UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CLAITON ANDRÉ ZOTTI

**Uso de monensina e óleos funcionais de mamona e líquido da casca
de caju em dietas com elevada proporção de concentrado fornecidas
de forma abrupta para bovinos Nelore confinados**

,

Pirassununga
2014

CLAITON ANDRÉ ZOTTI

Uso de monensina e óleos funcionais de mamona e líquido da casca de caju em dietas com elevada proporção de concentrado fornecidas de forma abrupta para bovinos Nelore confinados

Versão corrigida

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

Área de concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leme

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues

Pirassununga
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

Z89u	<p>Zotti, Claiton André</p> <p>Uso de monensina e óleos funcionais de mamona e líquido da casca de caju em dietas com elevada proporção de concentrado fornecidas de forma abrupta para bovinos Nelore confinados /</p> <p>Claiton André Zotti. -- Pirassununga, 2014.</p> <p>86 f.</p> <p>Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Biossistemas.</p> <p>Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leme.</p> <p>1. Acidose ruminal 2. Aditivos alimentares 3. Metabolismo ruminal. I. Título.</p>
------	---

DEDICATÓRIA

Gostaria de dedicar este trabalho primeiro a Deus pela força e coragem que me guiaram ao longo desta jornada.

Ao Pedro e Carmen Zotti, que através do jeito simples e modesto nunca deixaram de expressar o mais complexo dos sentimentos, o amor de pai e mãe.

Aos meus irmãos Vinícius e Calandra, por todo amor e força durante esta trajetória.

À minha esposa, Maria Luisa pelo incentivo, apoio incondicional e por entender minha ausência em momentos importantes. Esta conquista é nossa!

Ao meu filho Francisco Nunes Zotti, o qual chega para encher de amor e luz as nossas vidas.

Ao meu tio, Mauri João Galeli pelo exemplo de pessoa e incentivo em todas as etapas de minha vida.

A todos o meu muito obrigado. Amo vocês!!!

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Roberto Leme pela confiança, incentivo, por todas as oportunidades concedidas e pelos valiosos ensinamentos.

Meu enorme agradecimento ao co-orientador, Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues, por todo apoio e sugestões deste a elaboração inicial deste projeto.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão da bolsa e auxílio à pesquisa. Sem dúvida, isto foi determinante para a qualidade do trabalho e qualificação profissional do bolsista.

À CAPES pela concessão inicial da bolsa de doutorado.

Ao Dr. Tim McAllister pela oportunidade concedida em trabalhar na sua equipe, pela gentileza e disponibilidade de supervisão durante o estágio no Lethbridge Research Centre.

Ao Prof. Dr. José Carlos Machado Nogueira Filho pela ajuda na contagem dos protozoários ruminais.

Aos Professores, Dr. Saulo e Dra. Luciane, pelos ensinamentos, conselhos, oportunidade e amizade.

Ao Prof. Dr. Ives Cláudio Bueno pela sua prestatividade e ricas sugestões ao trabalho.

À Profa. Roberta Brandi, pela amizade, conselhos e pelas valiosas oportunidades acadêmicas.

Ao amigo Dr. Rodrigo da Costa Gomes, pela acolhida em Pirassununga, pelas sugestões e auxílio no trabalho.

À amiga Dra. Carolina Tobias Marino pela amizade e também pelas sugestões e grande ajuda na fase preparatória.

Às amigas Ana Paula, Roberta, Madeline, Letícia e Priscila por não medirem esforços durante a execução deste trabalho e acima de tudo pela grande amizade construída.

Aos funcionários do setor de animais fistulados Ricardo, Dione, João e Zanchetin. Aos técnicos laboratoriais que me auxiliaram durante as análises bromatológicas.

Gostaria de agradecer especialmente à Dra. Lígia Mesquita do laboratório de genômica funcional, a qual com muita paciência e dedicação muito me ensinou durante as análises de PCR.

