UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

VICENTE LUIZ MACÊDO BUARQUE

**Uso de aditivos para prevenção da urolitíase em cordeiros alimentados
com dietas com elevada proporção de concentrado**

Pirassununga

2021

VICENTE LUIZ MACÊDO BUARQUE

**Uso de aditivos para prevenção da urolitíase em cordeiros alimentados
com dietas com elevada proporção de concentrado**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leme

Pirassununga

2021

Ficha catalográfica Elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B917u Buarque, Vicente Luiz Macêdo
 Uso de aditivos para prevenção da urolitíase em
 cordeiros alimentados com dietas com elevada
 proporção de concentrado / Vicente Luiz Macêdo
 Buarque ; orientador Prof. Dr. Paulo Roberto Leme.
 -- Pirassununga, 2021.
 100 f.

 Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
 Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia
 de Alimentos, Universidade de São Paulo.

 1. Urolitíase animal. 2. Cloreto de cálcio. 3.
 Cloreto de amônio. 4. Ácido benzoico. I. Leme, Paulo
 Roberto, orient. II. Título.

VICENTE LUIZ MACÊDO BUARQUE

Uso de aditivos para prevenção da urolitíase em cordeiros alimentados com dietas com elevada proporção de concentrado trado

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leme

Data de aprovação: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Daniel Montanher Polizel

Instituição: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ.

Prof. Dr. Evandro Maia Ferreira

Instituição: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ.

Profa. Dra. Gabriela Aferri

Instituição: Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Instituto de Zootecnia – IZ.

Prof. Dr. Ricardo Lopes Dias da Costa

Instituição: Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Instituto de Zootecnia – IZ.

Prof. Dr. Saulo da Luz e Silva

Instituição: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA.

Dedicatória

*“Quando se sonha sozinho é apenas um sonho.
Quando se sonha juntos é o começo da realidade”*

Miguel de Cervantes

Natália Marques, sinto-me honrado
por partilhar a minha vida ao teu lado.

*“É graça divina começar bem. Graça maior persistir na caminhada certa.
Mas graça das graças é não desistir nunca”.*

Dom. Helder Câmara

Orgulho-me da família que tenho, meus Pais
Lourinaldo e Vilma Buarque *in memoriam* e minha
irmã, Virgínia Buarque que tão bravamente
lutaram para que este dia pudesse chegar...
E ele chegou!

AGRADECIMENTOS

É com muita emoção e entusiasmo que expresso meus mais sinceros agradecimentos a todos os que fizeram parte da construção e realização desta obra, que tem, para mim, um sabor de sonho.

Em especial,

Primeiramente a Deus, por me permitir galgar mais esta etapa em minha vida, com saúde e perseverança. Que nunca me falte a Fé, “a Ti Senhor toda honra e toda glória”.

Ao Professor Dr. Paulo Roberto Leme, por sua orientação, amizade e os ensinamentos que levarei por toda a minha vida (embora não tenha aprendido a pescar), terá sempre minha grande admiração, respeito e apreço.

Ao Professor Dr. Saulo da Luz e Silva, por ter me dado uma oportunidade desde o estágio obrigatório, lá em 2015 e que agora se torna um título tão importante em minha vida, além de toda a colaboração, ensinamentos e por sua amizade, muito obrigado.

À Professora Dr^a. Sarita Bonagurio Gallo, por sua contribuição e conhecimentos compartilhados desde a fundamentação até a conclusão deste trabalho.

Aos Professores Drs. Arlindo Saran Netto, Luciane Martello, Evaldo Antônio Lencioni Titto, Cristiane Gonçalves Titto, Ricardo Strefezzi, Lúcio Francelino de Araújo, Paulo Mazza Rodrigues, Rosana Ruegger Corte, Rodrigo Goulart, Daniel Polizzel, Angélica Simone Cravo Pereira e tantos outros pelos ensinamentos e oportunidades.

A Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA e a Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado e pelo privilégio de poder ter feito parte desta instituição tão importante em minha vida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), a qual agradeço pelo auxílio financeiro concedido durante o curso de Doutorado.

À minha esposa Natália pelo companheirismo e incentivo de sempre, que me fazem querer evoluir a cada dia, partilhando minha vida ao seu lado, obrigado meu amor e como diz o ditado: “por trás de um grande homem, há sempre uma grande mulher”, te amo e não poderia esquecer nosso filhote de 4 patas o Lampião, que sempre dá um jeito de nos animar nos momentos difíceis.

À Dr^a. Nara Cônsolo por toda a nossa amizade e atenção que sempre teve comigo. Te desejo todo o sucesso do mundo, você é brilhante. Que nossa amizade e parceria perdurem por toda vida.

Meus agradecimentos à Helena Bezerra, pela amizade, parceria e companheirismo de sempre e por sua importante e ativa participação na preparação e condução deste trabalho, meu muito obrigado.

Aos meus companheiros de confinamento Guilherme Rissi, Natália Marques e Regner Ítalo por nossas labutas e risadas diárias, vocês foram fantásticos. Espero também ter contribuído em nossas conversas com o conhecimento de cada um de vocês.

Aos demais companheiros de Laboratório, por todas as contribuições prestadas e pelas amizades construídas.

Aos meus amigos irmãos Tiago Del Valle “Tite”, Júlia Avansi “Julinha”, Rafael Teixeira “Ceará”, Mauro Sérgio “Bonzinho”, Jefferson Gandra “Jeffinho”, Gustavo Almeida “Boi”, Juliana Santos “Pantaneira”, Elissandra Zílio “Michael”, Elmeson Ferreira “Mineirinho”, Marjorie Kaori “Cala”, Alexandre Guizelini “Xandy”, Igor Motta “Igão”, Vitor Hugo “Vitinho”, Rafael Gomes “Carimbó”, Jesus Suarez “Colômbia”, Gabriel Fernández “Costa Rica”, Fernando Iene “Fefê”, Gustavo Bicudo “Todinho”, Roberto Cantóia “Serjão Berranteiro”, Lucas Sakamoto “Japonês”, todos os “Rondônias”, Regiane Sousa “Reja” Leonardo Barreira “Léo”, Juliana da Silva “Ju”, Juliana Bombardelli “Ju²”, Alex Zerbini e Bárbara Silva que, desde a minha chegada em Pirassununga, me acolheram como um irmão e por tantas histórias vividas, cervejas, churrascos e as boas

lembranças, além de todos os inúmeros amigos que porventura não tenha mencionado, sou grato a Deus pelo privilégio de partilhar minha vida com vocês aqui, levarei todos sempre no coração e desejando sempre muito sucesso.

Aos funcionários do Departamento, técnicos, secretários, pessoal da limpeza e segurança, aos amigos Ricardo Galeni, Zanquetin, Manoel (Mané), Maico Godoy, Cláudio Romão, Anderson Pagoti (Bola), Zézinho, Tião, Ione, Zé Humberto e Sterman funcionários da Fábrica de ração e aos Funcionários do Abatedouro Elso, Maurício, Andreza, Dito Rodrigues, Scharlack e todos os demais funcionários que contribuíram para o bom andamento do experimento, amigos que levarei sempre comigo.

Aos amigos Paulo Sérgio “PS”, Bruno Sampaio e Renan Ferreira por todo apoio e amizade que data de longos anos, por partilharmos a mesma morada e consolidarmos nosso respeito e admiração uns pelos outros, sucesso meus amigos.

Como diz o 4º mandamento “Honra a teu pai e a tua mãe, para que se prolonguem os teus dias na terra que o Senhor teu Deus te dá” Êx.20:12. Meu eterno agradecimento em forma de homenagem aos meus pais Lourinaldo e Vilma Buarque *in memoriam* e à minha irmã Virgínia Buarque, por todos os sacrifícios feitos (que não foram poucos), por sempre me mostrarem que todos nós somos capazes e é por isso estou aqui hoje, tendo o prazer de agradecê-los pela realização deste sonho que sempre foi nosso, meus agradecimentos estendem-se aos meus sogros Geraldo e Lúcia Marques, enfim a todos os familiares e amigos que sempre torceram e torcem por mim.

O meu muito obrigado a todos vocês!

Epígrafe

“A natureza pode ser cruel, mas não temos que ser”

Temple Grandin

“Devo a Ele a oportunidade que tive de chegar onde cheguei. Muitas pessoas têm essa capacidade, mas não têm a oportunidade. Ele a deu para mim, não sei porquê. Só sei que não posso desperdiçá-la”.

Ayrton Senna

RESUMO

BUARQUE, V. L. M. Uso de aditivos para prevenção da urolitíase em cordeiros alimentados com dietas com elevada proporção de concentrado

Objetivou-se com este estudo avaliar a eficácia de aditivos na prevenção da urolitíase em cordeiros alimentados com dietas com elevada proporção de concentrado, pela acidificação urinária e seu efeito no desempenho. Foram utilizados 32 cordeiros machos, não castrados, cruzados das raças Dorper x Santa Inês, com idade de 50 ± 5 dias, e peso inicial de 23 ± 5 kg, alojados em baias individuais, alimentados com dieta composta por 6% de volumoso (feno de "Coastcross" *Cynodon ssp.*) e 94% de concentrado e submetidos a quatro tratamentos: controle sem inclusão de aditivos (CTL), adição de cloreto de amônio 5,0 g/kg de MS (CLA), adição de cloreto de cálcio 6,3 g/kg de MS (CLC), e adição de ácido benzoico (ABZ) 5,0 g/kg de MS. Os animais foram pesados ao início e a cada 14 dias. Amostras de sangue e urina foram colhidas no dia anterior no início do período experimental e a cada 28 dias para exames de hemograma, bioquímica sérica e urinálise. Após 60 dias, os animais foram abatidos e amostras de tecidos do sistema urinário foram colhidas para avaliação. Também foi feito o escore de rumenite a morfometria de papilas e a avaliação cecal de cada animal. O pH e volume urinário e parâmetros sanguíneos foram analisados como medidas repetidas no tempo, considerando o tratamento, o tempo e sua interação como efeitos fixos e efeito aleatório de bloco e animal. Estruturas de covariância foram modeladas e ajustadas. Quando um efeito significativo foi observado ($P < 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste t de Student. Os escores de rumenite e de lesão cecal foram analisados considerando uma distribuição de Poisson, utilizando o procedimento GLIMMIX do SAS. Os tratamentos não afetaram as características de desempenho, morfometria de papilas, e escores de lesão cecal ou ruminal. O CLC apresentou menor pH cecal ($P = 0,034$). Menor pH urinário ocorreu nos tratamentos CLC e CLA ($P < 0,001$). Os tratamentos não influenciaram as variáveis sanguíneas, porém, o tempo influenciou alguns desses parâmetros ($P < 0,05$). Os aditivos não foram eficazes na prevenção da urolitíase, contudo, não houve obstrução do trato urinário. Nas condições deste estudo, o CLC foi o aditivo que mais reduziu o pH urinário e pode ser utilizado em substituição ao CLA para essa finalidade.

Palavras-chave: Urolitíase; cloreto de cálcio protegido; cloreto de amônio; ácido benzoico.

ABSTRACT

BUARQUE, V. L. M. Use of additives to prevent urolithiasis in lambs fed diets with a high proportion of concentrate

The aim of this study was to evaluate the effectiveness of additives in preventing urolithiasis in lambs fed diets with a high proportion of concentrate through urinary acidification and its effect on performance. Thirty-two male, non-castrated, crossbred Dorper × Santa Inês lambs, aged 50 ± 5 days, and initial weight of 23 ± 5 kg, housed in individual pens, fed a diet composed of 6% forage (hay of “Coastcross” *Cynodon* ssp.) and 94% of concentrate and submitted to four treatments: control without inclusion of additives (CTL), addition of ammonium chloride 5.0 g/kg of DM (ACL), addition of calcium chloride 6.3 g/kg MS (CCL), and addition of benzoic acid (BZA) 5.0 g/kg MS. The animals were weighed at the beginning and every 14 days. Blood and urine samples were collected the day before the start of the experimental period and every 28 days for blood count, serum biochemistry and urinalysis. After 60 days, the animals were slaughtered and tissue samples from the urinary system were collected for evaluation. The rumenite score, papillary morphometry and caecal evaluation of each animal were also performed. Urinary pH, sample volume and blood parameters were analyzed as repeated measures over time, considering treatment, time and their interaction as fixed effects and random effect of block and animal. Covariance structures were modeled and fitted. When a significant effect was observed ($P < 0.05$), the means were compared by Student's t test. Rumenitis and caecal lesion scores were analyzed considering a Poisson distribution, using the SAS GLIMMIX procedure. The treatments did not affect performance characteristics, papilla morphometry and caecal or rumen lesion scores. The CCL showed lower cecal pH ($P = 0.034$). Lower urinary pH occurred in the CCL and ACL treatments ($P < 0.001$). Treatments did not influence blood variables, however, time influenced some of these parameters ($P < 0.05$). The additives were not effective in preventing urolithiasis, however, there was no urinary tract obstruction. Under the conditions of this study, CCL was the additive that most reduced urinary pH and can be used to replace ACL for this purpose.

Keywords: Urolithiasis; protected calcium chloride; ammonium chloride; benzoic acid.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição percentual das dietas com base na matéria seca.....	42
Tabela 2. Características de desempenho de cordeiros confinados recebendo diferentes aditivos para acidificação urinária.....	54
Tabela 3. Parâmetros sanguíneos obtidos através do eritrograma de cordeiros confinados alimentados com dietas com elevada proporção de concentrado.	57
Tabela 4. Parâmetros sanguíneos obtidos através de leucograma de cordeiros confinados alimentados com dietas com elevada proporção de concentrado.	57
Tabela 5. Bioquímica sérica de cordeiros confinados alimentados com dietas com elevada proporção de concentrado.	57
Tabela 6. Valores de pH e volume urinário amostral de cordeiros confinados recebendo diferentes aditivos para acidificação urinária.....	57
Tabela 7. Características físico-químicas das amostras de urina de cordeiros alimentados com dietas com elevada proporção de concentrado em porcentagem.	59
Tabela 8. Características de morfometria de papilas ruminais e pH cecal de cordeiros confinados recebendo diferentes aditivos para acidificação urinária.....	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Confinamento experimental da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA/USP.	40
Figura 2. Amostras de sangue após a centrifugação para avaliação dos parâmetros séricos.	45
Figura 3. Amostras de urina e sangue, para exames de urinálise e bioquímica sérica.	47
Figura 4. Carcaças dos animais abatidos, após 24h de refrigeração em câmara frigorífica, a uma temperatura de 2-4 °C.	48
Figura 5. Vesícula urinária e ureter de ovinos, para avaliação da presença de urólitos e lesões.	49
Figura 6. Rúmen de cordeiro, para avaliação do escore de rumenite.	50
Figura 7. Fragmento de rúmen de cordeiro para contagem de papilas.	51
Figura 8. Ceco de cordeiros submetidos a dietas com elevada proporção de concentrados para avaliação do escore de lesão cecal.	52
Figura 9. Processo uretral e uretra sem presença de cálculo em ovino. H.E. obj.10x.	68
Figura 10. Ureter com presença de cálculo apresentando estenose luminal intensa em ovinos. HE, obj.4x.	68

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Valores médios de pH urinário de cordeiros alimentados com dietas com elevada proporção de concentrado em diferentes momentos de avaliação. 62

Gráfico 2. Volume urinário da amostra de cordeiros alimentados com dietas com elevada proporção de concentrado em diferentes momentos de avaliação..... 64

Gráfico 3. Escore de rumenite em ovinos confinados alimentados com dietas com elevada proporção de concentrado. 69

Gráfico 4. Escore de lesão cecal em ovinos confinados alimentados com dietas com elevada proporção de concentrado. 71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABZ – Tratamento ácido benzoico

AOAC – Association of Official Agricultural Chemists

BCAD – Balanço cátio-aniônico da dieta

Ca – Cálcio

Cl – Cloreto

CLA – Tratamento cloreto de amônio

CLC – Tratamento cloreto de cálcio

CTL – Tratamento controle

EA – Eficiência alimentar

GMD – Ganho médio diário

H⁺ – Hidrogênio

IMS – Ingestão de matéria seca

K – Potássio

MS – Matéria seca

Mg - Magnésio

Na⁺ - Sódio

NNP – Nitrogênio não protéico

NRC – National Research Council

P – Fósforo

PC – Peso corporal

pH – Potencial hidrogeniônico

S⁻ – Enxofre

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	12
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE GRÁFICOS	16
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	17
1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	26
3. JUSTIFICATIVA	37
4. OBJETIVO	38
4.1. Objetivos específicos	38
5. MATERIAL E MÉTODOS	39
5.1. Local	39
5.2. Animais, instalações e tratamentos	39
5.3. Características de desempenho	43
5.4. Hemograma	43
5.5. Bioquímica sérica	44
5.6. Eletrólitos sanguíneos	45
5.7. Coleta de urina e urinálise	46
5.8. Abate dos animais	48
5.9. Avaliação do trato urinário	49
5.10. Escore de rumenite, morfometria ruminal e avaliação cecal	50
6. ANÁLISE DOS RESULTADOS	53
7. RESULTADOS	54
7.1. Desempenho	54
7.2. Parâmetros sanguíneos (eritograma)	55
7.3. Parâmetros sanguíneos (leucograma)	55
7.4. Bioquímica sérica	58
7.5. pH urinário	60
7.6. Urinálise	64
7.7. Histologia	68
7.8. Escore de rumenite	69
7.9. Morfometria de papilas e pH cecal	70
7.10. Escore de lesão cecal	70

8. DISCUSSÃO	72
9. CONCLUSÕES	89
10. REFERÊNCIAS	90

1. INTRODUÇÃO

Segundo projeções da Organização das Nações Unidas, a população mundial deve crescer cerca de 2 bilhões de pessoas, dos atuais 7,7 bilhões para aproximadamente 9,7 bilhões de pessoas até 2050 (ONU, 2019), esta projeção de crescimento traz consigo uma elevação da demanda por alimentos. Neste cenário, o crescimento da renda, principalmente nos países em desenvolvimento, tende a acelerar uma transição dietética, aumentando o consumo de carnes e produtos lácteos em relação aos cereais. Consequentemente, isso acarretará mudanças proporcionais na produção de alimentos e aumento da pressão sobre o uso dos recursos naturais (FAO, 2017).

Como em toda atividade pecuária voltada para a produção de carne, e na ovinocultura não é diferente, uma das maneiras de intensificar o sistema de produção é o confinamento, com a utilização de dietas com elevada proporção de concentrado. Apesar de ser o sistema que pode resultar em maior desempenho, esse tipo de estratégia, pode ocasionar o aumento da ocorrência de enfermidades de origem nutricional ou metabólica, dentre elas a urolitíase (ANTONELLI et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2012). A urolitíase é uma condição associada à presença de cálculos ou a quantidades excessivas de cristais acumulados no trato urinário. Estes cálculos, denominados urólitos, quando formados, tornam-se um problema mais sério a partir do momento em que provocam a obstrução total ou parcial das vias que compõem o sistema urinário, levando à condição clínica da urolitíase obstrutiva (AQUINO NETO et al., 2007), que pode ter consequências mais graves, como a redução do desempenho produtivo ou até mesmo o óbito dos animais.

