digno de nota que em momento nenhum se constatou algum sinal evidente de desidratação que poderia levar a uma menor circulação sanguínea renal com aumento automático da densidade urinária. Aumento dessa variável é muito comum em animais com ALR, com comprovada desidratação, podendo ser empregada para calcular a quantidade de tampão empregado para o tratamento desta enfermidade (MARUTA et al., 2008).

Diferente da densidade urinária ocorreu, paradoxalmente, um aumento do pH urinário a partir da 6ª h se mantendo assim o final do experimento. Era de se esperar a presença de acidúria, como constatado por Danscher et al. (2015). Porém, Enermark (2009) comentou que nem sempre o pH urinário é a melhor variável, pois na afã de corrigir a leve acidúria o rim pode aumentar a excreção de tampão por

meio de excreção de fosfato inorgânico, detectado quando da avaliação da excreção ácido-básica renal, feita por meio de titulação da urina. Em dados não apresentados nessa dissertação, mensurou-se o teor de bicarbonato sanguíneo até a 9ª h, constatando-se que em relação ao momento zero, o mesmo aumentou na corrente 23,5% com teor médio $30,1 \pm 0,4$ mM/L. Os valores de referência de bicarbonato sanguíneo para bovinos nacionais são de 20 a 29 mM/L (ORTOLANI, 2003). Assim, nesse caso é possível que com o aumento da produção de bicarbonato no sangue, acima dos teores normais, este composto tenha como via normal de eliminação a urina elevando discretamente o pH da mesma.

Embora com menor grau que na ALR, a presente **ARAGCC provocou um aumento de osmolaridade e essa gerou no animal uma diminuição na movimentação do rúmen no primeiro dia do processo** (Gráfico 37). Revisando o assunto Carter; Grovum (1990) identificaram que o aumento de osmolaridade acima de 350 mOsm/L, no rúmen, mas não no retículo, afeta negativamente a motilidade ruminal inclusive o tempo devotado a ruminação, inclusive o início da ruminação após a ingestão de alimentos.

A ARAGCC provocou diferentes graus de depressão no estado geral dos animais, sendo maior nas fêmeas que tiveram um baixo pH mínimo ruminal ($R^2 = 0,639$) (Gráfico 38) e maiores teores de lactato D ruminal ($R^2 = 0,373$) (Gráfico 40). Segundo Constable et al. (2017) as acidose ruminais provocam diferentes graus de depressão nervosa nos animais. Já em 1965, Dunlop; Hammond descreveram a possibilidade da grande formação de lactato D em bovinos com acidose ruminal correlacionando-o com quadro de depressão nervosa. Lorenz; Gentile (2014) revisaram o papel fundamental que o ácido láctico D tem sobre o sistema nervoso central gerando quadro de apatia, depressão, decúbito prolongado em bezerros

diarreicos ou com síndrome de não-formação de goteira (*ruminal drinkers*). Segundo a revisão o lactato D atravessa a barreira hematocefálica e interfere na produção de energia pelos neurônios provocando os desarranjos nervosos.

Os presentes achados contrapõem as observações feitas por Danscher et al. (2015) em vacas com ARAGCC em que a enfermidade não provoca qualquer alteração no comportamento dos animais. Provavelmente, isso ocorreu pela baixa produção do isômero L do lactato ruminal (0,28 mM/L), se comparados aos dados obtidos no presente experimento (7,17 mM/L). Ressalta-se também que enquanto no presente trabalho o pH ruminal mínimo foi 5,2 o dos autores dinamarqueses foi 5,36. Segundo Nagaraja; Lechtenberg (2007) a produção efetiva de lactato D aumenta significativamente quando o pH ruminal é inferior a 5,3, que associado a abundante oferta de substrato dá condições para a multiplicação de bactérias Gram-positivas reconhecidamente produtoras de lactato D.