À Phibro Animal Health, Oligobasic e Agrocerec Multimix, pelo fornecimento dos aditivos alimentares utilizados neste estudo.

A todos os amigos e amigas, Marina, Rosana Corte, Gisele Gregghi, Daniel, Keny, Katieli, Delaila, Anderson, Fabi, Julio Dadalt pelo incentivo e momentos de descontração.

Às alunas de iniciação científica, Thaís, Kathleen e Joyce pela enorme ajuda durante a coleta e análise do comportamento animal.

Aos grandes amigos Amoracyr, Evandro, Gustavo, Gerson e Maicon Sbardella pelos momentos de descontração, apoio e companheirismo.

À estimada professora Margaret Bell pela sua grande habilidade em ensinar e motivar. "You get what you focus on!"

Ao amigo Túlio Jardim e às amigas Larissa, Krysty e Hee-Eun pela amizade construída durante a minha estadia no Canadá. Valeu demais, vocês foram maravilhosos comigo!

A todos que não foram citados, mas que participaram direta ou indiretamente deste estudo.

O meu muito obrigado!

EPÍGRAFE

Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer!

Mahatma Gandhi

RESUMO

ZOTTI, C. A. **Uso de monensina e óleos funcionais de mamona e líquido da casca de caju em dietas com elevada proporção de concentrado fornecidas de forma abrupta para bovinos Nelore confinados.** 2014. 86 f. Tese (doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2014.

Os aditivos alimentares monensina e óleos funcionais foram avaliados em dietas com elevada proporção de concentrado fornecida de forma abrupta a 12 novilhos canulados no rúmen. Foi utilizado delineamento de blocos ao acaso com medidas repetidas no tempo em dois períodos experimentais de 21 dias, com no mínimo seis semanas para readaptação dos animais à dieta volumosa (feno de Tifton). A dieta basal composta por 92,25% de concentrado (82,41% de milho quebrado, 6,78% de farelo de soja, 7,75% de feno de Tifton picado, 1,77% núcleo mineral e 1,29% ureia) foi fornecida no dia 1 de cada período experimental. Os animais receberam um dos aditivos alimentares, como seguem: sem aditivos (CTR), 400 mg de óleos funcionais de mamona e líquido da casca de caju/kg de MS ingerida (OF), 30 mg de monensina/kg de MS ingerida (M30) e 40 mg de monensina/kg de MS ingerida (M40). As variáveis ruminais e sanguíneas, o comportamento ingestivo e os microrganismos ruminais foram avaliados. Cada novilho foi considerado uma unidade experimental. Os dados foram analisados com o Proc Mixed, tendo o tempo após o fornecimento da alimentação como medidas repetidas. Animais alimentados com M40 reduziram a concentração total de ácidos graxos de cadeia curta ($P = 0,017$), a concentração de lactato ($P = 0,0012$) e osmolaridade ruminal ($P = 0,04$). Houve interação entre tratamento e dias após transição abrupta sobre a ingestão de matéria seca expressa em kg/dia ($P = 0,008$) e peso corporal ($P = 0,045$), bem como para o pH médio do rúmen ($P = 0,04$), a proporção molar de propionato ($P = 0,034$) e a proporção molar de valerato ($P = 0,031$). O tratamento M30 apresentou a menor relação acetato:propionato ($P = 0,03$). Os tratamentos não alteraram o comportamento ingestivo ($P \geq 0,05$) ou as atividades comportamentais ($P \geq 0,05$), bem como a expressão relativa de *F. Succinogenes* ($P = 0,465$), *S. bovis* ($P = 0,781$) e *M. elsdenii* ($P = 0,972$). O tratamento CTR apresentou maior propensão à ocorrência de desbalanço no sistema ácido-básico do sangue.