Esta doença é frequentemente observada em ovinos criados em sistemas intensivos de produção (NRC, 2007), e considerada uma enfermidade de etiologia complexa (FERREIRA et al., 2018), pois, diversos fatores podem contribuir para a formação de cálculos do sistema urinário, que podem ser provocados pelo desequilíbrio nutricional da dieta e a dureza da água consumida pelos ruminantes (SACCO; LOPES, 2011), bem como por fatores fisiológicos, devido a anatomia da uretra, sexo, idade, raça, restrição de água, além da

estação do ano, como em épocas de maior escassez de água e região geográfica em áreas mais áridas (VIDELA; VAN AMSTEL, 2016).

De acordo com Riet-Correa et al. (2008), apesar da ocorrência em ambos os sexos, a maior incidência ocorre em machos, pelo formato anatômico do trato urinário, constituído pela flexura sigmoide, curvatura isquiática e o processo uretral, que são os principais sítios para deposição dos urólitos, tendo como consequência a obstrução das vias urinárias. Esta enfermidade pode ser identificada pela observação da manifestação de alguns sinais clínicos como apatia ou inquietação, estrangúria, contração e chutes abdominais, com exposição do pênis, alterações de postura (arqueamento das costas, abdução dos membros pélvicos e cauda elevada), glândula congestionada, áreas de necrose, rigidez à palpação, além de desconforto e sensibilidade ao exame do trato urogenital (MACIEL et al., 2019).

Após o surgimento dos sinais clínicos da urolitíase obstrutiva, sua reversão dificilmente é exitosa e, geralmente, os animais tornam-se inaptos à reprodução e são descartados (CARDOSO JÚNIOR et al., 2017). Nesses casos, são empregadas intervenções cirúrgicas (OMAN et al., 2019), que apresentam elevados custos e demandam cuidados especiais, pós intervenção, que vão além destes procedimentos e que, por consequência, tornam-se inviáveis dentro do âmbito da cadeia ovina, produtora de carne.

Os tipos de urólitos mais comuns formados no trato urinário dos ovinos, alimentados com dietas com elevada proporção de concentrado, são os cálculos a base de estruvita (fosfato de amônio e magnésio). A formação destes cristais ocorre em pH variando entre 7,2 e 8,8 e sua dissolução em pH menor que 6,5 outros tipos de cristais, como os de apatita (fosfato de cálcio), ocorrem em uma faixa de pH mais intermediária, entre 6,6 e 7,8. Desta forma, o pH urinário desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de carbonatos de cálcio, urólitos de apatita e estruvita (EWOLDT et al., 2006), comprovando sua importância sobre a concentração urinária destes compostos calculogênicos.

Do ponto de vista nutricional, acredita-se que, a principal causa para o desenvolvimento da urolitíase esteja atribuída ao desequilíbrio na relação cálcio

(Ca), fósforo (P) e magnésio (Mg), provenientes da dieta. Na terminação de ovinos, o uso de dietas com elevada proporção de milho, pode resultar em um elevado teor de P, oriundo deste grão, resultando em uma baixa relação Ca:P como resultado, a urina torna-se mais alcalina, pela elevação do pH, favorecendo o processo de formação dos cálculos, denominado litogênese (FREEMAN et al., 2010), bem como a diminuição da capacidade habitual que o animal possui para dissolver naturalmente os urólitos formados.

Ainda que dietas com elevada proporção de concentrado bem formuladas possam apresentar em sua composição percentual uma relação Ca:P adequada, é possível que animais submetidos a este tipo de manejo nutricional possam desenvolver a urolitíase, sendo necessário para estes casos o uso de estratégias nutricionais de caráter preventivo. Para tanto, um método profilático eficiente, para dissolução destes cálculos tem sido obtido por meio da acidificação urinária (JONES; STREETER e GOAD, 2009), que pode ser obtida através do uso de aditivos acidificantes fornecidos aos animais via dieta.

Del Claro et al. (2006), relataram como estratégias em pesquisas voltadas à nutrição de ruminantes, a inclusão de ânions na dieta, por manipularem o equilíbrio ácido-básico através do balanço cátion-aniônico da dieta (BCAD), que representa a diferença entre os cátions e os ânions fixos totais da dieta. A associação desses mecanismos pode resultar em uma alcalose ou acidose metabólica modificando o desempenho, bem como, o metabolismo de outros macrominerais.

Dietas aniônicas induzem a acidose metabólica, por meio de um aumento compensatório de íons de hidrogênio (H^+) extracelular, onde o excesso de H^+ é excretado pelos rins para manter a eletro neutralidade, produzindo urina com um pH mais baixo (GOFF, 2000). Para vacas leiteiras os valores ideais de BCAD já são estabelecidos, em função da utilização dessa estratégia como forma de minimizar os efeitos da hipocalcemia puerperal, porém, para pequenos ruminantes, esses valores ainda precisam ser definidos. Dietas mais acidogênicas, podem resultar na acidificação urinária e com isso, auxiliar na prevenção do desenvolvimento da urolitíase, evitando perdas de produtividade e até mesmo o óbito dos animais.

Algumas estratégias nutricionais, como o uso de aditivos, são recomendadas pelo National Research Council (NRC, 2007), tais como a inclusão de 0,5% de sulfato de amônio na matéria seca da dieta ou a adição de cloreto de amônio na proporção de 100 a 200 mg/kg de peso corporal, são opções que podem ser úteis para a redução da alcalinidade urinária em ovinos, e relata que o cloreto de amônio possivelmente seja mais efetivo do que o sulfato. Além disso, o NRC recomenda também o uso do cloreto de sódio, cuja prevenção ocorre pelo aumento do consumo de água e consequentemente, maior diluição e maior volume de urina produzida.

Embora a adição do cloreto de amônio seja um método preventivo amplamente utilizado por sua capacidade de acidificação, a utilização deste aditivo, deve considerar questões relacionadas a ingestão de alimento pelos animais, que, de acordo com Ortolani (2002), é pouco palatável e pode diminuir, em decorrência do seu uso em grande quantidade. Em seu trabalho, utilizando bovinos, Castañeda et al. (2009), forneceram níveis crescentes de cloreto de amônio em substituição a ureia 0, 0,35, 0,70, 1,05 e 1,40 g/kg de MS, correspondentes a 0, 25, 50, 75 e 100% de substituição, respectivamente, e verificaram uma redução linear da ingestão de matéria seca com o aumento da participação deste aditivo na dieta, este fato pode estar associado à sua baixa palatabilidade, o que afetou negativamente o desempenho produtivo.

O uso de aditivos acidificantes, entre outras estratégias não farmacológicas, como à disponibilidade de água de qualidade, é corroborado por Ferreira et al. (2014) que afirmaram ser necessário o emprego de medidas preventivas para controle desta enfermidade, evitando o descarte e as consequentes perdas econômicas observadas quando não se trabalha de maneira preventiva.

Diante desta condição, surge a necessidade de se explorar a utilização de aditivos alternativos ao cloreto de amônio que tenham capacidade para acidificar a urina dos animais e prevenir o surgimento da urolitíase, com o intuito de encontrar novas opções para este fim. Dentre alguns aditivos disponíveis, optou-se pelo uso do cloreto de cálcio protegido (CLC) e do ácido benzoico (ABZ) como possíveis substitutos, comparados ao próprio cloreto de amônio (CLA) e

ao tratamento controle (CTL) sem a inclusão de aditivos. O CLC é um sal aniônico, que pode ter potencial ação sobre a redução do pH urinário, além disso, devido ao processo de encapsulação, pode reprimir problemas comumente observados quando sais aniônicos são fornecidos sem proteção, tais como palatabilidade, higroscopia e corrosividade.

O ácido benzoico é classificado como um ácido orgânico que teve seu uso aprovado pela União Europeia em 2003 (DIAO et al., 2015) e em suínos, tem a capacidade de melhorar o crescimento, possui atividade sobre a microbiota e ação antioxidante (CHENG et al., 2017). Por ser classificado como ácido, acreditamos que seu uso pode contribuir para a acidificação urinária, tendo como resultado a redução do pH e dissolução dos urólitos, atuando como agente preventivo.

Desta forma, hipotetizamos que por se tratarem de compostos capazes de manipular o equilíbrio ácido-básico, tanto o cloreto de cálcio protegido, quanto o ácido benzoico, em substituição ao cloreto de amônio, sejam eficazes na prevenção da urolitíase obstrutiva, por meio da acidificação do pH urinário, sem deprimir a ingestão de matéria seca e o desempenho dos animais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Dados da Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2021), apontam que em 2019 o rebanho ovino mundial atingiu a expressiva marca de 1,23 bilhão de animais, comparado ao rebanho bovino que possui cerca de 1,51 bilhão, apresentando assim, um crescimento de mais de 11% nos últimos 10 anos. Este aumento revela o potencial desta atividade e a importância socioeconômica que tem a ovinocultura. Dentre os continentes, destacam-se a Ásia, África e Europa, todavia, sabe-se que a Oceania, em especial a Nova Zelândia, possui uma representatividade maior ao avaliarmos os países separadamente. Esses indicadores reforçam a atenção necessária que deve ser reservada ao aperfeiçoamento e aplicação de técnicas de manejo, cujo objetivo é o aumento da produtividade, dentro dos sistemas de criação de ovinos.

Neste contexto, para minimizar os impactos ambientais em função do aumento da produção de alimentos, em especial a criação de animais produtores de carne, é necessária a intensificação dos sistemas de criação, particularmente no que diz respeito ao manejo alimentar empregado nessas criações. Os principais recursos dispensados ao aumento da produtividade estão principalmente relacionados à genética do rebanho, sanidade dos animais e à nutrição, com a intensificação dos sistemas de criação.

De acordo com Celi et al. (2017) nas últimas décadas, têm sido realizadas seleções para maior crescimento e que, apesar deste tipo de seleção resultar em um aumento das exigências de manutenção, consequentemente maior consumo de alimentos, o emprego de novas tecnologias voltadas à nutrição têm resultado em ganhos significativos no desempenho dos animais. Com o confinamento e a oferta de dietas mais energéticas, melhorando o aporte nutricional e o desempenho, é possível a obtenção de melhores índices produtivos, em especial, sobre características de carcaça e qualidade de carne.

Este tipo de manejo, oferecido no sistema de criação intensivo, substitui os principais efeitos negativos que são observados quando os animais são criados extensivamente, como a escassez de volumoso em forma de pastagens

que prejudicam o desempenho produtivo e reprodutivo, além das características qualitativas da carne, conforme relatado por Zhang et al. (2019).

No confinamento também é possível obter um maior controle sobre o estado sanitário do rebanho que, no caso dos ovinos, são animais muito sensíveis aos endoparasitas, para tanto, novas estratégias de controle têm surgido, como o uso de alguns óleos essenciais, que de acordo com Andrade et al., (2011), tem recebido maior atenção para utilização na produção animal devido aos benefícios que oferece à saúde dos animais.

Além disso, com o intuito de aumentar a produtividade dos sistemas de criação de ovinos, algumas transformações têm ocorrido, no que tange ao sistema de criação adotado. De acordo com Parente et al. (2016) o aumento dos níveis de energia das dietas e o maior fornecimento de alimentos concentrados, melhoram a eficiência e o desempenho animal. Com isso, as mudanças no manejo nutricional aos quais esses animais são submetidos, resultam no aumento da obtenção de produtos como lã, leite e carne.

Apesar dos benefícios obtidos pelo uso de dietas mais concentradas em confinamento, como aumento da digestibilidade dos nutrientes e otimização do desempenho dos animais (PARENTE et al., 2016), além da melhoria da conformação das carcaças e o ganho de peso diário (CLAFFEY et al., 2018), a utilização de dietas ricas em carboidratos não fibrosos (CNF), necessita de cuidados em relação à saúde dos animais ruminantes, pois, pode provocar o aumento da taxa de fermentação, alteração da microbiota e dos produtos derivados dessa fermentação, fazendo que haja uma maior acidificação do ambiente ruminal (OLIVEIRA et al., 2016).

Conforme reportado por Valente et al. (2017), a redução do pH no ambiente ruminal também pode ocorrer em função das alterações na população da microbiota ruminal, diminuindo a proporção bactérias gram-negativas como a *Megasphaera elsdenii* e *Selenomonas ruminantium*, que são consumidoras de lactato e aumentando a população de gram-positivas como a *Streptococcus bovis* que são produtoras eficientes de lactato. Essa alteração na microbiota promove o aumento da concentração de ácido lático no rúmen, que chega a

corrente sanguínea através da absorção via parede ruminal, desenvolvendo um quadro de acidose metabólica.

Dietas ricas em grãos são palatáveis e facilmente fermentáveis no rúmen (HUMER et al., 2018). Esse tipo de dieta diminui os processos relacionados a ruminação por possuírem quantidades reduzidas de fibras, diminuindo a produção de saliva, quando comparada a dietas com maior inclusão de forragens. De acordo com Banakar; Anand e Shashank (2018), o fluxo de saliva é aumentado em decorrência da presença de fibra e fibra fisicamente efetiva, devido ao aumento da atividade mastigatória e tem influência sobre o pH ruminal. Beauchemin (2018) expõe que a influência da saliva na estabilidade do pH ruminal ocorre pela neutralização dos prótons através da anidrase carbônica, em razão da entrada do bicarbonato no rúmen via saliva, produzindo dióxido de carbono e água.

Desta forma, a saliva é um importante fator para a estabilização do pH ruminal, em virtude de sua característica química tamponante, bem como, por participar ativamente no metabolismo de fósforo pelo ruminante, sendo uma importante via de excreção desse mineral. De acordo com Cardoso Júnior et al. (2017), a concentração de fósforo é de 12 a 16 vezes maior na saliva, comparada ao sangue.

No metabolismo do fósforo, os ruminantes removem este mineral do organismo pela sua excreção através da saliva, que retorna ao rúmen e é eliminada principalmente nas fezes. Normalmente, cerca de 60% do fósforo que chega ao rúmen é proveniente da saliva e os 40% restantes vêm da dieta. De acordo com Mertens (1997) dietas com menor quantidade de fibras reduzem a quantidade de saliva produzida. Assim, em dietas de confinamento, a menor quantidade de fibra presente na ração reduz a produção de saliva, e consequentemente, essa diminuição pode causar uma sobrecarga renal para a eliminação do fósforo através da urina, aumentando o risco do desenvolvimento da urolitíase.

Em sistemas tradicionais, extensivos, os animais são criados exclusivamente em pastagens e em alguns casos mais tecnificados recebem

algum tipo de suplementação para otimizar o desempenho, na tentativa de potencializar os rendimentos para o produtor. Por fim, a criação com manejo intensivo, utilizando dietas com elevada proporção de alimento concentrado, que, apesar de ser o sistema que apresenta melhor desempenho, de acordo com ANTONELLI et al. (2012), acarreta um aumento das enfermidades que podem ser de origem nutricional e/ou metabólica.

Dentre as enfermidades que podem ter origem nutricional ou metabólica, a urolitíase obstrutiva é uma doença multifatorial, o que torna difícil de elucidar a definição da causa principal do seu surgimento. Alguns autores, desde a década de 30 (EVELETH; MILLEN, 1939; CORNELIUS; MOULTON; MCGOWAN, 1959; MCINTOSH, 1978), afirmaram que a nutrição desempenha um papel fundamental na ocorrência da urolitíase, uma vez que, dietas altamente digestíveis, níveis reduzidos de forragem e com composição mineral desbalanceada, poderiam predispor os bovinos e os ovinos a uma alta incidência de urolitíase.

De acordo com Church, (1979) a obstrução das vias urinárias é decorrente da atrofia do diâmetro da uretra, facilitando assim sua obstrução. Segundo Radostits; Blood e Hinchcliff (2002) e Assis et al. (2009), essa obstrução é caracterizada clinicamente pela retenção da urina, aumento do esforço para urinar, seguido pela distensão e posterior ruptura da vesícula urinária. As formas de identificação dos sintomas da urolitíase inicialmente são a anorexia e o timpanismo, seguidos por depressão, bruxismo, dor abdominal, pateamento dos membros anteriores e balançar da cauda, anúria ou hematúria que é a passagem de algumas gotas de urina coradas com sangue após grande esforço para urinar, dor à palpação da região peniana, taquicardia, taquipnéia e vasos espiclerais congestos (RIET-CORREA; SIMÕES; VASCONCELOS, 2008).

Um importante fator que pode predispor o surgimento da urolitíase é a castração dos animais, principalmente quando realizada em animais jovens. Além disso, Smith (2002) relataram que esse procedimento, principalmente se realizado no período que precede a puberdade, reduz o tamanho do trato urinário, tornando esses animais ainda mais susceptíveis à obstrução do sistema

urinário, causada pela urolitíase obstrutiva. Embora em cordeiros confinados, com o objetivo de produção de carne, este manejo não é uma prática rotineira, devido ao curto período em que os animais permanecem na terminação (RADOSTITS; BLOOD; HINCHCLIFF, 2002); SANTAROSA et al. 2015)

Antonelli et al. (2012) dividem as causas que podem originar os urólitos em três grupos: as que promovem a formação do núcleo do cálculo uretral, que na maioria dos casos é formado por células epiteliais descamadas favorecendo o depósito de cristais, que pode ser resultado de infecção do trato urinário ou deficiência de vitamina A; as que facilitam a precipitação dos solutos que irão constituir o cálculo, tais como as elevadas concentrações de alguns minerais na urina, fazendo com que haja a precipitação desse material dando origem aos urólitos e, as que têm relação com a influência do pH na solubilidade de alguns solutos, em que, a alcalinidade do pH favorece a formação de cálculos mistos de fosfato e carbonato (RADOSTITS; BLOOD; HINCHCLIFF, 2002).

Tanto os animais confinados, com formação principalmente de cálculos de fosfato (BUSHMAN; EMBRY; EMERICK, 1965; ROBBINS; KUNICEL; CROOKSHANK, 1965), quanto os mantidos em pastagens, com formação de urólitos de carbonato de cálcio (NWAOKORIE et al., 2015), podem ser acometidos pela urolitíase. Desta forma, observa-se que a composição dos urólitos pode variar de acordo com a espécie do animal e do alimento consumido, podendo ocorrer cálculos minerais ou orgânicos. Em caprinos, a maioria dos urólitos são constituídos de fosfato de amônio e magnésio, fosfato amorfo de cálcio e magnésio, e oxalatos (FLUSS, 1981; SILVA et al., 1982); nos ovinos, a grande parte é composta por cristais de fosfatos ou carbonatos, ou ainda, oxalatos de cálcio. Em bovinos, os mais comuns são os cálculos de sílica e cisteína (McINTOSH, 1978).

De acordo com o National Research Council (NRC 1985), em sistemas intensivos de criação, a urolitíase aparenta ter origem nutricional ou metabólica, em que os animais que são acometidos por essa enfermidade produzem urina mais alcalina, apresentando um elevado teor de fósforo. Além disso, o consumo dietético de minerais como o cálcio, fósforo, magnésio e potássio podem apresentar um papel fundamental na incidência da calculogênese. O cloreto de

amônio tem sido usado com razoável sucesso quando adicionado a dieta total em uma proporção de 0,5% com base na MS, sendo este mais eficaz quando comparado ao sulfato de amônio (NRC, 1985).