7.6 Dinâmica das variáveis sanguíneas

A glicemia foi pontualmente superior na 18ª h em relação à zero hora ($p = 0,44$) (Tabela 14). Essa variável pode ser aumentada por diversas formas e fontes. Nos ruminantes cerca de 60 % do substrato gliconeogênico vem do propionato ruminal, sendo ainda produzido por certos aminoácidos gliconeogênicos, lactato L e glicerol e alguma glicose *by-pass* que adentra os intestinos. No presente experimento ocorreu um aumento muito intenso de glicose no rúmen na 3ª h (Tabela 5). Certamente, esta glicose foi altamente transformada em outros AGCC e ácido láctico, não sendo disponível para absorção neste órgão. Assim, espera-se que o propionato, produzido em maior quantidade no rúmen, pudesse contribuir com o

aumento da glicemia, mas o coeficiente de determinação entre estas variáveis foi muito baixo ($R^2 = 0,067$) (dado não apresentado nos resultados). Assim, a melhor relação obtida foi com a somatória dos ácidos orgânicos e a glicose ruminal ($R^2 = 0,19$) (Gráfico 41). É possível que os resultados não foram expressivos devido a falta de coincidência cronológica, com uma provável absorção prévia do substrato gerando um efeito posterior de elevação da glicemia.

Os resultados de lactato L sanguíneo não se modificaram com o tempo, provavelmente devido a rápida metabolização sistêmica deste composto sendo oxidado ou transformado em glicose (LEAL et al., 2007).

8. CONCLUSÕES

Quanto ao modelo de ARAGCC induzido por alta administração de polpa cítrica pode-se afirmar:

- o modelo gerou um quadro de ARAGCC típico, com faixa de pH e tempo de duração dentro dos padrões conceituais.

Quanto aos efeitos da alta administração de polpa cítrica nas variáveis bioquímicas, comportamentais e clínicas pode-se afirmar:

- ocorreu um comportamento quadrático do pH ruminal devido ao acúmulo de AGCC, em especial ácido acético, e menor grau de ácido láctico.
- a osmolaridade ruminal foi máxima no auge da acidose muito influenciada pelo ácido láctico e glicose.
- provas como o potencial de oxirredução, acidez titulável e azul de metileno podem auxiliar, em conjunto com o pH ruminal, no diagnóstico clínico.
- a acidose provocou redução no consumo de alimentos e no tempo de ruminação, e aumento no tempo de decúbito nos dois primeiros dias da enfermidade, sendo influenciados pelo pH do meio, o movimento ruminal e a osmolaridade neste fluido.
- a ingestão de alimento foi mais lenta enquanto perdurou a hiporexia.
- a acidose acarretou diferentes graus de depressão nervosa, sendo mais pronunciada quanto maior a concentração de ácido láctico D ruminal.

- a temperatura retal se eleva discretamente influenciada pela maior fermentação ruminal.
- a acidose induziu diminuição do movimento ruminal, o qual foi influenciado negativamente pela osmolaridade neste fluido.
- outras variáveis como frequências cardíaca e respiratória, pH e escore fecal, pH e densidade urinária, glicose e lactato L sanguíneos não são bons marcadores para o diagnóstico clínico da enfermidade.

9. REFERÊNCIAS

ABDELA, N. Sub-acute Ruminant acidosis (SARA) and its consequence in dairy cattle: a review of past and recent research at global prospective. **Achievements in the Life Sciences**, 10: 187-196, 2016.

ACETO, H., SIMEONE, A. J.; FERGUSON, J. D. Effect of rumenocentesis on health and productivity in dairy cows. **Journal Animal Science**, (Suppl. 1). 83: 40, 2000.

BARRÊTO JÚNIOR, R. A.; MINERVINO, A. H. H.; RODRIGUES, F. A. M. L.; ANTONELLI, A. C.; MORI, C. S.; SUCUPIRA, M. C. A.; ORTOLANI, E. L. Avaliação do potencial da polpa cítrica em provocar acidose láctica ruminal aguda em bovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, p. 419-427, 2008.

BEN-GHEDALIA, D. YOUSEF, E.; MIRON, J. The effects of starch-and-pectine rich diets on quantitative aspects of digestion in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v.24, n. 3-4, p. 289-298, 1989.

BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. Nutrição de ruminantes. Jaboticabal: Funep, 2006. v.2, 583p.

BRANCO, A. F.; ZEOULA, L. M.; PRADO, I. M. Valor nutritivo da polpa de citrus in natura para ruminantes. **Revista UNIMAR**, 16:37-48, 1994.