Porém, o volume globular sanguíneo, o pH e a osmolaridade do sangue não foram alteradas pelos tratamentos ($P \geq 0,05$). Os aditivos alimentares utilizados em dietas com elevada proporção de concentrado fornecidas de forma abrupta agiram sob formas distintas na redução da acidose subclínica. De forma geral, a inclusão de OF e M40 não resultou em melhoria expressiva no ambiente ruminal diante da situação desafiadora da dieta, especialmente na primeira semana, quando o tratamento M30 apresentou melhor capacidade de estabilizar a fermentação ruminal.

Palavras-chave: Acidose ruminal; aditivos alimentares; metabolismo ruminal

ABSTRACT

ZOTTI, C. A. **Monensin and a blend of castor oil and cashew nut shell liquid used in a high-concentrate diet abruptly fed to Nellore cattle.** 2014. 86 f. Phd. Thesis - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2014.

Monensin and functional oils were evaluated in high-concentrate diet abruptly fed to 12 ruminally cannulated steers. A randomized complete block design with repeated measures over time within two experimental periods of 21 days each was used, with at least six weeks for readaptation of steers to forage diet. In the high-concentrate basal diet (92.25% of concentrate) the follow treatments were added: no additives (CTR); 400 mg of castor oil and cashew nut shell liquid/kg of DMI (FO); 30 mg monensin/kg of DMI (M30) and 40 mg monensin/kg of DMI (M40). The ruminal variables, blood metabolites, feeding behaviour and microbial variable were determined. Each steer was analysed as an experimental unit. Data were analysed by Proc Mixed with time after feeding used as repeated measures. Treatment M40 showed lower ruminal total short chain fatty acids ($P = 0.017$), lactate concentration ($P = 0.0012$) and osmolality ($P = 0.04$). The dry matter intake expressed by kg/day ($P = 0.008$) and percentage of body weight ($P = 0.045$), as well as mean rumen pH ($P = 0.04$), propionate ($P = 0.034$) and valerate ($P = 0.031$) molar proportion had significative interaction between treatment and day. The treatment M30 showed lower acetate:propionate ratio ($P = 0.03$). Treatments did not change the feed behaviour ($P \geq 0.05$), behavioural activities ($P \geq 0.05$), and relative expression of *Fibrobacter succinogenes* ($P = 0.465$), *Streptococcus bovis* ($P = 0.781$) and *Megasphaera elsdenii* ($P = 0.972$). The blood packed volume cell, osmolality and pH were unaffected by treatments ($P \geq 0.05$), but high propensity to systemic acid-base imbalance were observed in CTR diet. Feed additives had different effects to reduce the subacute acidosis. The use of FO and M40 did not change most of the rumen fermentation variables, especially in the first week after abrupt transition, where M30 provided higher protection against acidosis.