Essas informações são corroboradas por Riet-Correa; Simões e Vasconcelos (2008), que atribuem principalmente o desenvolvimento da urolitíase, em caprinos e ovinos, ao desequilíbrio entre a relação cálcio e fósforo, em dietas compostas por grãos, em que são utilizados alimentos concentrados em elevadas proporções. Esses autores citam como medidas preventivas mais importantes, a correção dos teores de Ca:P para uma relação ideal de 2:1, o fornecimento de forragens de qualidade em boas quantidades e, em caso de oferta de alimento concentrado ultrapassar 1,5% do peso corporal, há a necessidade da administração do cloreto de sódio em concentrações de 0,5 até 4% baseado no teor de MS, bem como o cloreto de amônio a 1% no alimento concentrado, além do fornecimento de água de boa qualidade à vontade.

Segundo Del Claro et al. (2006), a utilização de sais formadores de ácido, como o cloreto de amônio pode reduzir a alcalinidade da urina, por meio da liberação de H^+ , decorrente da absorção de cátions, o que pode ser benéfico sob o ponto de vista fisiológico. Essa medida é corroborada por Antonelli et al. (2012), que afirmam que, adicionar substâncias ou produtos que acidifiquem o pH urinário, como o cloreto de amônio, pode ser uma medida preventiva para atenuar a formação de cálculos mistos. Além disso, modificações na nutrição e aumento no consumo de água são também medidas profiláticas sugeridas por Loretti et al. (2003) e por Del Claro et al. (2006).

Porém, do ponto de vista zootécnico, a pouca palatabilidade do cloreto de amônio pode promover uma redução da ingestão de matéria seca e conseqüentemente, prejudicar os índices produtivos, em especial o ganho de peso dos animais, que é a característica principal para se alcançar em um sistema intensivo de criação de ovinos para a produção de carne.

Existem relatos de que o uso do cloreto de amônio em dietas de confinamento pode promover uma redução na ingestão de matéria seca. Além disso, para Mavangira; Cornish e Angelos (2010), este aditivo pode provocar

acidose metabólica quando se faz uso prolongado. Horst e Jorgensen (1974), observaram redução da ingestão ao fornecerem para cabras em lactação, 0,56 g dia⁻¹ de cloreto de amônio por kg de peso vivo. Esses dados são corroborados por Castañeda et al. (2009) que, ao trabalharem com bovinos utilizaram o cloreto de amônio em diferentes níveis de substituição à ureia 0, 25, 50, 75 e 100%, como fonte de nitrogênio não protéico (NNP), e observaram uma diminuição de 13% na IMS quando foi ofertado o nível de 100% de substituição, comparados aos animais que não receberam o cloreto de amônio.

Stewart; Emerick e Pritchard (1991) verificaram efeitos da utilização do CLA na redução da ingestão diária de matéria seca, ao adicionarem 1% do cloreto de amônio à dieta de ovinos, comparados aos tratamentos controle, e tratamento com calcário, contudo, essa redução não afetou o ganho médio diário entre os tratamentos. Embora, de acordo com Oetzel et al. (1988), os sais aniônicos têm baixa aceitação apenas quando administrados em dietas que contém grãos não processados, mas não em dieta total misturada.

Em ovinos, o cloreto de amônio alterou o metabolismo de cálcio no organismo, resultando no aumento da excreção de Ca na urina e aumento similar da absorção de cálcio no intestino, sem que houvessem alterações nos processos de reabsorção óssea desse mineral, independentemente da idade ou do tempo de suplementação (BRAITHWAITE, 1972).

Em seu estudo, Antonelli et al. (2012) reportaram que, a influência da concentração urinária de fósforo é maior que a do pH para a formação de urólitos de cristais de fosfatos, uma vez que, animais que receberam dietas contendo altos teores de fósforo, apresentaram um pH urinário ligeiramente ácido, com formação de cristais de fosfato triplo, comprovando a correlação negativa entre a concentração urinária de fósforo e o pH urinário.

Outra estratégia nutricional abordada em pesquisas nas últimas décadas, de acordo com Del Claro et al. (2006), é a manipulação do equilíbrio ácido-básico através do balanço cátion-aniônico da dieta (BCAD), que representa a diferença entre os cátions e os ânions fixos totais da dieta. Oetzel (2000), relataram que essa diferença entre a soma dos principais cátions e

ânions biológicos presentes na dieta é tradicionalmente calculada e expressada em miliequivalentes por quilograma de alimento, através da seguinte fórmula:

$$BCAD = ([Na^+ + K^+] - [Cl^- + S^-])$$

De acordo com Block (1994), os íons que compõem o cálculo do BCAD são o sódio (Na^+), o potássio (K^+), o cloro (Cl^-) e o enxofre (S^-), por influenciarem o equilíbrio ácido-básico. Esses íons podem alterar outras funções fisiológicas importantes, como o transporte de membrana, balanço osmótico e impulsos nervosos. A associação desses mecanismos pode resultar em uma alcalose ou acidose metabólica modificando o desempenho, bem como, o metabolismo de outros macrominerais (DEL CLARO et al., 2006).

Neste sentido, a utilização de compostos aniônicos capazes de manipular o equilíbrio ácido-básico, como forma de potencializar a acidificação do pH urinário e sem prejudicar o consumo, devem ser mais exploradas, em especial na terminação de ovinos criados sob condições de confinamento, com o objetivo de prevenir a urolitíase e minimizar efeitos negativos ao desempenho, comumente observados com o uso do tradicional cloreto de amônio.

Por suas características acidificantes, um aditivo com potencial para causar a acidificação urinária é o ácido benzoico (ABZ), pois, de acordo com Del Olmo; Calzada e Nuñez, (2017) esse ácido é quimicamente classificado como um ácido carboxílico aromático presente em tecidos animais e vegetais, que podem ser produzidos por microrganismos e são frequentemente utilizados por sua ação antimicrobiana bem como aromatizantes para alimentos, produtos de higiene, cosméticos e pela indústria farmacêutica, com função de agente preservativo que poderia ser utilizado na indústria alimentícia devido sua capacidade inibitória contra microrganismos patogênicos

Devido as semelhanças da fisiologia intestinal entre os humanos e os suínos, diversos estudos têm sido realizados nesses animais, com o objetivo de avaliar os efeitos sobre a saúde intestinal, e os resultados tem provado que níveis apropriados de ABZ podem promover benefícios à saúde intestinal pela regulação da atividade enzimática, status redox, imunidade e microbiota, porém, o uso em excesso poderia causar danos ao intestino (MAO et al., 2019).

Outra característica discutida em estudos da comunidade científica é a capacidade que o ABZ tem de aumentar a digestibilidade dos nutrientes presentes na dieta, tais como matéria orgânica, proteína, gordura e fibra (KLUGE; BROZ e EDER, 2010). Segundo MAO et al. (2019), em suínos, isso ocorre, possivelmente em função do aumento da produção de algumas enzimas do trato gastrointestinal como a lipase, tripsina, amilases e ativação devido a redução do pH do trato gastrintestinal, que refletem em uma melhor absorção dos nutrientes.

No organismo, após a absorção, o ABZ é metabolizado pela glicina-N-acilase e convertido a ácido hipúrico, que é excretado pela urina (WILLIAMS, 1967), ou como ácido benzoico livre, bem como seus conjugados com glicina ou ácido glucurônico (MARTIN, 1973), em que, o ácido hipúrico, o conjugado de glicina do ácido benzoico, é quantitativamente o principal derivado do ABZ e é um importante transportador urinário de energia e nitrogênio para animais que recebem dietas volumosas (PAGELLA et al., 1997).

Em seu trabalho, avaliando os efeitos da utilização de ABZ no pH urinário e digestibilidade dos nutrientes em porcas lactantes, Kluge; Broz e Eder (2010), reportaram os resultados de dois experimentos. No primeiro avaliaram diferentes níveis de ABZ fornecidos na dieta dos animais 0, 0,5, 1,0 e 2,0% respectivamente, e obtiveram uma resposta linear na redução do pH urinário, em função do aumento da concentração de ABZ fornecido, além de maior digestibilidade dos nutrientes ao nível de 2,0%. No segundo experimento, compararam a concentração de 0,5% de ABZ na dieta, ao tratamento controle sem inclusão de ABZ, para avaliar a excreção de ácido hipúrico via urina e foi verificado que este representou 64% de todo o ABZ ingerido, sendo o restante excretado na forma de ABZ não metabolizado.

Estes resultados comprovaram a capacidade do ácido benzoico para acidificar o pH urinário, podendo desta forma, ser utilizado em dietas com elevada proporção de alimentos concentrados, com o objetivo de prevenir os processos de litogênese, que levam a formação dos urólitos. Muitos estudos têm direcionado o uso deste aditivo para animais monogástricos, contudo, não com o objetivo de prevenir a urolitíase, mas, como melhorador de saúde intestinal,

bem como, com o objetivo de aumentar a digestibilidade dos nutrientes fornecidos nas dietas. Porém, faltam relatos na literatura utilizando este aditivo como método preventivo ao estabelecimento da urolitíase obstrutiva em cordeiros confinados, recebendo dietas com elevada proporção de alimento concentrado.

Outro aditivo que pode ser um potencial substituto ao cloreto de amônio é o cloreto de cálcio (CLC), cuja fórmula química é CaCl_2 , caracterizado como um sal aniônico composto por moléculas de cálcio (Ca^+) e de cloro (Cl^-), que tem sido frequentemente utilizado para ruminantes, em especial vacas leiteiras de alta produção, para tratamento ou prevenção da hipocalcemia puerperal, também conhecida como febre do leite.

Este composto tem características que podem torná-lo capaz de promover mudanças no balanço eletrolítico dos animais, com consequente redução do pH sanguíneo. Em cordeiros, esta alteração no balanço eletrolítico ocorre devido a absorção de Ca pelo epitélio ruminal (WILKENS et al., 2012), que alcança a corrente sanguínea, assim, este transporte aparenta ser dependente da quantidade de cálcio ingerida (SCHRÖDER et al., 2015).

Há décadas, estudos relacionados a prevenção e causas da urolitíase em ovinos têm sido realizados (LEOSCHKE; ELVEHJEM, 1954; ELAM; HAM; SCHNEIDER, 1957), observando que as alterações no pH urinário poderiam estar relacionadas com o desenvolvimento ou a prevenção desta enfermidade. Dessa forma, torna-se crescente o interesse pelo estudo da utilização deste sal aniônico, como método preventivo para o desenvolvimento da urolitíase obstrutiva, tendo em vista que seu fornecimento, promoveu reduções significativas do pH urinário dependendo das concentrações fornecidas aos animais.

Assim como em vacas, a utilização do cloreto de cálcio para ovelhas tem sido voltada ao tratamento da hipocalcemia, como formas profiláticas e terapêuticas, porém, de acordo com McIntyre e Weston (2002), este composto pode ocasionar danos ao epitélio gastrointestinal, a depender da forma como ele é fornecido, sendo os géis de cloreto de cálcio os mais prejudiciais. Neste

trabalho, o cloreto de cálcio utilizado possuía 80% de cloreto de cálcio em sua forma protegida, obtido por meio de um processo de encapsulação, com objetivo de evitar os efeitos negativos observados quando são fornecidos sais aniônicos sem essa proteção, como a menor ingestão de matéria seca.

Para tanto, é necessário o estudo de aditivos alternativos ao tradicional cloreto de amônio, cujo objetivo é, além de evitar a urolitíase, minimizar os efeitos negativos relacionados a ingestão de alimentos. Neste estudo, foi avaliada a eficácia de dois aditivos acidificantes, o cloreto de cálcio, um sal aniônico que contém em sua composição 80% de cloreto de cálcio e o ácido benzoico, um ácido carboxílico aromático, cuja composição é de 99,8% deste ácido. Nesse sentido, por possuírem propriedades acidificantes, acreditamos que estes aditivos possam promover a redução do pH urinário e prevenir o desenvolvimento da urolitíase obstrutiva, quando fornecido na dieta total para os animais em estudo.

3. JUSTIFICATIVA

A urolitíase é uma doença multifatorial de origem nutricional ou metabólica. Nos ovinos, ela pode ocorrer em ambos os sexos, com maior incidência observada nos machos, em função do formato anatômico do trato urinário, o que propicia o acúmulo dos sedimentos que dão origem aos urólitos, tendo como consequência a obstrução do urinária e, em alguns casos, pode levar a morte. Em confinamentos, o uso de dietas com elevada proporção de alimento concentrado pode resultar no desenvolvimento da urolitíase. O método mais comum de prevenção da urolitíase é o uso do cloreto de amônio para acidificação do pH urinário e dissolução dos urólitos. Porém, por ser pouco palatável, pode haver redução na ingestão de alimentos, prejudicando o desempenho dos animais. Dessa forma, tornam-se necessários estudos com diferentes aditivos acidogênicos como alternativas ao uso do cloreto de amônio, com o objetivo de acidificar a urina e prevenir a urolitíase, sem que haja efeitos no consumo e desempenho dos animais.

4. OBJETIVO

Avaliar a eficácia de diferentes aditivos com potencial acidificante em substituição ao cloreto de amônio, para prevenção da urolitíase por meio da acidificação urinária e seus efeitos no consumo de matéria seca, desempenho, morfometria ruminal, parâmetros sanguíneos e urinários.

4.1. Objetivos específicos

- Verificar se os aditivos utilizados influenciam o consumo de matéria seca em relação ao tratamento com o cloreto de amônio.
- Comparar as características de desempenho entre os animais submetidos aos diferentes tratamentos.
- Avaliar os efeitos dos aditivos sobre a morfometria de papilas ruminais e lesão cecal.
- Avaliar os parâmetros sanguíneos e bioquímica sérica entre os tratamentos.
- Verificar a acidificação urinária pelo uso dos aditivos.
- Avaliar a formação de urólitos nos animais em estudo.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Local

O experimento foi conduzido no Galpão anexo ao Laboratório de Avaliação Animal e Qualidade de Carne – LAAQC do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP), localizada no município de Pirassununga – SP, no período de 22 de janeiro de 2021 a 30 de março do mesmo ano. O estudo foi protocolado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o número: 4633210120.

A instalação fica localizada sob as coordenadas 21° 59' de latitude sul e 47° 26' de longitude oeste (W. Gr) e altitude média de 635 metros. O clima da região, de acordo com Köppen-Geiger, é classificado como Cwa, mesotérmico com chuvas predominantemente no verão, apresentando inverno seco e verões quentes, com temperatura média anual de 22°C e pluviosidade média anual próxima a 1363 mm.

5.2. Animais, instalações e tratamentos

Foram utilizados 32 cordeiros machos, não castrados, oriundos de cruzamentos entre as raças Dorper e Santa Inês, recém-desmamados, com peso vivo médio inicial de $23,6 \pm 0,1$ kg e com idade de 50 ± 5 dias, originários de uma fazenda localizada em Uberaba-MG. Os animais foram transportados em caminhão apropriado e, após o desembarque, foram submetidos a um período de 10 dias de adaptação às condições ambientais e às dietas de terminação. Os animais foram confinados em galpão coberto, mantidos em baias individuais medindo $2 \times 1,25$ m, com piso ripado, providas de cocho para alimentação individual e bebedouro para fornecimento de água fresca à vontade (Figura 1).

Figura 1. Confinamento experimental da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA/USP.

Fonte: Arquivo pessoal.

A dieta foi calculada conforme as recomendações do NRC (2007) para animais com a mesma faixa etária, em terminação em confinamento. A alimentação foi fornecida diariamente às 7h00. A ingestão de alimentos foi mensurada diariamente mediante a pesagem do alimento fornecido e das sobras do dia anterior. A oferta de alimentos foi ajustada diariamente a partir da retirada e pesagem das sobras da ração fornecida no dia anterior para o cálculo de consumo, considerando uma margem de 10% de sobras em matéria natural ofertada, permitindo o consumo *ad libitum*.

Foi utilizada uma dieta com 4% de volumoso (feno moído de capim *Cynodon ssp.*) com base na MS e 96% de concentrado a base de milho moído, farelo de soja, ureia e minerais, diferindo apenas na inclusão ou não dos aditivos (Tabela 1). Foram realizadas pré-misturas de cada aditivo acidificante com os suplementos mineral e vitamínico, a ureia e a monensina em uma porção de concentrado, em seguida distribuído através da porta de alimentação do misturador. A mistura foi feita em misturador tipo horizontal PEREIRA (Máquinas

Pereira Londrina – MAPELON, Londrina – PR), com hélices helicoidais com capacidade de 500 kg, com duração de 10 minutos por batida.

Amostras da dieta total e das sobras foram recolhidas e pré secas à 60 °C por 72 horas em estufa de ventilação forçada e moídas em moinho de facas (MA340, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) com peneira de porosidade de 1 mm. As amostras foram analisadas quanto ao teor de matéria seca (100 °C por 24 h; método 930.15; AOAC, 2000), matéria orgânica (100-cinzas; método 942.05; AOAC, 2000), proteína bruta (PB, N $\times$ 6,25; método Kjeldahl 984.13; AOAC, 2000), extrato etéreo (EE; método 920.39; AOAC, 2000), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina (método 973.18; AOAC, 2000). A fibra em detergente neutro foi analisada utilizando α -amilase (UNDERSANDER; MERTENS; THEIX, 1992) sem a adição de sulfito de sódio (Analisador de fibra TE-149, Tecnal Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil). Os nutrientes digestíveis totais foram estimados segundo Weiss, Conrad e Pierre (1992).

Os animais foram distribuídos em dois blocos, de acordo com o seu peso inicial e dentro de cada bloco foram distribuídos os quatros tratamentos utilizados neste estudo, onde cada animal foi considerado uma unidade experimental, sendo oito repetições por tratamento. A dieta fornecida era isoenergética e isoprotéica para todos os tratamentos, diferindo apenas no tipo de aditivo incluído em relação a dieta controle, da seguinte maneira:

1. **Tratamento CTL:** sem aditivos.
2. **Tratamento CLA:** Cloreto de amônio (5,0 g/kg MS).
3. **Tratamento CLC:** Cloreto de cálcio (6,3 g/kg MS).
4. **Tratamento ABZ:** Ácido benzoico (5,0 g/kg MS)

O cloreto de cálcio e o ácido benzoico foram utilizados na mesma proporção que o cloreto de amônio na dieta, sendo que, o cloreto de cálcio por possuir 80% deste sal em sua composição, foi necessária a adição de 0,63%, correspondente a concentração de 0,5% de aditivo utilizada nos demais tratamentos. A quantidade de alimento ofertada no primeiro dia de confinamento foi de 4% do peso vivo em matéria seca da dieta, devido ao manejo nutricional

realizado na propriedade de origem que consistia no fornecimento de concentrado no sistema de Creep-feeding até o momento da desmama.

A composição química e os nutrientes da dieta utilizada estão presentes na Tabela 1.

Tabela 1. Composição percentual das dietas com base na matéria seca.