BRAUN, U., RIHS, T.; SCHEFER, U. Ruminant lactic acidosis in sheep and goats. **Veterinary Record**, 130:343-349, 1992.

BROWN, M. S.; KREHBIEL, C. R.; GALYEAN-REMMENGA, M. L.; PETERS, J. P.; HIBBARD, B.; ROBINSON, J.; MOSELEY, W. M. Evaluation of models of acute and subacute acidosis on dry matter intake, ruminal fermentation, blood chemistry, and endocrine profiles of beef steers. **Journal Animal Science**, 78, p. 3155-3168, 2000.

BROSSARD, L.; MARTIN, C.; MICHALET-DOREAU, B. Ruminant fermentative parameters and blood acid-base balance changes during the onset and recovery of induced latent acidosis in sheep. **Animal Research**, v. 52, p. 513-530, 2003.

CARTER, R. R.; GROVUM, W. L. Factors affecting the voluntary intake of food by sheep. 5. The inhibitory effect of hypertonicity in the rumen. **British Journal of Nutrition**, v.64, p.285-299, 1990.

COE, M. L.; NAGARAJA, T. G.; WALLACE, N.; TOWNE, E. G.; KEMP, K. E.; HUTCHENSON, J. P. Effect of virginiamycin on ruminal fermentation in cattle during adaptation to a high concentrate diet and during an induced acidosis. **Journal of Animal Science**, v. 77, n.8, p. 2259-2268, 1999.

CONSTABLE, P.; HINCHCLIFF, K. W.; DONE, S.; GRUENBERG, W. Veterinary Medicine. 11th Edition, p. 2278, 2017.

CULLEN, A. J.; HARMON, D. L.; NAGARAJA, T. G. In vitro fermentation of sugar, grains and by-product feeds in relation to initiation of ruminal lactate production. **Journal of Dairy Science**, (69) 2616-2621, 1986.

DANSCHER, A. M.; LI, S.; ANDERSEN, P. H.; KHAFIPOUR, E.; KRISTENSEN, N. B.; PLAIZIER, J. C. Indicators of induced subacute ruminal acidosis (SARA) in Danish Holstein cows. **Acta Veterinaria Scandinavica**, 57:39, 2015.

DESNOYERS, M.; GIGER-REVERDIN, S.; BERTIN, G.; DUVAUX-PONTER, C.; SAUVANT, D. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. **Journal Dairy Science**. 92:1620-1632, 2009.

DEVRIES, T. J. DOHME, F.; BEAUCHEMIN, K. A. Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: feed sorting. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 10, p. 3958-3967, 2008.

DIRKSEN, G. Sistema digestivo, p.166-228. In: DIRKSEN G., GRÜNDER H.; Stöber M. Exame Clínico dos Bovinos. 3ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2008.

DUNLOP, R. H. Pathogenesis of ruminal lactic acidosis. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v. 16, n. 3, p. 259-302, 1972.

DUNLOP, R. H.; HAMMOND, P. B. D-Lactic acidosis of ruminants. **Annuary New York Academic Science**, v.119, p.1109-1132, 1965.

DUFFIELD, T.; PLAIZIER, J. C.; FAIRFIELD, A.; BAGG, R.; VESSIE, G.; DICK, P.; WILSON, J.; ARAMINI, J.; MCBRIDE, B. Comparison of techniques for measurement of rumen pH in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 1, p. 59-66, 2004.

ENEMARK, J. M. D. The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): A review. **The Veterinary Journal**, v.176, p. 32-43, 2009.

ENEMARK, J. M. D.; JORGENSEN, R. J.; ENEMARK, P., Rumen acidosis with special emphasis on diagnostic aspects of subclinical rumen acidosis: a review. **Veterinarija ir zootechnikat**, 20:16-29, 2002.

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

GALYEAN, M. L.; RIVERA, J. D. Nutritionally related disorders affecting feedlot cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, 83: 13-20, 2002.

GAKHAR, N.; LI, S.; KRAUSE, D. O.; KHAFIPOOR, E; OMINSKI, K.; PLAIZIER, J. C. Development of alternate markers for sub- acute ruminal acidosis (SARA). *Proceedings of the Western Canadian Dairy Seminar*, p. 369, 2008.