Keywords: feed additives, ruminal acidosis, ruminal metabolism

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Proporção de propionato ruminal de novilhos Nelore recebendo dietas com elevada proporção de concentrado fornecidas de forma abrupta com o uso de diferentes aditivos alimentares.....	48
Figura 2. Ingestão de matéria seca em kg/dia (A) e em porcentagem do peso corporal (B) de novilhos Nelore recebendo dieta com elevada proporção de concentrado fornecida de forma abrupta com o uso de diferentes aditivos alimentares.....	51
Figura 3. Proporção molar de propionato (A) e valerato (B) ruminal de novilhos Nelore recebendo dieta com elevada proporção de concentrado fornecida de forma abrupta com o uso de diferentes aditivos alimentares.....	53
Figura 4. Concentração total de AGCC (A), proporção molar de acetato (B), relação acetato:propionato (C) e proporção molar de butirato (D) ruminal ao longo dos dias de coleta.....	54
Figura 5. pH ruminal médio de novilhos Nelore recebendo dietas com elevada proporção de concentrado fornecidas de forma abrupta com diferentes aditivos alimentares.....	56
Figura 6. Comportamento ingestivo de novilhos Nelore recebendo dieta com elevada proporção de concentrado fornecida de forma abrupta com diferentes aditivos alimentares.....	59
Figura 7. Mudanças na quantidade de <i>F. Succinogenes</i> (A), <i>S. bovis</i> (B) e <i>M. elsdenii</i> (C) de novilhos Nelore recebendo dieta com elevada proporção de concentrado fornecida de forma abrupta com diferentes aditivos alimentares..	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química dos ingredientes.....	36
Tabela 2. Proporção de ingredientes e composição química da dieta basal.....	36
Tabela 3. Sequências de <i>primers</i> utilizados para quantificação relativa de bactérias por reação da cadeia de polimerase em tempo real.....	42
Tabela 4. Ingestão de matéria seca e características ruminais de novilhos Nelore antes da transição abrupta de forragem para dieta com elevada proporção de concentrado..	44
Tabela 5. Características do fluido ruminal de novilhos Nelore durante as primeiras horas (6 – 60 horas) após o fornecimento abrupto da dieta com elevada proporção de concentrado.....	47
Tabela 6. Ingestão de matéria seca e características ruminais durante todo o período experimental de novilhos recebendo dieta com elevada proporção de concentrado de forma abrupta.	50
Tabela 7. pH ruminal de novilhos Nelore recebendo dieta com elevada proporção de concentrado de forma abrupta com o uso de diferentes aditivos alimentares.	55
Tabela 8. Comportamento ingestivo de novilhos Nelore recebendo dieta com elevada proporção de concentrado fornecida de forma abrupta com diferentes aditivos alimentares.....	57
Tabela 9. Atividades comportamentais (porcentagem diária) de novilhos Nelore recebendo dieta com elevada proporção de concentrado fornecida de forma abrupta com o uso de diferentes aditivos alimentares.....	58
Tabela 10. Variáveis sanguíneas de novilhos Nelore recebendo dieta com elevada proporção de concentrado fornecida de forma abrupta com o uso de diferentes aditivos alimentares.....	61
Tabela 11. Expressão relativa de <i>F. Succinogenes</i> , <i>S. bovis</i> e <i>M. elsdenii</i> em relação ao tratamento controle e contagem de protozoários ciliados ($\times 10^4$ / mL) de novilhos Nelore recebendo dieta com elevada proporção de concentrado fornecida de forma abrupta com o uso de diferentes aditivos alimentares.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

AGCC	ácidos graxos de cadeia curta
EB	excesso de bases
HCO_3^-	bicarbonato
IMS	ingestão de matéria seca
IPC	ingestão de matéria seca em porcentagem do peso corporal
pCO_2	pressão parcial de gás carbônico
pH	potencial hidrogeniônico
pO_2	pressão parcial de oxigênio
A:P	acetato:propionato
sO_2	saturação de oxigênio
tCO_2	dióxido de carbono total
VGS	volume globular sanguíneo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Acidose	19
2.1.1 Medida do pH ruminal	19
2.1.2 Produção de ácidos graxos de cadeia curta no rúmen	21
2.1.3 Produção de lactato	22
2.1.4 Osmolaridade	23
2.1.5 População microbiana	24
2.1.6 Comportamento alimentar	26
2.1.7 Características sanguíneas	27
2.2 Uso de aditivos alimentares	28
2.2.1 Monensina sódica	29
2.2.2 Óleos funcionais	31
3. OBJETIVOS	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Animais, instalações e dieta	35
4.2 Período experimental	37
4.3 Ingestão de matéria seca e comportamento ingestivo	37
4.4 Análises bromatológicas	38
4.5 Medida do pH ruminal	38
4.6 Análise do fluido ruminal	39
4.7 Contagem de protozoários	40
4.8 Quantificação relativa de bactérias ruminais	41
4.9 Análises sanguíneas	42
4.10 Análise estatística	43
5.1 Características ruminais – Avaliação das primeiras horas após transição abrupta	44
5.2 Ingestão de matéria seca	48
5.3 Características ruminais – Avaliação do período experimental	52
5.4 Comportamento animal	56
5.5 Metabólitos sanguíneos	59