INGREDIENTES %	Tratamentos			
	CTL	CLA	CLC	ABZ
Milho grão moído	77,46	77,30	77,33	77,00
Farelo de soja	13,00	13,00	13,00	13,00
Feno (<i>Cynodon</i> ssp.)	6,00	6,00	6,00	6,00
Calcáreo	1,80	1,70	1,30	1,70
Ureia	1,14	0,90	1,14	1,20
Cloreto de cálcio ¹	0,00	0,00	0,63	0,00
Cloreto de amônio ²	0,00	0,50	0,00	0,00
Ácido benzoico ³	0,00	0,00	0,00	0,50
Suplemento mineral ⁴	0,40	0,60	0,40	0,60
NaCl	0,20	0,00	0,20	0,00
Selisseo ⁵	0,0015	0,0015	0,0015	0,0015
Rumenpac ⁶	0,004	0,004	0,004	0,004
Vitamina E ⁷	0,02	0,02	0,02	0,02
TOTAL	100,00	100,00	100,00	100,00
NUTRIENTES %				
Nutrientes digestíveis totais	81,69	81,29	81,58	81,28
Extrato etéreo	3,71	3,69	3,71	3,69
Proteína bruta	17,24	17,39	17,22	17,36
Proteína degradável no rúmen	10,90	10,21	10,90	11,04
Fibra em detergente neutro	16,74	16,68	16,73	16,68
Cálcio	0,77	0,76	0,77	0,76
Fósforo	0,40	0,41	0,40	0,41
Sódio	0,10	0,09	0,10	0,09
Potássio	0,68	0,69	0,68	0,69
Cloro	0,17	0,40	0,48	0,05
Enxofre	0,19	0,19	0,19	0,19
BCAD ⁸ mEq/kg	+52,52	-17,10	-36,99	+81,52

¹ Cloreto de Cálcio KEMIN: Cloro – 49 %, Cálcio – 31%.

² Ammonium Chloride BASF.

³ EASTMAN Protural TM BA: Ácido benzoico – 99,8%.

⁴ Coplasal Ovinos® (Coplacana) Cálcio 155g, Fósforo 83g, Magnésio – 10g, Enxofre – 35g, Sódio – 120g, Cobre – 756mg, Magnésio – 2.110mg, Zinco – 2.800mg, Iodo – 56mg, Cobalto – 44mg, Selênio – 14mg, Flúor - 250mg.

⁵ Selisseo® Adisseo, Co., France.

⁶ Rumenpac® - Mcassab (Monensina mínimo 200 mg/kg)

⁷ Microvit® E Promix 50, (500 IU/g, α -tocopherol).

⁸ Balanço cátio-aniônico da dieta em mEq/kg = (% Na / 0,0023 + % K / 0,0039) - (% Cl / 0,00355 + % S / 0,00160).

5.3. Características de desempenho

A ingestão de matéria seca diária foi calculada pela diferença entre a quantidade fornecida diariamente e as sobras.

Os animais foram pesados, sem jejum, ao início e a cada 14 dias durante todo o período experimental, perfazendo assim um total de cinco pesagens nos 56 dias de confinamento, o ganho de peso total foi obtido por meio da diferença entre o peso final ao abate e o peso observado ao início do período experimental.

O ganho médio diário (GMD) foi calculado ao final do período do teste de alimentação, como o coeficiente da estimativa da regressão do peso vivo em função do tempo de confinamento, utilizando o procedimento REG do software SAS 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA), bem como a eficiência alimentar (EA).

5.4. Hemograma

As colheitas de sangue para hemograma foram realizadas no dia que antecedeu o período experimental e a cada 28 dias, sempre às 7:00h, sem jejum, por venopunção jugular, usando-se frascos de colheita à vácuo contendo EDTA e os hemogramas foram processados pelo método da contagem automática de células, utilizando-se aparelho Mindray BC- 2800 Vet (Mindray, China). A dosagem de hemoglobina foi processada por espectrofotometria e a determinação do volume globular pelo método padronizado pelo Comitê Internacional de Padronização em Hematologia. As determinações dos índices eritrocitários, ou seja, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) foram feitas, também, por automação. A proteína total plasmática foi realizada através de refratometria. A contagem diferencial de leucócitos foi procedida por observação ao microscópio de 100 células da série branca, nos esfregaços de sangue corados por panótico rápido (Instant-Prov, Newprov) (JAIN, 1993; KERR, 2003).

5.5. Bioquímica sérica

No dia que precedeu o início do período experimental e a cada 28 dias, todos os animais foram submetidos à colheita de sangue para realização do exame de bioquímica sérica, em que foram analisados os parâmetros de ureia, creatinina, fósforo, cloreto, sódio e potássio no soro sanguíneo. Para essas análises, foram colhidas amostras do sangue venoso por punção da veia jugular em tubos à vácuo (Figura 2), com gel ativador de coágulo, com agulha 25x8mm (BD Vacutainer®, BD Medical, Curitiba-PR, Brasil). Após coagulação do sangue, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 15 minutos (Centrífuga Inbras Alb 32/10CS, Brasil), o soro sanguíneo foi separado, armazenado em alíquotas de 2mL (Eppendorf do Brasil Ltda. São Paulo, SP, Brasil), e congelados a -20 °C. As dosagens foram feitas em equipamento de automação bioquímica (Mindray BS 120) por kits comerciais (Labtest) pelos métodos: enzimático-colorimétrico, para a determinação da concentração de ureia e método cinético-colorimétrico, para creatinina, com leitura em espectrofotômetro.

Figura 2. Amostras de sangue após a centrifugação para avaliação dos parâmetros séricos.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.6. Eletrólitos sanguíneos

Foram colhidas amostras de sangue venoso ao início e a cada 28 dias do período experimental, por punção da veia jugular em tubos à vácuo com ativador de coágulo, com agulha 25x8 mm (BD Vacutainer®, BD Medical, Curitiba-PR, Brasil). Após a coagulação do sangue, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 15 minutos (Centrífuga Inbras Alb 32/10CS, Brasil), o soro sanguíneo foi separado, armazenado em alíquotas de 2 mL (Eppendorf do Brasil Ltda. São Paulo-SP, Brasil), e congeladas a -20 °C.

5.7. Coleta de urina e urinálise

Foram realizadas três colheitas de urina, sendo a primeira no dia que precedeu o início do período experimental, considerando que, neste momento, todos os animais estavam recebendo a mesma dieta que foi utilizada no tratamento controle, posteriormente as coletas ocorreram a cada 28 dias após o início do experimento. Estes procedimentos foram realizados sempre no mesmo horário, iniciando às 7:00h, com os animais sem jejum e antes da oferta de alimentos. Para a colheita do material, os animais individualmente eram contidos em estação, manualmente, com o uso de cabrestos. As amostras de urina foram colhidas dos animais dos quatro tratamentos por micção natural, ou induzida, pelo estímulo do prepúcio.

As amostras de urina foram acondicionadas em frascos estéreis e no momento da colheita, foi realizada a mensuração do pH de cada amostra individualmente, com uso do peagâmetro digital, modelo HI 99163 (Hanna Instruments, São Paulo, Brasil) O eletrodo do peagâmetro foi imerso totalmente dentro da amostra de urina, até a estabilização e, somente foi colocado na próxima amostra, depois de lavado com água destilada e devidamente calibrado em solução tampão de pH 4,0 e de pH 7,0 conforme as recomendações do fabricante, sendo que, a cada amostra avaliada, o peagâmetro era calibrado lavado com água destilada e enxugado com papel absorvente.

Após as aferições, as amostras foram armazenadas em caixas térmicas com gelo, sem que houvesse contato físico direto e encaminhadas ao Laboratório Clínico da Unidade Clínico Hospitalar (UDCH) do Departamento de Medicina Veterinária (ZMV) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP), Campus Pirassununga (Figura 3).

Figura 3. Amostras de urina e sangue, para exames de urinálise e bioquímica sérica.

Fonte: Arquivo pessoal.

Imediatamente após a colheita de urina de cada animal, as amostras foram transportadas em caixas térmicas com gelo reutilizável para a realização da urinálise, em que foram realizados exames físicos, químicos e de sedimento. No exame físico foram avaliados volume (mL), cor, odor e aspecto. A densidade foi analisada pelo refratômetro. O exame químico foi realizado por tiras reagentes, avaliando-se pH, proteínas, glicose, acetona, urobilinogênio, bilirrubina, sangue oculto e sais biliares.

Para exame do sedimento urinário foram centrifugados 5mL de urina em tubos cônicos a 1.500 rpm por cinco minutos (KANEKO; HARVEY e BRUSS, 2008). Após a centrifugação, foi desprezado o sobrenadante, deixando 0,5mL de urina para a realização do exame do sedimento, que inclui a identificação de células de descamação do trato urinário (células renais, da pelve, vesicais e uretrais), células prostáticas, hemácias, leucócitos e demais possíveis, como cilindros, cristais, bactérias, dentre outros.

As células e outras estruturas como cilindros, cristais, bactérias, espermatozoides e muco também fizeram parte da análise do sedimento. O critério semi-quantitativo adotado pelo Laboratório Clínico da Unidade Clínica

Hospitalar (UDCH) do Departamento de Medicina Veterinária (ZMV) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP), Campus Pirassununga, inclui: raras (contagem média < 1 célula/campo); uma cruz (+) (1 a 3 células/campo); duas cruzezes (++) (3 a 5 células/campo); três cruzezes (+++) (>5 células/campo) e campo cheio (números de células incontáveis/campo).

5.8. Abate dos animais

Após 60 dias de confinamento, os cordeiros foram transportados para o matadouro-escola da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos em caminhão próprio para ovinos, com distância de 200 m do galpão experimental. O abatedouro é habilitado no Serviço de Inspeção do Estado de São Paulo (SISP) e segue os procedimentos humanitários estabelecidos pela legislação brasileira, com insensibilização dos animais feita através do atordoamento com pistola de dardo cativo penetrante e sangrados através da veia jugular e da artéria carótida. O abate foi realizado sem jejum e as carcaças foram então esfoladas, evisceradas, lavadas, identificadas e pesadas (Figura 4).

Figura 4. Carcaças dos animais abatidos, após 24h de refrigeração em câmara frigorífica, a uma temperatura de 2-4 °C.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.9. Avaliação do trato urinário

Após o abate, o trato urinário de cada animal foi analisado quanto às alterações visuais e, posteriormente, fragmentos de cada órgão (rim, ureter, vesícula e uretra peniana) foram colhidos, acondicionados em frascos e fixados em solução de formalina tamponada a 10% (Figura 5).

Figura 5. Vesícula urinária e ureter de ovinos, para avaliação da presença de urólitos e lesões.

Fonte: Arquivo pessoal.

Após 24 horas, as amostras foram transferidas para novos frascos, contendo álcool etílico 70%. Em seguida, os fragmentos foram incluídos em parafina, em cassetes histológicos, para realização de cortes histológicos de 5 μ m em micrótomo (RM2255-Leica Biosystems, Leica do Brasil Importação e Comércio Ltda, São Paulo/SP, Brasil), para confecção de lâminas, que foram coradas com hematoxilina e eosina (H.E.), no Laboratório de Patologia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP), Campus Pirassununga. Todas as lâminas foram analisadas em microscópio óptico. As alterações histopatológicas dos rins e da vesícula

urinária foram classificadas em ausente, leves, moderadas e acentuadas, de acordo com a metodologia descrita por Guedes Jr. et al. (2012).

5.10. Escore de rumenite, morfometria ruminal e avaliação cecal

A incisão foi realizada através de corte único na região mediana do abdômen, iniciando-se na região do púbis em sentido ao esterno, para obtenção do composto rúmen, retículo, omaso e abomaso (Figura 6).

Durante a evisceração, a região do esôfago foi amarrada com barbante para evitar saída de líquido ruminal. Para avaliar o índice de rumenite, o rúmen foi isolado dos outros compartimentos, aberto, lavado em água corrente e examinado. As papilas ruminais foram classificadas visualmente, de acordo com a incidência de lesões, em uma escala de escore de 0 a 10 (BIGHAM e McMANUS, 1975), em que cada ponto de escore representa 10% do rúmen comprometido, considerando incidência de rumenite qualquer classificação acima de zero. A avaliação foi visual e subjetiva e realizada por uma mesma pessoa treinada para esta avaliação.

Figura 6. Rúmen de cordeiro, para avaliação do escore de rumenite.

Fonte: Arquivo pessoal.

Posteriormente, foi identificado o saco cranial do rúmen, de onde foram amostrados fragmentos de cerca de 10 cm² em cada rúmen e acondicionados em solução tampão fosfato e armazenados a -4°C para conservação das células, para avaliação morfológica das papilas, (Figura 7). Para a determinação do número de papilas por cm², as papilas foram contadas em um fragmento de 1 cm², por três avaliadores, determinando-se como o número de papilas a média das três contagens.

Após a contagem, os fragmentos foram seccionados na base e doze papilas utilizadas para mensuração da área média das papilas, percentual de área papilar e superfície total de absorção por cm² de parede. A estimativa do fragmento e das doze papilas para mensuração das variáveis foi realizada através do programa de análise de imagens UTHSCSA Image Tool (RESENDE JÚNIOR et al., 2006).

Figura 7. Fragmento de rúmen de cordeiro para contagem de papilas.

Fonte: Arquivo pessoal.

O pH cecal foi obtido utilizando peagâmetro digital, modelo HI 99163 (Hanna Instruments, São Paulo, Brasil), em que o eletrodo do peagâmetro foi imerso totalmente dentro da amostra do composto presente no interior do ceco de cada animal. A avaliação cecal foi realizada após a evisceração dos animais

e lavagem do ceco. O epitélio cecal foi classificado de acordo com a presença de petéquias, utilizando-se uma escala de 0 (nenhuma petéquia) a 10 petéquias, consideradas graves, (Figura 8). Os cecos de todos os animais foram analisados por duas pessoas devidamente treinadas para esta finalidade.

Figura 8. Ceco de cordeiros submetidos a dietas com elevada proporção de concentrados para avaliação do escore de lesão cecal.

Fonte: Arquivo pessoal.

6. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os gráficos de resíduos e a estatística W (Shapiro e Wilk, 1965) foram avaliados para determinar a normalidade de todos os dados, e os valores discrepantes (>3 e <-3 desvio padrão) excluídos. Os dados foram analisados blocos casualizados (peso corporal inicial, $n=2$), com 4 tratamentos e 8 repetições por tratamento, utilizando Procedimento Misto do SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC), com 32 animais distribuídos em quatro tratamentos, totalizando oito repetições por tratamento.

Para desempenho, dados de morfometria de papilas e pH cecal e parâmetros físico-químicos da urina, o tratamento foi utilizado como efeito fixo e o bloco (peso corporal inicial) como efeito aleatório. Características avaliadas ao longo do tempo (pH e volume urinário, e parâmetros sanguíneos e séricos foram analisados como medidas repetidas no tempo, considerando o tratamento, os dias de avaliação e sua interação como efeitos fixos e efeito aleatório de bloco e animal (indivíduo). Estruturas de covariância residual foram modelados e foi utilizado o melhor ajuste. Foi considerado o nível de significância $p \leq 0,05$. Quando um efeito significativo foi observado, as médias foram comparadas pelo teste t de Student.

As características de escores de rumenite e de lesão cecal não apresentaram distribuição gaussiana e foram analisados considerando uma distribuição de Poisson, utilizando o procedimento GLIMMIX do SAS.

7. RESULTADOS

7.1. Desempenho

De maneira geral as características de desempenho avaliadas neste estudo não foram influenciadas por nenhum dos tratamentos (Tabela 2). Os blocos ao início do período experimental foram estruturados de maneira que o peso corporal entre os blocos fosse homogêneo, permanecendo assim até o fim do experimento. Não houve diferença no PVF, bem como para IMS em porcentagem do peso vivo, com a ingestão média diária em kg de MS variando de 1,167 a 1,244 kg, correspondentes a 3,33 e 3,53% do peso vivo dos animais.

Da mesma forma, não houve diferença para o ganho médio diário, que variou entre 0,333 e 0,357 g/kg. Além disso, também não houve diferença para a eficiência alimentar, com média de 283 gramas de ganho de peso por kg de MS ingerida.

Tabela 2. Características de desempenho de cordeiros confinados recebendo dietas com ou sem aditivos para acidificação urinária.

Variável	Tratamentos				EPM	Valor de P
	CTL	CLA	CLC	ABZ		
Peso inicial (kg)	23,59	23,54	23,49	23,69	1,320	0,996
Peso final (kg)	41,95	42,29	43,23	43,15	1,654	0,798
IMS (% PV)	3,40	3,33	3,47	3,53	0,041	0,395
GMD (kg/dia)	0,333	0,341	0,357	0,351	0,010	0,793
EA (g/kg)	276	290	285	281	0,008	0,902

IMS (%PV): ingestão de matéria seca em porcentagem de peso vivo; GMD: ganho médio diário em quilogramas por dia; EA: eficiência alimentar; EPM: erro padrão da média; Médias avaliadas pelo teste t de Student ao nível de 5%.

7.2. Parâmetros sanguíneos (eritograma)

Houve diferença apenas para a hemoglobina ($P = 0,043$), em função dos tratamentos utilizados, conforme Tabela 3. As concentrações de hemoglobina nos tratamentos ABZ e CTL não diferiram entre si, com valores de 13,24 e 13,10 g/dL, respectivamente, porém maiores quando comparadas às concentrações encontradas no sangue de animais que receberam o tratamento CLA 12,05 g/dL. A concentração média de hemoglobina encontrada nos animais que receberam o CLC não diferiu dos demais tratamentos.

Os valores de hemácias, hematócrito, VCM, HCM e CHCM não foram influenciados pelos tratamentos oferecidos aos animais. Porém, houve diferença para as variáveis HCM e para o CHCM em decorrência do tempo de confinamento ($P = 0,013$; $P = 0,024$), respectivamente, com comportamento linear decrescente observado em ambas as variáveis.

O Não foram observados efeitos de tratamento ou de tempo sobre as concentrações plaquetárias. Contudo, o tempo aumentou as concentrações de proteína plasmática passaram, que de 5,72 para 6,33 ($\times 10^3/\mu\text{L}$).

7.3. Parâmetros sanguíneos (leucograma)

Não houve diferença entre os tratamentos para nenhuma das variáveis leucocitárias analisadas, Tabela 4. Entretanto, houve efeito de tempo para as variáveis de leucócitos totais, neutrófilos segmentados e para os linfócitos ($P = 0,044$; $P = 0,024$; $P = 0,007$), respectivamente.

O efeito do tempo ao longo do experimento provocou um efeito quadrático sobre a concentração de leucócitos totais, havendo uma redução da quantidade de leucócitos 6.516/ μL aos 28 dias de avaliação, com posterior aumento das concentrações observadas no D56, que foram semelhantes às encontradas inicialmente no D1 com valores de 7.431 e 7.856 unidades por microlitro de amostra, respectivamente.

Para os neutrófilos segmentados o tempo de confinamento reduziu a concentração sérica de 3.270 para 2.646 neutrófilos por microlitro, enquanto que, para os linfócitos, esse comportamento foi inverso e aumentou de 3.741 para 4.748 unidades por microlitro ao decorrer do período experimental.

De maneira geral, os valores encontrados ocorreram dentro das variações encontradas na literatura (MEYER e HARVEY, 2004), exceto para as variáveis de eosinófilos que foi menor do que os valores de referência, bem como para os basófilos que são considerados raros por estes autores.

Tabela 3. Parâmetros sanguíneos obtidos através do eritrograma de cordeiros confinados alimentados com dietas com elevada proporção de concentrado.