GASTEINER, J.; GUGGENBERGER, T.; VARGA, L.; OLLHOFF, R. D. Continuous and long term measurement of reticuloruminal pH in crossbreed dairy cows in Brazil by an indwelling and wireless data transmitting unit. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.67, n.2, 2015.

GONZÁLEZ, L. A.; MANTECA, X.; CALSAMIGLIA, S.; SCHWARTZKOPF-GENSWEINC, K. S.; FERRET, A. Ruminant acidosis in feedlot cattle: Interplay between feed ingredients, rumen function and feeding behavior (a review). **Animal Feed Science and Technology**, v. 172, p. 66-79, 2012.

GOZHO, G. N.; KRAUSE, D. O.; PLAIZIER, J. C. Ruminant lipopolysaccharide concentration and inflammatory response during grain-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 90: 856-866, 2007.

HUANG, Y.; MARDEN, J. P.; JULIEN, C.; BAYOURTHE, C. Redox potential: An intrinsic parameter of the rumen environment. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, 102: 393-402, 2018.

HUNGATE, R. E. *The Rumen and its Microbes*. Academic Press, New York. 1966. 533p.

KEENER, H. H.; COLOVOS, N. F.; ECKBERG, R. B. The nutritive value of dried citrus pulp for dairy cattle. **University of New Hamps. Agr. Exp. Sta. Bull.**, n.438, 1957.

KHAFIPOUR, E.; KRAUSE, D. O.; PLAIZIER, J. C. Alfafa pellet-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows increases bacterial endotoxin in the rumen without causing inflammation. *Journal of Dairy Science*, 92: 1712-1724, 2009.

KRAUSE, M. K.; OETZEL, G. R. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: a review. ***Animal Feed Science and Technology***, 126: 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, n.4, p.971-976, 2007.

LI, S.; GOZHO, G. N.; GAKHAR, N.; KHAFIPOUR, E.; KRAUSE, D. O.; PLAIZIER, J. C. Evaluation of diagnostic measures for subacute ruminal acidosis in dairy cows. ***Canadian Journal of Animal Science***, 92: 353-364, 2012.

LORENZ, I.; GENTILE, A. D-lactic acidosis in neonatal ruminants. ***Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice***, 30(2):317-331, 2014.

MARDEN, J. P.; BAYOURTHE, C.; AURCLAIR, E. MONCOULON, R. A bioenergetic-Renox approach to the effect of live yeast on ruminal pH during induced acidosis in dairy cow. ***American Journal of Analytical Chemistry***, 4: 60-68, 2013.

MAEKAWA, M.; BEAUCHEMIN, K. A.; CHRISTENSEN, D. A. Chewing 1416-1425 activity, saliva production, and ruminal pH of primiparous and multiparous lactating dairy cows. ***Journal of Dairy Science***, v.85, p.1176-1182, 2002.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica. 3ªed. Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro. 2007. 386p.

MARUTA, C. A.; LEAL, M. L. R.; MENDES NETTO, D.; MORI, C. S.; ANTONELLI, A. C.; ORTOLANI, E. L. The measurement of urine pH to predict the amount of buffer used in the treatment of acute rumen lactic acidosis in cattle. *Ciência Rural*, v.38, p.712-722, 2008.

MATERA, A.; SPICCIATI, W.; HOLZCHUH, M. P. Fístula experimental do rúmen em bovinos. ***Revista Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo***, 26 (2): 223-227, 1989.

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

MORGANTE, M.; STELLETTA, C.; BERZAGHI, P.; GIANESELLA, M.; ANDRIGHETTO, I.; Subacute rumen acidosis in lactating cows: an investigation in intensive Italian dairy herds. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, 91: (5-6), 226-34, 2007.

MOYA, D.; MAZZENGA, A.; HOLTSHAUSEN, L.; COZZI, G.; GONZÁLEZ, L. A.; CALSAMIGLIA, S.; GIBB, D. G.; MCALLISTER, T. A.; BEAUCHEMIN, K. A.; SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K. Feeding behavior and ruminal acidosis in beef cattle offered a total mixed ration or dietary components separately. **Journal Animal Science**. 89: 520-530, 2011.