5.6 Microrganismos ruminais.....	60
6. DISCUSSÃO	64
6.1 Ingestão de matéria seca	64
6.2 Características ruminais – Horas iniciais após transição abrupta	65
6.3 Características ruminais – Avaliação do período experimental	66
6.4 pH do rúmen.....	69
6.5 Comportamento animal	71
6.6 Metabólitos sanguíneos.....	73
6.7 Microrganismos ruminais.....	74
7. CONCLUSÕES	77
8. REFERÊNCIAS.....	78

1. INTRODUÇÃO

Em 2050, a população mundial será de 9,1 bilhões, sendo 34% maior que a população atual. As estimativas ainda revelam que, para garantir condições alimentares suficientes à população, as cadeias produtivas que integram o setor agropecuário precisarão crescer 70%. Nesse âmbito, a produção de cereais precisará aumentar 42,85%, já a projeção para produção anual de carne precisa atingir o patamar de 470 milhões de toneladas, cerca de 235% acima da produção atual (FAO, 2009).

O Brasil é visto como o país com o maior potencial de contribuição para a produção mundial de alimentos por apresentar disponibilidade de terras e condições climáticas favoráveis. Com rebanho estimado em 207,17 milhões (IBGE, 2010) de cabeças de bovinos, o Brasil apresentou a maior taxa de crescimento no número de cabeças (4 %/ano) nos últimos 20 anos, dentre os 10 principais países exportadores de carne bovina (MILLEN et al., 2011). Em termos de exportações de carne bovina, o Brasil ocupa a segunda posição no *ranking* mundial, atingindo a marca de 1.940 milhões de toneladas, com previsão de aumento na ordem de 8% em 2014 (USDA, 2014).

Nas últimas duas décadas a criação de bovinos em confinamento aumentou cerca de quatro vezes, atingindo três milhões de cabeças confinadas em 2010 (ANUALPEC, 2011). Com a terminação precoce e melhor uniformidade das carcaças, o confinamento torna-se um sistema com alta capacidade de atender parte da crescente demanda por proteína animal. A posição de destaque ocupada pelo Brasil em termos de produção e exportação deve-se à maior intensificação dos sistemas de criação, principalmente o crescimento do número de animais confinados.

O confinamento de bovinos permite aumentar o ganho de peso dos animais em crescimento, atingindo o ponto de abate mais rapidamente em relação ao sistema de terminação em pastagem. A terminação precoce dos animais em confinamento pode ser atingida pelo fornecimento de dietas com alta proporção de carboidratos prontamente fermentescíveis, de forma a atender às exigências do maior ganho de peso. No entanto, para que esses objetivos sejam alcançados é necessário um manejo e um programa nutricional adequados, principalmente nos primeiros dias de confinamento, onde a predisposição dos animais à ocorrência de distúrbios metabólicos

oriundos do consumo de dietas de alta proporção de concentrado é mais evidente, e pode comprometer o desempenho subsequente.

Estratégias nutricionais de adaptação às dietas de alto concentrado são discutidas por vários autores canadenses e norte-americanos (SCHWARTZKOPF-GENSWEIN et al., 2003; BEVANS et al., 2005; BROWN; PONCE; PULIKANTI, 2006) que, para sistema de confinamento com duração média de 150 dias, recomendam períodos de adaptação mínimos de 14 dias, de forma a garantir a saúde ruminal.

No Brasil, onde o confinamento caracteriza-se por um período menor em relação ao norte-americano, em média 84 dias (MILLEN et al., 2009), a adaptação de duas ou três semanas representará 20-30% do período total de confinamento. Assim, ações que resultem em reduzir ou eliminar o número de dias necessários à adaptação, podem contribuir positivamente para os índices produtivos. Uma das alternativas para tal é a inclusão de aditivos alimentares (BURRIN; BRITTON, 1986; WALKER et al., 2010), pela capacidade destes estabilizarem a fermentação ruminal (RUSSELL; STROBEL, 1989), reduzindo a propensão dos animais à acidose ruminal.