Variável	Tratamentos				EPM	Tempo			EPM	Valor de P			Efeito	
	CTL	CLA	CLC	ABZ		0	28	56		Trat	Tempo	Trat * Tem	L	Q
Hemácias (x10 ⁶ /μL)	13,90	12,80	13,23	13,86	0,247	13,68	13,04	13,62	0,231	0,079	0,262	0,962	0,892	0,104
Hemoglobina (g/dL)	13,10a	12,05b	12,68ab	13,24a	0,163	13,11	12,5	12,7	0,142	0,043	0,278	0,957	0,289	0,230
Hematócrito (%)	38,16	35,68	36,76	38,70	0,542	38,05	36,16	37,78	0,493	0,084	0,186	0,979	0,813	0,070
VCM (fL)	27,55	28,16	27,84	27,93	0,173	27,97	27,86	27,77	0,150	0,661	0,894	0,994	0,638	0,969
HCM (pg)	9,45	9,46	9,60	9,56	0,079	9,62a	9,60a	9,33b	0,076	0,536	0,013	0,983	0,008	0,195
CHCM (%)	34,32	33,66	34,54	34,25	0,184	34,46a	34,5a	33,62b	0,170	0,174	0,024	0,989	0,021	0,134
Plaquetas (x10 ³ /μL)	692,9	630,5	721,3	625,0	17,628	704,66	644,41	653,19	15,761	0,089	0,248	0,586	0,187	0,306
Prot. Plasmática (g/dL)	5,91	5,84	6,04	6,08	0,043	5,72b	5,85b	6,33a	0,037	0,168	<0,001	0,900	<0,001	0,054

VCM: volume corpuscular médio em fenolitros; HCM: hemoglobina corpuscular média em picogramas; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média em porcentagem; CTL: tratamento controle; CLA: tratamento cloreto de amônio; CLC: tratamento cloreto de cálcio; ABZ: tratamento ácido benzoico; EPM: erro padrão da média; a-b-c: Letras similares não diferem entre si pelo teste de t-Student ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 4. Parâmetros sanguíneos obtidos através de leucograma de cordeiros confinados alimentados com dietas com elevada proporção de concentrado.

Variável (/μL)	Tratamentos				EPM	Tempo			EPM	Valor de P			Efeito	
	CTL	CLA	CLC	ABZ		0	28	56		Trat	Tempo	Trat * Tem	L	Q
Leucócitos totais	6925	7196	7350	7600	219,57	7431ab	6516b	7856a	190,15	0,743	0,044	0,911	0,432	0,018
Neutrófilos seg.	2608	2766	2964	3034	108,49	3270a	2612b	2646b	93,95	0,500	0,024	0,533	0,021	0,136
Linfócitos	3909	4016	3912	4233	181,19	3741bc	3563c	4748a	162,34	0,881	0,007	0,911	0,012	0,049
Monócitos	289	267	286	199	18,59	304	219	257	17,00	0,291	0,180	0,556	0,309	0,121
Eosinófilos	80	85	98	80	11,68	73	61	123	10,12	0,938	0,076	0,712	0,081	0,140
Basófilos	39	62	86	55	5,93	43	61	79	5,14	0,054	0,054	0,123	0,016	0,992

CTL: tratamento controle; CLA: tratamento cloreto de amônio; CLC: tratamento cloreto de cálcio; ABZ: tratamento ácido benzoico; EPM: erro padrão da média; a-b-c: Letras similares não diferem entre si pelo teste de t-Student ao nível de 5% de probabilidade.

7.4. Bioquímica sérica

Não houve diferença entre as variáveis analisadas através da bioquímica sérica entre os tratamentos, conforme Tabela 5. As concentrações séricas permaneceram dentro da normalidade para a espécie encontrados na literatura. As concentrações iniciais de ureia aumentaram de 33,02 para 48,84 mg/dL ao final do experimento, enquanto a creatinina e fósforo apresentaram valores fora do intervalo de referência (MEYER e HARVEY, 2004).

De maneira geral, os componentes avaliados aumentaram em decorrência do tempo ($P < 0,001$). Entretanto, para o cloreto e o potássio, não foi observado efeito de tempo, o fósforo e o sódio também aumentaram linearmente ao longo do tempo de confinamento, porém o fósforo, com concentração inicial de 7,59 mg/dL aumentou para 9,34 mg/dL, valor maior que o intervalo de referência que varia de 5,0 a 7,3 mg/dL. Enquanto que o aumento de 132,62 para 140,56 mmol/L das concentrações de sódio encontradas ao final do período experimental estavam dentro da normalidade, que variam entre 136,0 e 154,0 mmol/L.

A creatinina apresentou efeito quadrático ($P < 0,001$), e as concentrações em todos os momentos foram menores do que o intervalo de referência de 1,2 a 1,9 mg/dL

Tabela 5. Bioquímica sérica de cordeiros confinados alimentados com dietas com elevada proporção de concentrado.

Variável	Tratamentos				EPM	Tempo			EPM	Valor de P			Efeito	
	CTL	CLA	CLC	ABZ		0	28	56		Trat	Tempo	Trat * Tem	L	Q
Ureia (mg/dL)	42,96	42,61	41,10	43,40	0,904	33,02b	45,69a	48,84a	0,783	0,820	<0,001	0,776	<0,001	0,015
Creatinina (mg/dL)	0,87	0,84	0,86	0,85	0,015	0,92a	0,76b	0,88a	0,013	0,816	<0,001	0,901	0,154	<0,001
Fósforo (mg/dL)	8,93	8,38	8,67	8,70	0,194	7,59b	9,07a	9,34a	0,181	0,606	<0,001	0,438	<0,001	0,046
Cloreto (mmol/L)	104,51	105,50	105,84	105,09	0,248	105,68	105,41	104,62	0,215	0,271	0,200	0,865	0,085	0,620
Sódio (mmol/L)	135,75	136,37	137,25	137,54	0,364	132,62c	137,00b	140,56a	0,318	0,264	<0,001	0,792	<0,001	0,588
Potássio (mmol/L)	4,50	4,60	4,75	4,65	0,063	4,72	4,64	4,51	0,057	0,416	0,249	0,913	0,100	0,792

CTL: tratamento controle; CLA: tratamento cloreto de amônio; CLC: tratamento cloreto de cálcio; ABZ: tratamento ácido benzoico; Prot. Plasmática (g/dL): proteína plasmática em gramas por decilitro; a-b-c: Letras similares não diferem entre si pelo teste t de Student ao nível de 5% de probabilidade.

7.5. pH e Volume urinário

Houve interação entre o tempo e o tratamento para o pH de urina ($P = 0,033$), conforme Tabela 6. Houve diferença entre os valores de pH na urina dos animais entre os tratamentos ($P < 0,001$). Animais que receberam o CLC apresentaram menor valor médio de pH urinário 6,46, seguido pelos animais do tratamento CLA com pH de 7,06. Os animais tratados com o CTL e com o ABZ não diferiram entre si e apresentaram os maiores valores de pH.

Tabela 6. Valores de pH e volume urinário amostral de cordeiros confinados recebendo diferentes aditivos para acidificação urinária.

Variável	Tratamentos				EPM	Tempo			EPM	Valor de P			Efeito	
	CTL	CLA	CLC	ABZ		0	28	56		Trat	Tempo	Trat * Tem	L	Q
pH urina	7,64a	7,06b	6,46c	7,59a	0,079	7,60a	7,04b	6,93b	0,072	<0,001	0,001	0,033	<0,001	0,140
Volume da amostra de urina (ml)	4,51ab	7,75a	2,54b	3,97b	0,589	4,52	5,17	4,38	0,527	0,0228	0,848	0,895	0,927	0,574

CTL: tratamento controle; CLA: tratamento cloreto de amônio; CLC: tratamento cloreto de cálcio; ABZ: tratamento ácido benzoico; a-b-c: Letras similares não diferem entre si pelo teste t de Student ao nível de 5% de probabilidade.

De maneira geral, ao decorrer do período experimental, os valores médios de pH urinário diminuíram linearmente ($P = 0,001$), embora, valores de pH menores que 7 só tenham sido verificados apenas nas urinas provenientes de animais que receberam os tratamentos CLC com pH de 6,10 já aos 28 dias e o tratamento CLA com pH de 6,55 ao final do experimento, conforme gráfico 1.

No gráfico 1, é possível observar que aos 28 dias de período experimental, houve redução do pH urinário mais expressiva nos animais que receberam o tratamento CLC, o qual permaneceu com menor valor de pH durante os dias subsequentes em relação aos demais tratamentos, essa redução foi seguida pelos valores de pH obtidos na urina dos animais do tratamento CLA, enquanto que valores de pH acima de 7,0 foram observados na urina dos animais tratados com CTL e ABZ.

Gráfico 1. Valores médios de pH urinário de cordeiros alimentados com dietas com elevada proporção de concentrado em diferentes momentos de avaliação.

CTL: tratamento controle; CLA: tratamento cloreto de amônio; CLC: tratamento cloreto de cálcio; ABZ: tratamento ácido benzoico; P: probabilidade para o efeito de tratamento; A-B-C: letras similares não diferem entre si pelo teste de diferença mínima significativa T-Fisher (LSD) ao nível de 5% de probabilidade.

Animais que receberam o tratamento CTL não apresentaram alterações significativas nos valores de pH urinário ao longo de todo o período experimental, mantendo valores de pH, acima de 7,4. Da mesma forma, não foi observada diferença, para os valores de pH urinário encontrados nos animais que

receberam o ABZ como aditivo nos três momentos em que foram avaliados. Os valores de pH urinário dos animais tratados com CTL e ABZ, foram maiores comparados aos dos animais que receberam o CLA ($P = 0,006$; $P < 0,001$) e o CLC ($P = 0,011$; $P < 0,001$), respectivamente. Embora o CLC tenha sido mais eficaz que os demais tratamentos na diminuição do pH urinário, seguido pelo CLA com valores de pH de 6,46 e 7,06, respectivamente.

O tratamento CLC sofreu uma redução do pH entre o D1 e o D28 ($P = 0,001$), do D28 ao D56 não foram observadas diferenças. Em relação ao CLA, houve diferença apenas no momento inicial e final do período experimental D1 e D56 ($P = 0,034$).

Estes dados dão suporte a hipótese de que os aditivos utilizados são efetivos para a acidificação do pH da urina, exceto o ABZ que, apesar da leve redução no D28, obteve maior valor de pH em comparação aos demais aditivos. O cloreto de cálcio exibiu maior eficiência na acidificação da urina nos dias 28 e 56, entre os aditivos testados, enquanto que no tratamento controle foi observado um aumento do pH urinário entre o D1 e o D56.

Apesar de ser um volume amostral, houve um efeito de tratamento para o volume urinário ($P = 0,023$) apenas no D28, conforme Tabela 6. No gráfico 2, observa-se que ao início e ao final do experimento não houve diferença entre os tratamentos.

Gráfico 2. Volume da amostra de urina de cordeiros alimentados com dietas com elevada proporção de concentrado em diferentes momentos de avaliação.

CTL: tratamento controle; CLA: tratamento cloreto de amônio; CLC: tratamento cloreto de cálcio; ABZ: tratamento ácido benzoico; P: probabilidade para o efeito de tratamento; A-B: letras similares não diferem entre si pelo teste de diferença mínima significativa T-Fisher (LSD) ao nível de 5% de probabilidade.

Aos 28 dias de período experimental, foi observado um maior volume da amostra de urina em animais tratados com o CLA 9,37 ml, em relação ao volume urinário produzido pelos animais que receberam os tratamentos CTL e CLC 3,32 e 3,44 ml, respectivamente. O volume da amostra coletada em animais do tratamento ABZ neste momento foi de 4,55 ml e não diferiu dos volumes coletados nos demais tratamentos.

7.6. Urinálise

Em 100% das amostras de urina avaliadas o odor foi classificado como *Sui generis*, também não foi detectada a presença de glicose (glicosúria), corpos cetônicos (cetonúria), cilindros, cristais ou muco. O urobilinogênio estava dentro da normalidade. De maneira geral não houve presença relevante de hemácias na urina, o que tornou esse achado sem importância clínica, conforme descrito por Santarosa et al. (2016). A contagem leucocitária e de células de descamação

também foram insignificantes do ponto de vista clínico, por não apresentarem relação aparente com quadros de inflamação.

Houve diferença entre os tratamentos na urina para as variáveis de cor ($P = 0,001$), conforme Tabela 7. A cor “amarelo citrino” foi observada em 14,44% das amostras de urina nos animais que receberam o tratamento CLC, seguidos pelos animais dos tratamentos ABZ, CLA e CTL, cujas porcentagens foram 13,33, 12,22 e 8,89%, respectivamente. Os tratamentos CTL e CLC apresentaram urina de cor amarelo ouro em 8,89% cada, em relação ao total de urinas avaliadas com este aspecto, enquanto que no tratamento ABZ a porcentagem foi de 7,78% e no CLA apenas 1,11%. Já as amostras de urina com tonalidade mais escura, foram classificadas como amarelo palha e foi verificado que 13,33% das amostras foram de animais que receberam o tratamento CLA e 7,78% foram de animais do tratamento CTL, enquanto que nos animais tratados com ABZ e CLC as porcentagens foram de 2,22 e 1,11%, nesta ordem.

Não houve diferença entre os tratamentos para o aspecto de turbidez da urina dos animais, embora tenham sido observadas em 17,78% dos animais do tratamento CTL amostras de urina classificadas como límpida, enquanto que a urina de animais dos tratamentos CLA, CLC e ABZ essa classificação representou 14,44, 13,33 e 8,89%, respectivamente. O aspecto considerado discretamente turvo variou entre 4,44 e 11,11% das urinas avaliadas. A turbidez foi verificada nas amostras de urina, sendo que 5,56% foram de animais que receberam o ABZ e 3,3% observada nas urinas de animais do tratamento CTL, em animais tratados com CLA e CLC esses valores foram de 1,11% para cada tratamento.

Tabela 7. Características físico-químicas das amostras de urina de cordeiros alimentados com dietas com elevada proporção de concentrado em porcentagem.

Parâmetros	Achados	Tratamentos				Valor de P
		CTL	CLA	CLC	ABZ	
Cor	A. citrino	8,89	12,22	14,44	13,33	P = 0,001
	A. ouro	8,89	1,11	8,89	7,78	
	A. palha	7,78	13,33	1,11	2,22	
	Límpido	17,78	14,44	13,33	8,89	
Aspecto	Discretamente turvo	4,44	11,11	10,00	8,89	P = 0,148
	Turvo	3,33	1,11	1,11	5,56	
	< 1.015	8,89	15,56	8,89	7,78	
Densidade	1.015 – 1.040	6,67	10,00	8,89	2,22	P = 0,004
	> 1.040	10,00	1,11	6,67	13,33	
	Negativo	2,22	7,78	4,44	1,11	
Proteína	Traço	14,44	16,67	12,22	5,56	P = 0,006
	30 - 100 mg/dL	6,67	1,11	5,56	10,00	
	> 100 mg/dL	2,22	1,11	2,22	6,67	
Sangue	Ausente	24.44	23.33	24.44	23.33	P = 0,189
	Presente	1.11	3.33	0.00	0.00	

A. citrino: cor amarelo citrino; A. ouro: cor amarelo ouro; A. palha: cor amarelo palha.

Houve diferença para a densidade da urina ($P = 0,004$). De todas as amostras de urina avaliadas 15,56% apresentaram densidade menor que 1.015 em animais do tratamento CLA, os tratamentos CTL e CLC corresponderam a 8,89% cada e 7,78% foram de animais que receberam o ABZ. A concentração urinária variando entre 1.015 a 1.040 nos animais do tratamento CLA correspondeu a 10% do total de amostras, ao passo que os animais tratados com CLA e CTL representaram 8,89 e 6,67%, respectivamente. Já as urinas dos animais tratados com ABZ representaram 2,22% do total de urina com esta densidade.

Maior concentração urinária, acima de 1.040 foi encontrada em 13,33% das amostras obtidas em animais tratados com ABZ, seguida por amostras dos

tratamentos CTL que correspondeu a 10,0% do total de amostras com esta densidade e nos tratamentos CLC e CLA, as urinas com densidade maior que 1.040 correspondeu a 6,67 e 1,11% das amostras analisadas.

Dentre os resultados obtidos por meio da urinálise, não houve diferença para a presença de sangue na urina entre os tratamentos. Porém, houve diferença para as concentrações de proteína ($P = 0,006$). De maneira geral, cerca de 64% das amostras avaliadas foram negativas ou apresentaram quantidades traço de proteína, enquanto que em aproximadamente 36% do total de amostras foram verificadas a presença de proteína, porém, desses 36% apenas 34% apresentaram concentração maior que 100mg/dL, observadas com maior frequência em animais tratados com ABZ em relação aos demais tratamentos.

7.7. Histologia

As análises histopatológicas mostraram que não houve efeito de tratamento sobre a prevenção da formação de urólitos. Nos tecidos avaliados (rim, vesícula urinária, uretra e processo uretral), não foram observadas alterações dignas de nota à histopatologia, apresentando estruturas típicas e preservadas, sem a presença ou indícios do processo de litogênese independentemente do tratamento aos quais os animais foram submetidos, (Figura 9).

Figura 9. Processo uretral e uretra sem presença de cálculo em ovino. H.E. obj.10x.

A: processo uretral; B: uretra; HE: hematoxilina e eosina; obj.10x: lente microscópica objetiva com aumento de 10 vezes.

Contudo, nos resultados histopatológicos provenientes das amostras de ureter, (Figura 10), foram observadas intensa estenose luminal, que é o estreitamento do canal do ureter, com modificação do epitélio, intensa fibrose e espessamento da lâmina própria. Além disso, em todos os tratamentos, as amostras continham urólitos calcificados ocupando a luz do órgão, indicando que os aditivos não tiveram o efeito preventivo esperado com sua utilização.

Figura 10. Ureter com presença de cálculo apresentando estenose luminal intensa em ovinos. HE, obj.4x.

HE: hematoxilina e eosina; obj.4x: lente microscópica objetiva com aumento de 4 vezes.

7.8. Escore de rumenite

Não houve diferença entre os tratamentos para o escore de rumenite, conforme Gráfico 3. Foi observada uma maior frequência de animais com escore de rumenite menor que três em todos os tratamentos, sendo o escore zero mais presente nos rúmens de animais que receberam o tratamento CLA, apesar disso, o maior escore de grau sete foi observado em um animal deste tratamento, sendo o único entre todos os animais em estudo a apresentar tal grau de lesão no epitélio ruminal.

Gráfico 3. Escore de rumenite em ovinos confinados alimentados com dietas com elevada proporção de concentrado.

CTL: tratamento controle; CLA: tratamento cloreto de amônio; CLC: tratamento cloreto de cálcio; ABZ: tratamento ácido benzoico; P: probabilidade para o efeito de tratamento ao nível de significância de 5% pelo Teste Fisher (LSD).

Lesões de grau quatro foram encontradas no rúmen de dois animais, sendo um do tratamento CLC e o outro tratado com o ABZ. Não foi observado este grau de lesão ruminal em nenhum outro animal dos demais tratamentos.

7.9. Morfometria de papilas e pH cecal

Não houve diferença para nenhuma das características de morfometria de papilas avaliadas neste estudo, conforme Tabela 8. Contudo, é possível observar que não houveram prejuízos relacionados à saúde ruminal e cecal dos cordeiros avaliados, independentemente do tratamento utilizado.