NAGARAJA, T. G.; LECHTENBERG, K. F. Acidosis in feedlot cattle. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, 23: 333-350, 2007.

NAGARAJA, T. G.; NEWBOLD, C. J.; Van NEVEL, C.J.; DEMEYER, D. I. Manipulation of ruminal fermentation. In: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. The rumen microbial ecosystem. 2.ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. p.523-632.

NAGARAJA, T. G.; TOWNE, G.; BEHARKA, A. A. Moderation of ruminal fermentation by ciliated protozoa in cattle fed a high grain diet. **Applied and Environmental Microbiology**, 58: 2410-2414, 1992.

NOCEK, J. E. Bovine acidosis: implications of laminitis. **Journal of Dairy Science**, 80:1005, 1997.

OETZEL, G. R. Diagnosis and Management of Subacute Ruminal Acidosis in Dairy Herds. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 33, n.3, p. 463-480, 2017.

OLIVEIRA, F. L .C. Avaliação comparativa de diferentes aditivos na prevenção da acidose láctica ruminal em bovinos de corte. 150f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo, 2018.

OLIVEIRA, F. L. C.; SOUSA, R. S.; ARAÚJO, C. A. S. C.; SANTOS, J. A. A.; MINAMI, N. S.; DIAS, M. R. B.; SILVA, L. F. P.; ORTOLANI, E.L. Uso da monensina e virginamicina na prevenção e controle da acidose láctica ruminal em bovinos de corte. In: I Simpósio Nacional de Bovinocultura e Bubalinocultura. Botucatu, 2017.

OLIVEIRA, F. L. C.; SOUSA, R. S.; SANTOS, J. A. A.; ARAÚJO, C. A. S. C.; WHITE, C. R.; HONDA, B. T. B.; GALVAO, A. L. C. O.; MORI, C. S.; MINERVINO, A. H. H.; ORTOLANI, E. L. Association of virginiamycin and monensin mitigates the rumen lactic acidosis effects in cattle. In: World Buiatrics Congress, 2016, Dublin. World Buiatrics Congress, 2016.

ORTOLANI, E. L.; SOUSA, R. S.; OLIVEIRA, F. L. C.; MINAMI, N. S.; DIAS, M. R. B.; Prevenção das acidoses ruminais em rebanhos leiteiros: novos conceitos. **Ciência Veterinárias dos Trópicos**, v. 19, n.3, setembro/dezembro 2016.

ORTOLANI, E. L. Acidose Ruminal: Compreendendo para prevenir. Encontro de confinamento da Scot Consultoria 2015. Ribeirão Preto, p. 55-59, 2015.

ORTOLANI, E. L.; MARUTA, C. A.; MINERVINO, A. H. H. Quadro clínico de zebuínos e taurinos submetidos à acidose láctica ruminal aguda. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, p. 253-261, 2010.

ORTOLANI, E. L. Diagnóstico de doenças nutricionais e metabólicas por meio de exame de urina em ruminantes. In: I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil, 2003, Porto Alegre. Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil. Porto Alegre, v. 1. p. 91-102, 2003.

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.462-64, 1995.

ORTOLANI, E.L. Considerações técnicas sobre o uso da sonda esofágica na colheita do suco de rúmen de bovinos para mensuração do pH. **Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v.33, n.2, p.269-275, 1981.

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

PETROVSKI, K. R. Assessmente of the rumen fluido f a bovine patient. **Dairy & Veterinay Sciences**, v. 2 (3): 1-7, 2017.

PITT, R. E.; VAN KESSEL, J. S.; FOX, D. G.; PELL, A. N.; BARRY, M. C.; VAN SOEST, P. J. Prediction of ruminal volatile fatty acids and pH within the net carbohydrate and protein system. **Journal Animal Science**. 74(1):226-44, 1996.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. W. CONSTABLE, P. D. Veterinary Medicine. 10th ed. London: Elsevier Saunders , 2007, 2156p.

REIS, L. F. Estudo comparativo do uso de probiótico e monensina na prevenção e tratamento de acidose láctica ruminal aguda em ovinos.115f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

ROBINSON, P. H.; SNIFFEN, C. J.; VAN SOEST, P. J. Influence of level of feed intake on digestion and bacterial yield in the forestomachs of dairy cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, 65(2): 437-444, 1985.