Um dos principais problemas metabólicos que afeta animais em confinamento que recebem dietas com alta concentração de amido é a acidose ruminal (NAGARAJA; TITGEMEYER, 2007). O uso de aditivos alimentares que minimizem a formação de potenciais precursores da acidose láctica é uma ferramenta nutricional importante para garantir condições de saúde ruminal e desempenho, o que pode viabilizar o fornecimento abrupto de dietas de alto concentrado no início do confinamento.

Durante a transição das dietas, a inclusão de aditivos tem sido estudada como forma de manter a fermentação ruminal sem gerar grandes quantidades de metabólitos, como o ácido láctico, que pode acumular no ambiente ruminal e potencializar a ocorrência de acidose (GOAD; GOAD; NAGARAJA, 1998; COE et al., 1999).

Aditivos alimentares são utilizados como alternativa para aumentar a eficiência de utilização das dietas consumidas pelos ruminantes, cuja ação otimiza a conversão dos nutrientes consumidos em produtos comestíveis e reduz o impacto ambiental dos sistemas produtivos (ARRIGONI et al., 2011). A inclusão de aditivos alimentares em dietas de alto concentrado repercute em benefícios econômicos e ambientais (menor equivalente carbono por quilo de ganho), fundamentais para sustentabilidade do

sistema produtivo, tão almejada e exigida pelos mercados consumidores nos dias atuais (COOPRIDER et al., 2011).

O uso do ionóforo monensina como aditivo na prevenção à acidose foi comprovado por inúmeros trabalhos (BURRIN; BRITTON, 1986; BURRIN; STOCK; BRITTON, 1988). Os principais efeitos são direcionados à menor variação na ingestão de matéria seca, inibição da produção de lactato; manutenção do pH ruminal e aumento da eficiência do metabolismo energético.

Óleos funcionais, especificamente os derivados do óleo de mamona e líquido da casca de caju, foram pesquisados em condições de confinamento (CONEGLIAN, 2009), como aditivos fitoterápicos com potencial de serem utilizados de forma alternativa aos aditivos ionóforos (lasalocida, salinomycin e monensina sódica) banidos a partir de 2006 na União Europeia (LOYOLA; PAILE, 2006). Esses compostos alternativos apresentam ação bactericida e produtos da fermentação semelhantes àqueles observados com o uso de ionóforos. Porém, ainda carecem de maiores investigações científicas até o momento a respeito do potencial de emprego dos óleos funcionais na nutrição de ruminantes.

Este estudo foi desenvolvido a partir da hipótese de que doses maiores de monensina, bem como o uso de óleos funcionais diminuiriam a susceptibilidade dos animais aos distúrbios metabólicos, durante as primeiras semanas de fornecimento de uma dieta com elevada proporção de concentrado fornecida de forma abrupta logo no primeiro dia de entrada dos animais em confinamento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Acidose

Segundo Owens et al. (1998), o tipo de grão, processamento, frequência de alimentação são aspectos decisivos para a ocorrência de acidose ruminal. No Brasil, as inclusões de grãos praticadas nas dietas de confinamento predominantemente ocorrem entre 51 e 65% da MS. Quanto aos níveis de concentrado utilizados na fase de terminação, inclusões entre 70 e 90% da MS da dieta são as mais empregadas (MILLEN et al., 2009).

Como apenas carboidratos com alta taxa de fermentação têm concentração energética e taxa de passagem suficientes para atender altos níveis de ganho, programas intensivos de alimentação são naturalmente ligados a um aumento no risco de acidose ruminal.