Houve diferença apenas para o pH cecal ($P = 0,034$), em que maiores valores de pH foram encontrados nos cecos de animais do tratamento CLA e CTL, seguidos pelos animais tratados com o CLC que apresentaram valor intermediário de pH cecal 5,72, e não diferiu de nenhum dos tratamentos, porém, os animais do tratamento ABZ que apresentaram pH de 5,60 foi menor comparado aos tratamentos CLA e CTL.

Tabela 8. Características de morfometria de papilas ruminais e pH cecal de cordeiros confinados recebendo diferentes aditivos para acidificação urinária.

Variável	Tratamentos				EPM	Valor de P
	CTL	CLA	CLC	ABZ		
AMP (cm ²)	0,277	0,224	0,282	0,259	0,014	0,465
RPSA (%)	90,67	91,10	90,94	90,13	0,398	0,783
NMP	35,23	45,57	35,96	36,38	1,688	0,109
ASA	10,29	10,79	10,59	8,91	0,468	0,302
pH cecal	5,88 ^a	5,97 ^a	5,72 ^{ab}	5,60 ^b	0,054	0,034

AMP cm²: área média de papilas ruminais em centímetro quadrado; RPSA (%): superfície de absorção em porcentagem; NMP: número médio de papilas ruminais; ASA cm²: área de superfície absorviva em centímetro quadrado; a-b: Letras similares não diferem entre si pelo teste t de Student ao nível de 5% de probabilidade.

7.10. Escore de lesão cecal

Não foi observada diferença entre os tratamentos para os escores de lesão cecal, Gráfico 4. Apesar disso, 37,5% dos escores observados foram de lesões de grau 10. Esses maiores escores de lesão foram observados nos cecos dos animais de todos os tratamentos, sendo que 25% foi observado em animais tratados com CLC e ABZ, que correspondeu a quatro animais em cada

tratamento e em 12,5% foi verificado nos cecos dos animais que receberam os tratamentos CTL e CLA, com dois animais em cada um dos tratamentos.

Graus de lesões com escore de 0 a 5 foram observados em 40,64% dos animais, sendo que quatro animais dos tratamentos CTL e CLA apresentaram escores dentro deste intervalo, enquanto que este escore de lesão foi verificado em três animais tratados com CLC e em apenas dois animais tratados com ABZ esse intervalo foi constatado.

Gráfico 4. Escore de lesão cecal em ovinos confinados alimentados com dietas com elevada proporção de concentrado.

CTL: tratamento controle; CLA: tratamento cloreto de amônio; CLC: tratamento cloreto de cálcio; ABZ: tratamento ácido benzoico; P: probabilidade para o efeito de tratamento ao nível de significância de 5% pelo Teste Fisher (LSD).

8. DISCUSSÃO

Os tratamentos não influenciaram nenhuma das características de desempenho avaliadas neste estudo. Contudo, a quantidade de matéria seca ingerida entre os tratamentos variou de 1,167 a 1,244 kg.dia⁻¹ estes valores encontram-se dentro do intervalo de 1,0 a 1,5 kg.dia⁻¹ para ovinos desta categoria, proposto pelo NRC (NRC, 2007). As condições de higiene dos animais e o manejo alimentar podem ter favorecido semelhança entre os dados de IMS, que corresponderam a uma média de ingestão de 3,43% em relação ao peso vivo, e não houve influência dos acidificantes utilizados.

Os valores de IMS foram próximos aos encontrados por Claffey et al. (2018) ao trabalharem com dietas com diferentes proporções de concentrado, fornecidas a 99 cordeiros, em diferentes períodos de alimentação, obtiveram média de IMS de 1,28 kg.dia⁻¹, observada nos animais submetidos às dietas com concentrado a vontade com fornecimento de 400g de forragem durante 72 dias.

Wang; Mandell e Bohrer (2020) avaliaram a resposta do ácido benzoico, do óleo essencial e da associação de ambos, como eventuais substitutos ao tratamento com monensina e tilosina na dieta de bovinos em terminação, e não encontraram efeito do ácido benzoico sobre a IMS ou GMD, em relação aos demais tratamentos, embora os autores tenham utilizado outra espécie de ruminante. Essa resposta se assemelha aos resultados do presente estudo, no qual também não foram encontradas diferenças sobre as mesmas características, com a utilização do ABZ, ou mesmo dos demais aditivos.

Kluge; Broz e Eder (2006) em um trabalho realizado com leitões, forneceram ABZ nas concentrações de 5 e 10 g/kg de MS e também não observaram efeito dos tratamentos sobre a IMS, isso mostra que mesmo em diferentes espécies de animais o ABZ aparenta não ter efeito negativo relacionado a ingestão de alimentos. Por outro lado, em um trabalho realizado por Diao et al. (2016) com leitões, foi avaliada a inclusão de ABZ em uma concentração semelhante a utilizada no presente estudo 5 g/kg e verificaram que houve um efeito do tratamento em relação ao controle, com maior IMS em animais que receberam o aditivo. Esses autores associaram o efeito benéfico do

ABZ a diminuição do pH da dieta e ao aumento da atividade de enzimas digestivas, além das alterações provocadas no epitélio jejunal, melhorando a capacidade digestiva dos leitões.

Embora não tenha sido observado efeito de tratamentos sobre a IMS neste trabalho, é possível que o fornecimento de concentrações maiores dos sais aniônicos possam causar uma redução do consumo, conforme relatado por Ortolani (2002) que afirma que o principal problema do fornecimento destes sais, principalmente o CLA, é que são pouco palatáveis e quando fornecidos em quantidades elevadas, podem diminuir a IMS. Ou mesmo pelo estabelecimento de um quadro mais severo de acidose em decorrência da queda do pH ruminal, motivado pelas alterações no balanço eletrolítico, pois de acordo com Ferreira et al. (2014) o cloreto de amônio induz a acidose metabólica e diurese transitória, dessa forma, o íon cloreto age como doador de H^+ , levando a esta condição.

Os efeitos dos sais aniônicos sobre a redução da ingestão de alimentos associadas ao CLA dão suporte a preocupação relatada por Mavangira; Cornish e Angelos (2010) de que o fornecimento diário de 500 mg/kg de CLA poderia promover a acidose metabólica, podendo causar efeito negativo ao consumo. Contudo, a redução da IMS pode ser, não necessariamente, apenas em função da palatabilidade do CLA reportadas por Jorgensen (1974) e Belknap; Pug (2002), ou dos sais aniônicos, como reportado por OETZEL et al. (1988), mas do distúrbio metabólico causado pelo seu uso prolongado. Embora, Bushman; Embry e Emerick (1967) ao utilizarem diferentes sais aniônicos, entre eles o CLA e o CLC em comparação ao tratamento controle, nas concentrações de 0,5 e 1,5% da dieta, não observaram efeito dos tratamentos para a IMS, assim como os resultados encontrados no presente estudo.

Sob as condições do estudo, a semelhança observada entre os tratamentos para os dados de IMS refuta algumas informações discutidas previamente de que a adição dos compostos acidificantes pode promover uma redução da ingestão de matéria seca. Isto porquê ainda não foi estabelecido um consenso científico acerca do principal motivo que resulta na redução da IMS, tendo em vista que diversos trabalhos relacionam essa redução a menor palatabilidade dos sais aniônicos, enquanto outros definem que a menor

ingestão ocorre em função do quadro acidótico que se estabelece devido ao uso prolongado ou quantidades excessivas destes sais, ou a forma com que esses aditivos são fornecidos.

Os tratamentos não afetaram o ganho médio diário de 0,345 kg observado nesse estudo. Esses resultados foram próximos (0,357 kg.dia⁻¹) ao encontrado por Ferreira et al. (2014) que também não observaram diferença no ganho médio diário ao avaliarem os efeitos da adição CLA em ovinos sobre o equilíbrio eletrolítico e ácido básico, além do pH urinário muito próximo ao encontrado neste estudo. Os autores concluíram que a concentração de CLA de 400 mg/kg de peso vivo pode ser utilizada sem afetar o desempenho dos animais.

Da mesma forma, Wang; Mandell e Bohrer (2020) trabalhando com bovinos, ao avaliarem entre outros tratamentos, o uso de ácido benzoico na concentração de 0,5% com base na MS, em substituição aos ionóforos monensina e tilosina, também não observaram diferenças no GMD. Por outro lado, diferenças no GMD foram encontradas por Guggenbuhl et al. (2007) ao utilizarem uma dieta contendo ABZ na mesma concentração em comparação à dieta controle, fornecida a leitões, quanto observaram que os animais que receberam ABZ apresentaram maior IMS e maior desempenho, esses resultados foram explicados por mudanças na população de bactérias gástricas, como as bactérias lácticas e *E. coli*.

Contudo, considerando que, para ruminantes, a principal fonte de energia é oriunda do metabolismo de ácidos graxos (HENRIQUE et al., 2007), realizado pela microbiota ruminal, não é possível afirmar que houve modificação alguma da população em função do tipo de aditivo utilizado, por não ter sido objeto de análise neste estudo. Portanto, há de se ressaltar a existência dessa particularidade nos animais ruminantes, que os tornam diferentes dos monogástricos, cuja principal fonte de energia são os açúcares presentes nos alimentos, derivados do metabolismo de carboidratos, principalmente os provenientes do milho.

Com relação ao balanço cátio-aniônico da dieta do presente estudo, houve uma variação de -36,99 a +81,52 que pode ser considerada pequena,

comparada a outros estudos cujo foco foi avaliar os efeitos diretos da manipulação do BCAD no animal. Porém, esse intervalo não foi capaz de imprimir qualquer efeito sobre as características de desempenho, diferente do que foi observado por Del Claro et al. (2004) ao avaliarem a relação entre os diferentes níveis de BCAD -160, -40, +140, +250 e +500 mEq/kg de MS, respectivamente e observarem que houve o aumento linear da IMS, GMD e eficiência alimentar. Esses resultados foram associados ao efeito antagônico dos cátions, que poderia explicar o melhor desempenho dos animais que receberam dietas com BCAD positivo.

Os tratamentos utilizados neste estudo não afetaram o peso vivo final dos animais, com média de 42,65 kg, valor considerado adequado para os animais nessa categoria, criados em confinamento. Embora também não tenha ocorrido diferença entre os tratamentos, foi observada uma IMS média de 3,43% em relação ao peso vivo e uma média de ganho de peso total médio de 19,1 kg para todos os tratamentos, que foi maior a média de ganho de peso 17,7 kg reportada por Bezerra et al. (2020) ao utilizarem dieta com alta proporção de concentrado semelhante a utilizada no presente estudo. A IMS em porcentagem do peso vivo foi menor do que a encontrada por Maciel et al. (2017) que forneceram dietas acidogênicas, utilizando a vitamina C como aditivo acidificante e encontraram a IMS de 4,6% em relação ao peso vivo, porém, quando avaliado o ganho de peso total em kg, os animais avaliados no presente estudo, apresentaram maior valor, comparado aos 13,66 kg de ganho encontrado pelos referidos autores.

Diferenças foram observadas no eritrograma apenas para a quantificação da hemoglobina, em que, os animais que receberam o tratamento ABZ apresentaram maior concentração desses glóbulos vermelhos no sangue 13,24 g/dL, diferindo apenas do tratamento CLA que obteve o menor valor desse elemento 12,05 g/dL. Os demais parâmetros avaliados não diferiram entre os tratamentos.

Ao utilizarem a Vitamina C como acidificante, os valores de hemoglobina encontrados por Maciel et al. (2017) foram semelhantes aos deste estudo 12,73 e 12,77 g/dL, respectivamente, com menor valor de hematócrito 33%, porém, maiores valores foram relatados para CHCM, VCM e proteína plasmática,

38,24%, 28,63 fL e 6,46 g/dL, respectivamente. Os dados que compõem o eritrograma podem indicar quadros de anemia, quando se encontram abaixo do intervalo de referência dentro de cada espécie, embora tenha sido encontrado menor valor de CHCM, VCM e proteína plasmática, quando comparado ao referido trabalho, os valores médios gerais de todos os parâmetros permaneceram dentro das variações encontradas na literatura Meyer e Harvey (2004) e Kramer (2000), comprovando a boa saúde dos animais.

Os leucócitos são produzidos pela medula óssea e conhecidos como as células brancas do sangue, responsáveis pelos mecanismos de defesa do organismo, que atuam contra agentes infecciosos e em condições de reações alérgicas ou falhas na medula óssea. Quando encontrados em concentrações acima do intervalo estabelecido para a espécie é denominado o quadro de leucocitose, do contrário, quando os valores estão abaixo podem caracterizar o quadro de leucopenia.

Mesmo não havendo influência dos aditivos utilizados, sobre os valores médios entre os tratamentos encontrados no leucograma, os leucócitos totais 7.268 / μ L, neutrófilos segmentados 2.842 / μ L, linfócitos 4.017 / μ L, eosinófilos 85,76 / μ L, basófilos 60,64 / μ L e proteína plasmática 5,96 g/dL, foram menores do que os encontrados por Maciel et al. (2017), 10.034, 5.469, 4.811, 214, 95,75 / μ L e 8,22 g/dL, respectivamente. Porém, houve uma inversão do resultado quando foram comparadas as concentrações de monócitos, que foram maiores no presente estudo 260,2 / μ L, enquanto que os referidos autores encontraram concentrações de 190 / μ L.

Essas maiores concentrações encontradas pelos autores podem ter sido influenciadas pela constatação da presença de cristais principalmente os compostos por fosfato amorfo, bem como carbonato cálcio, fosfato triplo e fosfato de cálcio no grupo controle, sendo que apenas os cristais fosfato amorfo foram encontrados nos animais que receberam a vitamina C como acidificante.

Nos animais utilizados neste experimento, não foi possível a observação da presença de cristais tanto na urina, quanto na avaliação histológica, mesmo para os animais que não receberam aditivo, dessa forma, associada ao fato de

que as concentrações leucocitárias permaneceram dentro dos intervalos encontrados na literatura (KRAMER, 2000; MEYER; HARVEY, 2004), acreditamos que a saúde dos animais tenha colaborado para manutenção das concentrações séricas dos leucócitos dentro das margens previamente estabelecidas, mesmo com o fornecimento de dietas com elevada proporção de concentrado, não havendo efeito dos tratamentos.

Embora não tenha sido observado efeito significativo entre os tratamentos sobre os parâmetros de bioquímica sérica, os níveis séricos de fósforo encontrados no presente estudo variaram entre 8,38 e 8,93 mg/dL, essa variação ocorreu dentro do intervalo proposto pelo NRC (2007) que é de 6 a 9mg/dL, bem como dos resultados propostos por Souza et al. (2016) que determinaram valores entre 4,06 a 12,7 mg/dL, para ovinos na faixa etária dos animais do presente estudo, mesmo este sendo um valor maior do que o valor médio geral de referência de 1,2 a 2 mg/dL, encontrados por Kaneko; Harvey e Bruss (2008) e de 1,2 a 1,9 mg/dL proposto por Meyer e Harvey, (2004), devem ser consideradas as diferenças que podem haver com relação as possíveis variações de raças, sexo, alimentação e até mesmo as características climáticas onde são realizados os estudos.

O aumento linear observado no fósforo sérico em função do tempo pode ter ocorrido devido a exposição dos animais às dietas com elevada proporção de concentrado. Louvandini e Vitti (1994), em ensaio metabólico forneceram diferentes níveis de fósforo para ovinos 1, 2 e 3 g/animal/dia e verificaram uma relação de $r = 0,90$ entre o fósforo absorvido com o fósforo consumido. De acordo com Minervino et al. (2014), a maior presença de fósforo disponível na dieta reflete em uma maior concentração sanguínea desse mineral. Dessa forma, o fósforo presente nos ingredientes da dieta, em especial o milho, além do tempo que passaram ingerindo essa dieta, podem ter causado a elevação dos níveis séricos desse mineral nos animais em estudo.

Além disso, as concentrações séricas de fósforo estão relacionadas ao seu metabolismo no organismo, que de acordo com Gonzáles e Scheffer (2012) são variáveis nos ruminantes, devido a sua reciclagem via saliva e sua absorção ruminal e intestinal, além de afirmarem que dietas ricas em cereais que contém

altos teores de fósforo podem causar a hiperfosfatemia em ovinos e caprinos, com risco do surgimento da urolitíase.

Segundo Membrive (2016), a saliva é a principal secreção realizada pelo trato digestivo, cujo volume depende de maneira direta do tempo dispensado à mastigação e possui papel importante na manutenção do pH ruminal. Além disso, o tipo de alimento ingerido pelo animal tem grande influência sobre a quantidade de saliva produzida, a qual ocorre em maior quantidade quando são consumidos alimentos fibrosos e tem seu volume reduzido durante o consumo de alimentos concentrados.

Considerando as condições deste estudo, a produção de saliva é baixa em decorrência do tipo de dieta utilizada, comparada ao volume de saliva produzido por animais cuja dieta possui maior quantidade de fibras, por consequência, o fósforo da dieta é absorvido pelo epitélio ruminal, aumentando assim, suas concentrações séricas, que podem causar uma sobrecarga renal, pelo fato de a urina ser uma das vias de eliminação do fósforo sérico, enquanto que as fezes são a principal via de eliminação do fósforo que é reciclado e produzido via saliva.

Antonelli et al. (2012), compararam o tratamento controle composto por 100% de forragem com a substituição de 50% da forragem com base na MS por diferentes fontes energéticas, farelo de arroz, farelo de trigo e polpa cítrica sobre a predisposição da urolitíase para cabritos e encontraram valores menores de fósforo sérico 3,10, 2,29, 4,65 e 5,34 mmol/dL, fornecendo os tratamentos controle, polpa cítrica, farelo de trigo e farelo de arroz, respectivamente. Além disso, encontraram correlação positiva entre a concentração sérica deste mineral com sua excreção urinária ($r = 0,71$), e correlação negativa ($r = -0,69$) entre o pH urinário e o fósforo presente na urina. Os autores também observaram cristais nos tratamentos farelo de arroz com pH de 6,37 e farelo de trigo com pH de 6,27, cujos valores foram considerados ligeiramente ácidos e foram próximos ao pH encontrado neste estudo para o tratamento CLC 6,46, sendo este o maior valor de pH entre os aditivos utilizados e mesmo assim, não houve a formação dos cálculos em nenhum dos tratamentos. Os referidos autores concluíram que as

concentrações séricas de fósforo exercem maior influência na formação dos cálculos do que o pH urinário.

Partindo desse ponto, os teores de fósforo encontrados no presente estudo foram menores quando comparado aos de Antonelli et al. (2012), e apresentaram relação dietética entre cálcio e fósforo adequada conforme reportado na literatura de 1:1 a 2:1 (BATISTA et al. 2020). Dessa forma, esses dados reforçam o conceito de que a sobrecarga renal pode acontecer com maior intensidade, quando são fornecidas altas concentrações de fósforo na dieta, o que não ocorreu neste trabalho.

Houve efeito de tempo sobre as variáveis avaliadas na bioquímica sérica, exceto cloreto e potássio. De maneira geral, as concentrações séricas dos componentes avaliados neste exame aumentaram em decorrência do tempo, exibindo um efeito linear crescente. Que pode ser associado ao aumento da idade e não somente ao tipo de dieta aos quais são submetidos.