RODRIGUES, F. A. M. L.; MINERVINO, A. H. H.; BARRÊTO JÚNIOR, R. A.; ANTONELLI, A. C.; REIS, L. F.; ARAÚJO, C. A. S. C.; FERREIRA, R. N. F.; VECHIATO, T. A. F.; MORI, C. S.; ORTOLANI, E. L. Avaliação clínica do uso de solução salina hipertônica no tratamento da acidose láctica ruminal aguda em bovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 48, p. 446-453, 2011.

RODRIGUES, M.; DESCHK, M.; SANTOS, G. G. F.; PERRI, S. H. V.; MERENDA, V. R.; HUSSNI, C. A.; ALVES, A. L. G.; RODRIGUES, C. A. Avaliação das características do líquido ruminal, hemogasometria, atividade pedométrica e diagnóstico de laminite subclínica em vacas leiteiras. Pesquisa Veterinária Brasileira, 33 (Supl1.): 99-106, dezembro 2013.

ROSENBERGER, G. **Exame clínico dos bovinos**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2^o ed. p. 429, 1983.

RUSSELL, J. M.; HINO, T. Regulation of lactate production in Streptococcus bovis: A Spiraling effect that contributes to rumen acidosis. **Journal of Dairy Science**, v.68, p.1212-1721, 1985.

SANTOS, F. A. P.; SITTA, C.; CHAGAS, L. J. Aditivos para bovinos: antibióticos e outras alternativas. Encontro de confinamento da Scot Consultoria 2015. Ribeirão Preto, p. 60-64, 2015.

SANTOS, F. A. P.; MENEZES Jr., M. P.; SIMAS, J. M. C., PIRES, A. V.; NUSSIO, C. M. B. 2001. Processamento do grão de milho e sua substituição parcial por polpa de citros peletizada sobre o desempenho , digestibilidade de nutrientes e parâmetros sanguíneos. **Acta Scientiarum**. 23(4): 923-931, 1982.

SATO, S. Pathophysiological evaluation of subacute ruminal acidosis (SARA) by continuous ruminal pH monitoring. **Animal Science Journal**. (87) 168 – 177, 2016.

SLANINA. L.; ROSSOW, N. Zur speziellen diagnostik einiger erkrankungen des vordarm-lambmagcn komplexes. *Mh. Vet.-Med.*, v. 19, p. 282-91, 1964.

SOARES, P. C.; MARUTA, C. A.; SUCUPIRA, M. C. A.; MORI, C. S.; KITAMURA, S. S.; ANTONELLI, A. C.; ORTOLANI, E. L. Diagnóstico de carência energética em bovinos por testes de metabolismo ruminal. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 43: 33-41, 2006.

SOUSA, R. S. Avaliação de anti-inflamatórios não esteróides no tratamento da laminite asséptica aguda decorrente de acidose ruminal por oligofrutose em bovinos. 114f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo, 2017.

SNYDER, E.; CREDILLI, B. Diagnosis and Treatment of Clinical Rumen Acidosis, **Veterinary Clinical North American Food Animal Practice**. 33(3):451-461, 2017.

STRABEL, D., EWY, A.; KAUFMANN, T.; STEINER, A.; KIRCHHOFER, M. Rumenocentesis: A suitable technique for analysis of rumen juice pH in cattle. **Schweizer Archiv Fur Tierheilkunde**, 149: 301-306, 2007.

TAMMINGA, S.; VAN VUUREN, M. Formation and utilization of end products of lignocelluloses degradation in ruminants. **Animal Feed Science and Technology**. v.21, p.141-159, 1988.

VECHIATO, T. A. F. Estudo retrospectivo e prospectivo da presença de abscessos hepáticos em bovinos abatidos em um frigorifico paulista. 102f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo, 2009.

ZEBELI, Q.; METZLER-ZEBELI, B. U.; AMETAJ, B. N. Meta-analysis reveals threshold level of rapidly fermentable dietary concentrate that triggers systemic inflammation in cattle. **Journal of Dairy Science**, (95) 2662-2672, 2012.

WING, J. M. Citrus feedstuffs for dairy cattle. Gainesville: University of Florida, Agricultural Experiment Station, 1982, 25p.