Em um estudo retrospectivo de urolitíase obstrutiva em ovinos, Guimarães et al. (2012) destacaram entre os achados níveis elevados de ureia 185,61 mg/dL e creatinina 4,71 mg/dL, maiores do que os encontrados no presente estudo, 42,5 e 0,85 mg/dL, respectivamente. Esses maiores valores encontrados pelos autores são condizentes com o quadro de azotemia nos animais acometidos pela obstrução total ou parcial das vias urinárias. A condição de azotemia se estabelece quando compostos nitrogenados como ureia e creatinina estão presentes em concentrações elevadas no sangue, soro ou plasma, que podem interferir na taxa de filtração glomerular, causando danos aos rins.

Os tratamentos não influenciaram nenhuma das características avaliadas na bioquímica sérica. Contudo, mesmo com o aumento da concentração em decorrência do tempo, o total de dias não foi suficiente para promover o estabelecimento da azotemia, tendo em vista que todos os índices avaliados permaneceram dentro da variação dos intervalos de referência (BYERS; KRAMER, 2010; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

Souza et al. (2016) também estabeleceram intervalos de cloretos presentes no plasma de ovinos e encontraram níveis séricos variando entre 89,2

e 141,3 mg/dL, um intervalo menor foi preconizado por Kaneko; Harvey e Bruss (2008), com níveis plasmáticos de 128 a 148 mg/dL, fazendo uma comparação, os dados séricos aqui encontrados estão na faixa apenas do primeiro estudo, possivelmente, por se tratar de animais do mesmo grupo racial, cruzados entre os animais das raças Dorper e Santa Inês, com a mesma faixa etária e criados em condições brasileiras.

Essas variações de valores entre os trabalhos podem ser associadas as condições em que cada estudo foi realizado, pois, de acordo com Souza et al. (2016) fatores como raça, idade, sexo podem influenciar os níveis séricos de eletrólitos no plasma de ovinos, a nutrição e o clima também podem exercer tais efeitos. Além disso, animais nessa faixa etária apresentam maior metabolismo, em especial do fósforo, devido ao desenvolvimento ósseo durante esta fase.

Aos 56 dias, ocorreu a última avaliação da urina dos animais em estudo e foi observado que o tratamento CLC foi o que promoveu maior acidificação do pH urinário, embora não tenha sido diferente do tratamento CLA, ou seja, com o objetivo de promover a acidificação urinária, o CLC pode ser um aditivo substituto do CLA, enquanto que o tratamento ABZ, apesar de apresentar valor de pH igual ao tratamento CLA, também exibiu pH urinário semelhante ao observado para o tratamento CTL, podendo eventualmente não ser tão eficaz para esta finalidade, mesmo em animais alimentados com dietas com elevada proporção de concentrado, que são predisponentes ao estabelecimento de quadros acidóticos.

De acordo com Goff (2000) a utilização de dietas aniônicas induz a acidose metabólica, por meio de um aumento compensatório de íons de hidrogênio (H^+) extracelular, diante desta condição, os rins desempenham uma importante função, que é excretar o excesso de H^+ como mecanismo para manutenção da eletroneutralidade, mantendo o equilíbrio ácido-básico, conseqüentemente, a urina torna-se mais ácida e essa acidificação urinária é reflexo do quadro de acidose (ORTOLANI, 2002).

De maneira geral, animais que receberam o CLC apresentaram valores médios menores de pH urinário de 6,46, seguido pelos animais do tratamento CLA com pH de 7,06, enquanto que na urina dos animais dos tratamentos CTL

e ABZ os valores médios de pH foram mais alcalinos 7,64 e 7,59, respectivamente. Castañeda et al. (2009) ao avaliarem a inclusão do CLA em diferentes níveis, 0, 0,35, 0,70, 1,05 e 1,40% na MS da dieta de vacas leiteiras, encontraram valores menores de pH urinário de 6,9, 5,9, 5,8, 5,9 e 5,9, nesta ordem, em comparação aos valores de pH urinário encontrados no presente estudo.

Da mesma forma, ao avaliarem o efeito do fornecimento de uma dieta aniônica em relação a dieta controle para vacas em lactação, Marques et al. (2011) observaram que o fornecimento diário de 250 g/animal de CLA reduziu de 7,89 para 5,17 o pH urinário dos animais, enquanto que os animais do tratamento controle, que não receberam a dieta aniônica, apresentaram valor dentro da faixa de normalidade, acima de 6,5 e ressaltaram a importância da função renal no equilíbrio ácido-base, na qual os rins excretam íons de amônio (NH_4^+) para aumentar o pH da urina quando o pH sanguíneo tende a diminuir, em função da administração de sais aniônicos, aumentando a concentração sistêmica de íons H^+ , embora, essas variações de pH no sangue sejam mais discretas devido ao controle das funções renais e respiratórias.

Resultados diferentes foram reportados por Gomide et al. (2004) que, ao manipularem o BCAD da dieta utilizando o CLA, como fonte de ânion, não observaram diferenças no pH urinário de cordeiros, com valores de pH 7,38, 7,06, 7,36 e 8,39 para os valores crescentes de BCAD -12, +30, +76 e +133, respectivamente. Esses valores de BCAD estão dentro da variação observada no presente estudo, exceto o BCAD +133. Entretanto, mesmo com a semelhança entre o BCAD, dos valores encontrados neste trabalho apenas o pH da urina proveniente de animais que receberam o CLC foi menor (6,46), enquanto que o pH urinário dos animais do tratamento CLA foi semelhante ao menor valor apresentado pelos autores. Contudo, o comportamento de acidificação no presente estudo ocorreu de maneira semelhante, onde, dietas com menor valor de BCAD resultaram em urinas com valores de pH menores proporcionalmente.

Dessa forma, é possível observar que há uma relação direta entre os valores de BCAD e a acidificação urinária, assim como no trabalho desenvolvido por Jones; Streeter e Goad (2009) utilizando diferentes doses de cloreto de

amônio, via sonda esofágica, 1,47, 1,07, 0,68 e 0,29% na MS e BCAD de -150, -75, 0 e +75 mEq/kg MS, alcançaram valores de pH menores de acordo com o menor valor de BCAD, sendo que, apenas o BCAD +75 mEq/kg de MS não atingiu a faixa de variação do pH entre 6,0 e 6,5, requerida pelos autores.

Por outro lado, para os referidos autores, a manutenção do pH < 6,0 durante longos períodos, encontrado na dieta com BCAD de -150 mEq/kg de MS, pode representar alterações no equilíbrio ácido-básico, que é responsável por diversas funções no organismo, ou seja, pode causar a acidose ruminal, que, segundo Millen et al. (2016), podem dar origem a outros distúrbios metabólicos. Com isso, os autores consideraram como mais seguro o intervalo de BCAD entre -75 e +75 mEq/kg de MS, para alcançar o pH entre 6,0 e 6,5. Condição semelhante foi encontrada no presente trabalho, conferindo uma margem segura de acidificação urinária, para os tratamentos CLC e CLA com valores de pH de 6,10 e 6,55, respectivamente ao final do período experimental, cujos valores de BCAD foram de -36,99 e -17,10, respectivamente.

Comparado com os resultados do presente estudo, observa-se que tanto para o CTL com BCAD de +52,52, quanto para o ABZ cujo valor foi +81,52, em todos os momentos o pH urinário permaneceu maior do que a faixa considerada no trabalho reportado previamente, alcançando valores de pH de 7,59, 7,44 e 7,89 para o CTL e 7,91, 7,67 e 7,20 para o ABZ, nos tempos 1, 28 e 56 dias.

Outro efeito observado neste trabalho foi em relação ao volume de urina, que, apesar de ser um volume amostral, foi maior em animais que receberam o tratamento CLA 7,75 mL, comparados aos demais tratamentos CTL, CLC e ABZ que não diferiram entre si, embora esse volume não represente o volume total diário de urina produzida. É possível que essa diferença tenha ocorrido em função da maior diurese ocasionada pela utilização do CLA, pois, de acordo com Jones; Streeter e Goad, (2009) o CLA atua como diurético, sendo absorvido pelo intestino e convertido pelo fígado a ornitina para entrada no ciclo da ureia. O cloreto atua como doador de H⁺ que é excretado pelos túbulos renais, produzindo uma urina acidificada, como forma de correção do equilíbrio ácido-básico (FERREIRA et al. 2014).

Um aumento linear no volume de urina produzido foi encontrado por Castañeda et al. (2009) variando de 7,7 a 13,2 ml, conforme o aumento da concentração do CLA, de maneira semelhante aos resultados encontrados no presente estudo, em que houve de fato um maior volume amostral de urina produzida pelos animais que receberam este tratamento, corroborando como as informações reportadas por Jones; Streeter e Goad (2009) e Ferreira et al. (2014), que atribuem o aumento da diurese ao efeito CLA.

Informações encontradas no NRC (NRC, 1985), afirmam que animais acometidos pela urolitíase obstrutiva apresentam urina mais alcalina. Apesar de serem observados valores de pH acima de 7,0, considerado alcalino, em nenhum dos tratamentos, independentemente do pH urinário foi observada a presença de urólitos. Porém, não há uma definição do tempo demandado para o estabelecimento desta enfermidade, além disso, como relatado anteriormente por Antonelli et al. (2012), diversos fatores além do pH urinário podem predispor o processo de litogênese, tais como a descamação de células epiteliais do trato urinário e concentrações elevadas de minerais na urina.

Ademais, de acordo com Riet-Correa; Simões e Vasconcelos (2008), outros fatores a serem considerados são o fornecimento de dietas com elevada proporção de concentrado, a relação entre o cálcio e o fósforo da dieta, bem como o fornecimento de forragem de qualidade. Loretti et al. (2003) também incluem a importância do fornecimento de água de qualidade, o que de fato parece ter um papel fundamental na prevenção da urolitíase, que se dá através do aumento do volume e fluxo urinário, bem como a diluição da urina e é reportado no NRC (1985) que o fornecimento de cloreto de sódio como método preventivo contra o desenvolvimento da urolitíase se dá pelo aumento do consumo de água pelos animais.

As diferenças encontradas na densidade urinária mostraram efeito do tratamento sobre este aspecto. Os valores de densidade urinária auxiliam na interpretação das funções renais, tendo em vista que os rins de acordo com Strasinger (1996) são os órgãos responsáveis por funções de regulação, excreção e endócrinas.

Foi observada, em todos os tratamentos, a maior frequência de urina com valores de densidade abaixo ou dentro do intervalo de referência para a espécie que varia de 1.015 a 1.045 (REECE, 2006; CARVALHO, 2008), exceto para o tratamento ABZ que apresentou comportamento inverso, com maior frequência de animais com concentração urinária acima de 1.040. Valores considerados normais também foram encontrados por Santarosa et al, (2016). De acordo com Loreti et al. (2003) a diluição da urina pode ser ocasionada pelo consumo de água aumentando assim o volume urinário. Além disso, os animais tratados com CLA apresentaram maior frequência de animais com densidade abaixo de 1.015 que pode ser reflexo do aumento da diurese como reportado por Jones; Streeter e Goad (2009) que associam esse efeito ao CLA.

Os resultados histológicos evidenciaram que os tratamentos não impediram a formação dos urólitos, tendo em vista que os ureteres dos animais, em todos os tratamentos, apresentaram urólitos a luz deste órgão. De acordo com Santarosa et al. (2016) a presença de cristais são indicativos de agressão tubular em decorrência de sua formação, o que, segundo os autores, poderia ser associada ao CLA, porém, por ter sido observada em apenas um animal, esta hipótese não foi confirmada, pois, para tanto deveria haver maior quantidade de animais com degeneração e necrose tubular, o que não ocorreu no referido trabalho.

No presente estudo, a formação de urólitos no ureter foi observada em todos os tratamentos, incluindo o tratamento controle, que faz com que essa formação, de fato, não esteja somente associada ao CLA, mas, às dietas com elevada proporção de alimento concentrado, que de acordo com Riet-Correa; Simões e Vasconcelos (2008), Antonelli et al. (2012) e Guimarães et al. (2012), a utilização deste tipo de dieta pode ocasionar o desenvolvimento da urolitíase.

Entretanto, apesar da observação de urólitos formados no ureter, nos demais órgãos, avaliados através da histologia, não houve manifestação da formação de urólitos, bem como não houve qualquer alteração das funções renais ou obstrução das vias urinárias. Com isto, acreditamos que o tempo de permanência no confinamento e a pouca idade dos animais ao abate, possam ter sido insuficientes para que ocorresse a obstrução total.

Neste sentido, a respeito da prevenção da formação de urólitos, os tratamentos propostos não foram eficazes, uma vez que, mesmo em animais cujo pH urinário foi mais ácido, menor que 6,6, verificados em animais que receberam os tratamentos CLC e CLA, ao final do período experimental, foram observadas a presença de urólitos, nas análises histológicas. Ao passo que os animais dos tratamentos ABZ e CTL também apresentaram condição semelhante em pH urinário acima de 7,0.

Estes dados corroboram com as premissas encontradas na literatura de que, apesar de ser um fator importante para o desenvolvimento da urolitíase, o pH urinário ácido não impede a formação do urólito se os teores de fósforo urinário estiverem elevados (ANTONELLI et al., 2012). Os mesmos autores reportaram que o fator determinante para a formação dos cristais que compõem o cálculo urinário é a elevada concentração de fósforo na urina, que tem alta correlação positiva com o fósforo sérico e que o pH urinário ácido não impede a formação dos urólitos se os teores de fósforo urinário estiverem elevados, situação observada no presente estudo.

Por este motivo, acreditamos que, embora tenha sido observada uma elevação dos níveis séricos de fósforo acima dos valores de referência de 1,2 a 1,9 mg/dL propostos por Meyer e Harvey (2004), os níveis séricos permaneceram dentro do intervalo de 3,03 a 12,1 mg/dL encontrado por Souza et al. (2016) em animais das raças Dorper e Santa Inês com idades semelhantes a dos animais utilizados neste trabalho e criados sob condições brasileiras, o que torna esse intervalo mais adequado para comparação e dá suporte ao fato de que o aumento observado na concentração sérica de fósforo tenha ocorrido em função do consumo de fósforo provenientes da dieta.

Não houve diferença para as características de morfometria de papilas ruminais independente do tratamento fornecido. A área média de papilas ruminais encontradas no presente estudo foi de 0,260 cm², não caracterizando danos significativos ao epitélio ruminal em função do uso de acidificantes comparado ao tratamento CTL, o qual não houve a inclusão de qualquer aditivo. Da mesma forma, não houve diferença para a RPSA, o NMP e a ASA.

Em seu trabalho Xu et al, (2018) compararam uma dieta controle com 94,6% de feno com uma dieta composta por 60% de concentrado, durante 4 semanas e verificaram que houve o aumento no comprimento, largura e área de absorção das papilas ruminais em decorrência do fornecimento de dietas de alto concentrado e da duração do período de alimentação, sendo este aumento considerado um processo de adaptação do epitélio ruminal a maior produção e absorção de AGCC produzidos pela microbiota e a consequente redução do pH nesse ambiente.

As papilas ruminais são estruturas desenvolvidas para aumentar a área da superfície epitelial para absorver os AGCC produzidos pela fermentação microbiana e suas dimensões dependem da composição energética dos alimentos e do tipo de alimento consumido, que causam alterações morfológicas nessas estruturas (MILLEN et al., 2016), ou seja, em dietas de alto concentrado as papilas podem aumentar em tamanho e largura. Contudo, no presente estudo, a semelhança na morfometria de papilas ruminais, observada entre os tratamentos pode ter ocorrido em função da similaridade entre as dietas, compostas por 94% de alimento concentrado e apenas 6% de feno como fonte de volumoso.

De modo geral, apesar da elevada proporção de concentrado, os tratamentos não provocaram danos severos ao epitélio ruminal, de maneira que, apenas um animal dentre todos os tratamentos apresentou lesão de grau 7, cujo tratamento utilizado foi o CLA, enquanto que o restante dos animais apresentou escore de lesão menor que 4, correspondente a 40% de comprometimento ruminal. Esses dados indicam que, apesar de serem compostos acidificantes, mesmo em dietas com elevada proporção de concentrado, estes aditivos não promoveram o comprometimento das funções ruminais dos animais exercidas pelas papilas.

Lesões ao epitélio ruminal poderiam ser esperadas, uma vez que dietas com elevada proporção de concentrado, como as utilizadas neste estudo, são assumidamente relacionadas ao risco do estabelecimento de distúrbios metabólicos como a acidose ruminal, que de acordo com Millen et al. (2016), podem predispor o surgimento da rumenite, paraqueratose, além de abscessos

hepáticos e laminites. Ainda segundo os autores, isso ocorre em função das variações na população da microbiota ruminal, associadas a redução do pH do meio, podem causar a morte de algumas bactérias, em especial as Gram-negativas.

Apesar do tipo da dieta utilizada, a adição dos compostos não foi capaz de causar maiores danos ao epitélio ruminal sob as condições do presente estudo. Dessa forma, o uso dos acidificantes avaliados pode ser considerado seguro em relação a saúde ruminal.

Houve efeito de tratamento sobre o pH cecal dos animais. Foi observado o maior valor de pH 5,97 nos animais tratados com CLA, seguido pelo tratamento CTL com pH de 5,88, ambos os tratamentos diferiram apenas do tratamento ABZ que obteve o menor valor de pH cecal 5,60, ou seja, mais ácido, enquanto que o tratamento CLC não diferiu de nenhum dos tratamentos e obteve um pH intermediário de 5,72.

Considerando que o ceco e o cólon são responsáveis por cerca de 8,6 a 16,8% da produção total de AGCC (Ulyatt et al. 1975), com os dados encontrados é possível inferir que a acidificação cecal causada pelo uso de acidificantes pode favorecer a absorção de acetato, propionato e butirato, neste órgão que é considerado o último local para o aproveitamento desses ácidos graxos no ruminante.

Poucas informações na literatura fazem referência ao metabolismo cecal em cordeiros. Em um estudo realizado na década de 60, Myers; Jackson e Packett (1967) observaram que o pH cecal exerce influência nos mecanismos de absorção dos AGCC, e verificaram redução na absorção quando houve o aumento do pH de 6,2 para 7,5. Em um trabalho avaliando a suplementação com farelo de algodão Krysl et al. (1987) observaram que essa suplementação alterou a dinâmica do fluido ruminal, mas teve efeitos mínimos na dinâmica cecal, sem alterações nas medidas de fermentação e pH cecal em ovelhas. Por outro lado, Giori; Oregui e Garcia-Rodriguez (2010) estudando os efeitos da quitosana sobre a fermentação cecal de ovelhas, concluíram que a quitosana pode ter possível

efeito sobre a microbiota, em especial as bactérias celulolíticas, e com isso, capacidade para modular a fermentação tanto ruminal quanto a cecal.

9. CONCLUSÕES

Sob as condições do presente estudo, a adição de acidificantes à dieta com elevada proporção de concentrados para cordeiros não causou depressão na ingestão de alimentos, ou no desempenho e não provocaram lesões relevantes ao epitélio ruminal ou cecal.

Os parâmetros avaliados através de hemograma e bioquímica sérica não foram afetados pelo uso dos acidificantes, com níveis séricos dentro dos intervalos de referência encontrados na literatura para a espécie ovina.

O cloreto de cálcio provocou maior acidificação urinária, seguido pelo cloreto de amônio, podendo ser utilizado como seu substituto quando este for o objetivo. Contudo, os acidificantes não foram eficazes na prevenção da urolitíase, sendo constatada a presença de urólitos nos ureteres dos animais em todos os tratamentos.

A alimentação intensiva pode ter propiciado a formação dos urólitos, no entanto, a curta duração do período de confinamento e a pouca idade dos animais podem não ter sido suficientes para causar a obstrução das vias urinárias. Apesar da ocorrência da urolitíase, o cloreto de cálcio protegido pode ser uma alternativa ao cloreto de amônia.

10.REFERÊNCIAS

ANTONELLI, A. et al. Efeito de diferentes fontes energéticas na predisposição para urolitíase em cabritos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, p. 487-493, 2012.

ANDRADE, T. J. A. S. et al. Antioxidant properties and chemical composition of technical Cashew Nut Shell Liquid (tCNSL). *Food Chem.* v. 126, p. 1044–1048, 2011.

AQUINO NETO, H. M. et al. Urolitíase obstrutiva em ovinos: revisão de literatura. *Vet. Foco*, 4(2), p.191-202, 2007.

ASSIS, A. C. O. et al. Urolitíase obstrutiva em bovinos no semi-árido paraibano. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, supl. 1, p. 41-45, 2009.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 17th ed. Arlington, VA, EUA, 2000.

BANAKAR, P. S.; ANAND K. N.; SHASHANK, C. G. Physically effective fibre in ruminant nutrition: A. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 4, p. 303-308, 2018.

BATISTA, A. B. et al. Urolitíase obstrutiva em ovino—relato de caso. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, v. 17, n. 34, 2020.

BEAUCHEMIN, K. A. Invited review: Current perspectives on eating and rumination activity in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 6, p. 4762-4784, 2018.

BELKNAP, E. B.; PUGH, D. G. Diseases of the urinary system. In: Pugh DG, ed. *Sheep and goat medicine*. Philadelphia: Saunders, p. 255–276, 2002.

BEZERRA, H. V. A. et al. Effect of castor and cashew nut shell oils, selenium and vitamin E as antioxidants on the health and meat stability of lambs fed a high-concentrate diet. **Antioxidants**, v. 9, n.12, p. 1298. 2020.

BIGHAM, M.L.; MCMANUS, W.R. Whole wheat grain feeding of lambs. Effects of roughage and wheat grain mixtures. **Aust. J. Agric. Res.** n. 26, p. 1053–1062, 1975.

BLOCK, E. Manipulation of dietary cation-anion difference on nutritionally related production diseases, productivity, and metabolic responses of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.77, n.5, p.1437-1450, 1994.

BRAITHWAITE, G. D. The effect of ammonium chloride on calcium metabolism in sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 27, n. 1, p. 201-209, 1972.

BUSHMAN, D. H.; EMBRY, L. B.; EMERICK, R. J. Efficiency of various chlorides and calcium carbonate in the prevention of urinary calculi. *J. Anim. Sci.* v. 26, p. 1199, 1967.

BUSHMAN, D. H.; EMERICK, R. J.; EMBRY, L. B. Incidence of urinary calculi in sheep affected by various dietary phosphates. **Journal of Animal Science**, v. 24, n. 3, p. 671-675, 1965.

BYERS, S. R.; KRAMER, J. W. Normal hematology of sheep and goats. **Schalm's Veterinary Hematology**. Weiss, DJ and Wardrop, KJ. 6th ed. Wiley Blackwell, Iowa, USA, p. 836-842, 2010.

CARDOSO JÚNIOR, F. C. et al. Urolitíase obstrutiva em ovinos: Revisão. **PUBVET**, v. 11, p. 0947-1073, 2017.

CARVALHO, M. B. Semiologia do Sistema Urinário. In: FEITOSA, F.L. *Semiologia Veterinária*. São Paulo: Roca. cap. 9, p.389-409, 2008.

CASTAÑEDA, R. D. et al. Substituição de uréia por cloreto de amônio em dietas de bovinos: digestibilidade, síntese de proteína microbiana, parâmetros ruminais e sanguíneos. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 31, n. 3, p. 271-277, 2009.

CELLI, P. et al. Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: new opportunities for sustainable animal production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 234, p. 88-100, 2017.

CHENG, C. et al. Effect of oregano essential oil and benzoic acid supplementation to a low-protein diet on meat quality, fatty acid composition, and lipid stability of longissimus thoracis muscle in pigs. **Lipids in health and disease**, n. 16, v. 1, p. 1-9, 2017.

CHURCH, D.C. **Digestive physiology and nutrition of ruminants**. 2.ed. Oregon, O & 8 Books, Inc., 1979. v.2, p.348-55.

CLAFFEY, N. A. et al. Effect of forage to concentrate ratio and duration of feeding on growth and feed conversion efficiency of male lambs. *Translational Animal Science*, v. 2, n. 4, p. 419-427, 2018.

CORNELIUS, C. E.; MOULTON, J. E.; MCGOWAN, B. (1959) - **American Journal of Veterinary Research**. 20: 863.

DEL CLARO, G. R. et al. Balanço cátion-aniônico da dieta no metabolismo de cálcio em ovinos. **Ciência Rural**, 36(1), 222-228, 2006. <https://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782006000100034>

DEL OLMO, A.; CALZADA, J.; NUÑEZ, M. Benzoic acid and its derivatives as naturally occurring compounds in foods and as additives: Uses, exposure, and controversy. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 14, p. 3084-3103, 2017.

DIAO, H., et al. Effects of benzoic acid and thymol on growth performance and gut characteristics of weaned piglets. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 28, n. 6, p. 827, 2015.

DIAO, H. et al. Effects of benzoic acid (VevoVital®) on the performance and jejunal digestive physiology in young pigs. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2016.

ELAM, C. J.; HAM, W. E.; SCHNEIDER, B. H. Influence of dietary sodium chloride on incidence of urinary calculi in sheep. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*, v. 95, p. 769, 1957.

EVELETH, D. F.; MILLEN, T. W. High serum magnesium associated with urinary calculi in sheep. **Veterinary Medicine**, v.34, p.106-107, 1939.

EWOLDT, J. M. et al. Short-and long-term outcome and factors predicting survival after surgical tube cystostomy for treatment of obstructive urolithiasis in small ruminants. **Veterinary Surgery**, v. 35, n. 5, p. 417-422, 2006.

FERREIRA, D. O. et al. Efeito da suplementação de cloreto de amônio sobre os equilíbrios eletrolítico e ácido-básico e o pH urinário de ovinos confinados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34 p. 797-804, 2014.

FERREIRA, D. O. et al. Urinary fractional excretion of sodium, potassium and chloride in lambs supplemented with ammonium chloride to prevent urolithiasis. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, p. 870-874, 2018.

FLUSS, D.G. Urolithiasis in goats. *Vet. Rec.*, 108(26):568, 1981.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The future of food and agriculture – Trends and challenges**. p.21, Rome, Italy. 2017.

FREEMAN, S. R. et al. Influence of calcium (0.6 or 1.2%) and phosphorus (0.3 or 0.6%) content and ratio on the formation of urolithogenic compounds in the urine of Boer-cross goats fed high-concentrate diets. **Small Ruminant Research**, v. 93, n. 2-3, p. 94-102, 2010.

GOFF JP. Pathophysiology of calcium and phosphorus disorders. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**. 2000; v. 16, p. 319–337.

GOMIDE, C. A. et al. Influência da diferença cátion-aniônica da dieta sobre o balanço de cálcio, fósforo e magnésio em ovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, p. 363-369, 2004.

GUEDES JR, F. S. et al. Renal histology and immunohistochemistry after acute hemorrhage in rats under sevoflurane and ketoprofen effect. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 27 (1), p. 37-42, 2012.

GUGGENBUHL, P. et al. Effects of dietary supplementation with benzoic acid (VevoVital®) on the zootechnical performance, the gastrointestinal microflora and the ileal digestibility of the young pig. **Livestock Science**, v. 108, n.1-3, p. 218-221, 2007.

GUIMARÃES, J. A. et al. Estudo retrospectivo de 66 casos de urolitíase obstrutiva em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 824-830, 2012.

HENRIQUE, W. et al. Avaliação da silagem de grãos de milho úmido com diferentes volumosos para tourinhos em terminação: Desempenho e características de carcaça. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36 (1), p. 183-190, 2007.

HORST, R. L.; JORGENSEN, N. A. Effect of ammonium chloride on nitrogen and mineral balance in lactating and non-lactating goats. **Journal of Dairy Science**, v. 57, n. 6, p. 683–688, 1974.

HUMER, E. et al. Invited review: Practical feeding management recommendations to mitigate the risk of subacute ruminal acidosis in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 2, p. 872-888, 2018.

JAIN, N. C. Essential of Veterinary Hematology. Lea and Febiger. Philadelphia. p. 417, 1993.

JONES, M. L.; STREETER, R. N.; GOAD, C. L. Use of dietary cation anion difference for control of urolithiasis risk factors in goats. **American Journal of Veterinary Research**, v.70, n.1, p. 149-155, 2009.

JORGENSEN, N. A. Combating milk fever. **Journal of Dairy Science**. 57:933, 1974.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (Ed.). **Clinical biochemistry of domestic animals**. Academic press, 2008.

KERR, M. G. 2003. Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária. Bioquímica Clínica e Hematologia. 2ª ed. Roca, São Paulo. 436p.

KLUGE, H.; BROZ, J.; EDER, K. "Effects of dietary benzoic acid on urinary pH and nutrient digestibility in lactating sows". **Livestock Science**, v. 134, n. 1-3, p. 119–121, 2010.

KLUGE, H.; BROZ, J.; EDER, K. Effect of benzoic acid on growth performance, nutrient digestibility, nitrogen balance, gastrointestinal microflora and parameters of microbial metabolism in piglets. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 90, n. 7-8, p. 316-324, 2006.

KRAMER, J. W. Normal hematology of cattle, sheep and goats. **Schalm's veterinary hematology**, v. 5, p. 1075-1084, 2000.

KRYSL, L. J. et al. Influence of cottonseed meal supplementation on voluntary intake, ruminal and cecal fermentation, digesta kinetics and serum insulin and growth hormone in mature ewes fed prairie hay. **Journal of animal science**, v. 64, n. 4, p. 1178-1188, 1987.

LEOSCHKE, W. L.; ELVEHJEM, C. A. Prevention of urinary calculi formation in mink by alteration of urinary pH. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 85, n. 1, p. 42-44, 1954.

LORETTI, A. P. et al. Clinical and pathological study of an outbreak of obstructive urolithiasis in feedlot cattle in southern Brazil. **Pesq. Vet. Bras**, v.23 n.2 p. 61-64, 2003.

LOUVANDINI, H.; VITTI, D. M. S. S. Perda endógena de fósforo em ovinos com diferentes níveis do elemento na dieta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 01-91, 1994.

MACIEL, T. A. et al. Predictive elements of obstructive urolithiasis in sheep. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, n.1, 2019.

MACIEL, T. A. et al. Clinical and biochemical profile of obstructive urolithiasis in sheep. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, p. 1-15, 2017.

MAO, X. et al. Benzoic acid used as food and feed additives can regulate gut functions. **BioMed research international**, 2019.

MARQUES, L. T. et al. Produção leiteira, composição do leite e perfil bioquímico sanguíneo de vacas lactantes sob suplementação com sal aniônico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n.5, p.1088-1094, 2011.

MARTIN, A. K. Urinary aromatic excretion by fed and fasted sheep in relation to protein metabolism in the rumen. **British Journal of Nutrition**. v. 30, p. 251-267, 1973.

MAVANGIRA V.; CORNISH J. M.; ANGELOS J. A. Effect of ammonium chloride supplementation on urine pH and urinary fractional excretion of electrolytes in goats. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v. 237, p. 1299-1304, 2010.

MCINTOSH G.H. Urolithiasis in animals. **Aust. Vet. J.** 54: 267-271, 1978

MCINTYRE, L. H.; WESTON S. J. An investigation of the safety of oral calcium formate in dairy cows using clinical, biochemical and histopathological parameters. **N. Z. Vet. J.** v. 50, p. 195–198, 2002.

MEYER, D. J.; HARVEY, J. W. Veterinary Laboratory Medicine Interpretation & Diagnosis. USA: **Saunders. Feeding and Nutrition of Nonhuman Primate**. 2004.

MILLEN, D. D. et al. Ruminal acidosis. In **Rumenology**. Springer, Cham. p. 127-156, 2016.

MEMBRIVE, C. M. B. Anatomy and Physiology of the Rumen. In: **Rumenology**. Springer, Cham. p. 1-38, 2016.

MERTENS, D. R. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1463-1481, 1997.

MINERVINO, A. H. H. et al. Influência de diferentes dietas com alto teor de concentrados sobre parâmetros ruminais, bioquímicos e urinários de ovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 51, n.1, p. 30-36, 2014.

MYERS, L. L.; JACKSON, H. D.; PACKETT, L. V. Absorption of volatile fatty acids from the cecum of sheep. **Journal of animal science**, v. 26, n. 6, p. 1450-1458, 1967.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. Nutrient Requeriments of Sheep. 6.ed. Washington DC, USA: NAP, 1985. 99p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient requeriments of small ruminants. 1. ed. Washington, DC, USA: NAP, 2007. 362p.

NWAOKORIE, E. E. et al. Risk factors for calcium carbonate urolithiasis in goats. **J Am Vet Med Assoc**. v. 247, n. 3, p. 293–9, 2015.

OETZEL G. R. Management of dry cows for the prevention of milk fever and other mineral disorders. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**. v. 16, p. 369–386, 2000.

OETZEL, G. R. et al. Ammonium chloride and ammonium sulfate for prevention of parturient paresis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 12, p. 3302-3309, 1988.

OLIVEIRA, F. L. et al. Effects of sudden melon intake on ruminal parameters of non-adapted sheep. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 378-382, 2016.

OMAN, R. E. et al. Outcome and complications in goats treated by perineal urethrostomy for obstructive urolithiasis: 25 cases (2010-2017). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 33, n. 1, p. 292-296, 2019.

ORTOLANI, E. L. Diagnóstico de doenças nutricionais e metabólicas por meio de exame de urina em ruminantes. **Avaliação Metabólico-Nutricional de Vacas Leiteiras por meio de Fluídos Corporais**, p. 18-26, 2002.

PAGELLA, J. H. et al. Excretion of benzoic acid derivatives in urine of sheep given intraruminal infusions of 3-phenylpropionic and cyclohexanecarboxylic acids. **British Journal of Nutrition**, v. 77, n. 4, p. 577-592, 1997.

PARENTE, H. N. et al. Increasing levels of concentrate digestibility, performance and ingestive behavior in lambs. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 17, p. 186-194, 2016.

RADOSTITS, O. M. et al. **Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1737 p.

REECE, W. O. Função Renal nos Mamíferos. In: REECE, W. O. DUKES – Fisiologia dos animais domésticos. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 5, p. 68-96, 2006.

RESENDE-JÚNIOR, J.C. et al. Effect of the feeding pattern on rumen wall morphology of cows and sheep. **Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci.** v. 43, p. 526–536, 2006.

RIET-CORREA, F.; SIMÕES, S. V. D.; VASCONCELOS, J. S. Urolitíase em caprinos e ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 6, p. 319-322, 2008.

ROBBINS, J. D.; KUNICEL, H. O.; CROOKSHANK, H.R. Relationship of dietary mineral intake to urinary mineral excretion and the incidence of urinary calculi in lambs. **Journal of Animal Science**, 24(1):76-82, 1965.

SACCO, S. R.; LOPES, R. S. Urolitíase: estudo comparativo em bovinos Guzerá oriundos de propriedades com e sem o problema. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 206-212, 2011.

SANTAROSA, B. P. Avaliação clínica, laboratorial e anatomopatológica do sistema urinário de ovinos confinados com e sem suplementação de cloreto de amônio. **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Botucatu, 2015.

SANTAROSA, B. P. et al. Avaliação clínica, laboratorial e anatomopatológica do sistema urinário de ovinos confinados com ou sem suplementação de cloreto de amônio. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 01-12, 2016.

SCHRÖDER, B. et al. Calcium transport in bovine rumen epithelium as affected by luminal Ca concentrations and Ca sources. **Physiological reports**, v. 3, n. 11, p. e12615, 2015.

SILVA, A. E. F. et al. Urolitíase em caprinos: produção experimental e prevenção. In: **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, 18, Camburiú, SC, Anais ... p. 280, 1982.

SMITH, P. B. (Ed.) **Large Animal Internal Medicine**, 3rd ed. Mosby, Inc., St. Louis, MO, p.857, 2002.

SOUZA, B. C. et al. Determinação de valores de referência séricos para os eletrólitos magnésio, cloretos, cálcio e fósforo em ovinos das raças Dorper e Santa Inês. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 167-173, 2016.

STEWART, S. R.; EMERICK, R. J.; PRITCHARD, R. H. Effects of dietary ammonium chloride and variations in calcium to phosphorus ratio on silica urolithiasis in sheep. **Journal of animal science**, v. 69, n. 5, p. 2225-2229, 1991.

STRASINGER, S. K. Uroanálise e fluídos biológicos. 3.ed. São Paulo: Editora Premier, p. 233, 1996.

ULYATT, M. J. et al. Structure and function of the large intestine of ruminants. **Digestion and Metabolism in the Ruminant**, Proc. IV Int. Symp. Ruminant Physiol., Univ. New England Pub. p. 119-133, 1975.

UNDERSANDER, D.; MERTENS, D. R.; THEIX, N. **Forage Analysis**. Omaha: National Forage Testing Association, p. 132, 1992.

UNITED NATIONS. **World Population Prospects: Highlights**. Population Division, Dept. of Economic and Social Affairs, United Nations, New York, 2019.

VALENTE, T. N. P. et al. Aspects of acidosis in ruminants with a focus on nutrition: a review. **Journal of Agricultural Science**, v. 9, n. 3, p. 90, 2017.

VIDELA, R.; AMSTEL, S. V. Urolithiasis. **Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice**, v. 32, n. 3, p. 687-700, 2016.

WANG, L. M.; MANDELL, I. B.; BOHRER, B. M. Effects of feeding essential oils and benzoic acid to replace antibiotics on finishing beef cattle growth, carcass characteristics, and sensory attributes. **Applied Animal Science**, v. 36, n. 2, p. 145-156, 2020.

WEISS, W. P.; CONRAD, H. R.; PIERRE, R. R. S. A theoretically – based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. **Animal Feed Science and Technology**, v.39, p.95-110, 1992.

WILKENS, M. R. et al. In contrast to sheep, goats adapt to dietary calcium restriction by increasing intestinal absorption of calcium. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.** 163:396–406. 2012

WILLIAMS, R.T., In: Bernfeld, P. (Ed.), Biogenesis of Natural Compounds, 2nd ed. Pergamon Press, Oxford and New York, p. 599, 1967.

XU, L. et al. Morphological adaptation of sheep's rumen epithelium to high-grain diet entails alteration in the expression of genes involved in cell cycle regulation, cell proliferation and apoptosis. **Journal of animal science and biotechnology**, 9(1), p. 1-12, 2018.

ZHANG, C. et al. Performance, rumen fermentation, and gastrointestinal microflora of lambs fed pelleted or unpelleted total mixed ration. **Animal Feed Science and Technology**, v. 253, p. 22-31, 2019.