A acidose ruminal tem sido foco de intensas pesquisas desde que o fornecimento de dietas com elevada proporção de concentrado tornou-se corriqueiro em confinamentos. Um levantamento de dados realizado com nutricionistas brasileiros também ressalta a preocupação com a incidência crescente de acidose, onde 36% dos entrevistados relataram ser esta uma das principais desordens enfrentadas em condições de confinamento (MILLEN et al., 2009).

O consumo excessivo de carboidratos prontamente fermentescíveis causa acúmulo de ácidos orgânicos (ácidos graxos de cadeia curta e lactato) no rúmen, com subsequente queda do pH. Com isso, cria-se um desequilíbrio entre a produção e utilização microbiana de ácidos orgânicos, bem como sua absorção pela parede ruminal (NAGARAJA; TITGEMEYER, 2007).

2.1.1 Medida do pH ruminal

A concentração de prótons no fluido ruminal determina o pH do rúmen, que depende de um equilíbrio entre o fornecimento, que se dá a partir da fermentação dos alimentos, e a eliminação, que ocorre com o tamponamento da saliva, absorção pela parede ruminal e passagem para o trato gastrointestinal posterior (ALLEN, 1997).

A medida do pH é usada como indicador direto do perfil fermentativo e da predisposição dos animais aos distúrbios metabólicos. Este parâmetro não é apenas uma medida físico-química com relevância para a fermentação no rúmen, mas é também um critério central para diagnóstico e classificação da acidose ruminal como uma doença que afeta mais órgãos do que apenas o rúmen (ASCHENBACH et al., 2011). Sendo assim, a classificação teórica da acidose com base nas faixas de pH apresentada por Owens et al. (1998), tem sido adotada na maioria dos estudos envolvendo distúrbios metabólicos.

O grau de acidez ruminal é dependente do total de ácidos orgânicos acumulados no rúmen. Assim, baseado no pH ruminal e na evidência ou não de sinais clínicos, a acidose é classificada como subclínica ou clínica. Conforme Owens et al. (1998), pH 5,6 é considerado o limite abaixo do qual se desencadeia a acidose subclínica, pela proliferação de bactérias produtoras de lactato e início das respostas inflamatórias do epitélio ruminal. Para acidose clínica, o pH menor que 5,2 é considerado como limite crítico, onde há comprometimento do transporte de ácidos orgânicos e danos à parede do epitélio.

Em grande parte dos confinamentos, a maioria das ocorrências de acidose oriundas das características da dieta e manejo alimentar é subclínica. Nestes casos, o pH sofre quedas importantes diariamente (pH < 5,6 por > 3 horas/dia), aliado a grandes variações na ingestão diária e ocorrência de diarreias (NOCEK, 1997; SCHWARTZKOPF-GENSWEIN et al., 2004).

A razão para o pH cair abaixo de 5,6 durante acidose subclínica é o acúmulo de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). O ácido láctico também é produzido, mas não acumulado, pois as bactérias que fermentam lactato ainda estão ativas e rapidamente convertem-no em AGCC (GOAD; GOAD; NAGARAJA, 1998).

Muitos fatores podem contribuir para a acidose ruminal, sendo o mais recorrente o manejo alimentar aliado a erros na formulação, mistura, frequência de distribuição da dieta e composição dos ingredientes fornecidos. Casos como estes podem potencializar esse distúrbio, aumentando a chance da ocorrência de acidose na forma aguda.

Nocek (1997) descreveu que, sob essas condições, o pH ruminal pode cair abaixo de 5,0, acompanhado de altas concentrações de ácido láctico, aumento dos AGCC e

queda significativa do número total de protozoários. Nessa perspectiva, as funções fisiológicas são seriamente comprometidas, sendo que o fluxo sanguíneo do trato gastrointestinal e a absorção de ácidos orgânicos do rúmen são reduzidos. Assim, a exposição aos ácidos tornará as papilas ruminais mais espessas e comprimidas, diminuindo o poder de absorção pela presença de queratina (STEELE et al., 2011).

Além do acúmulo de AGCC no rúmen, há também acúmulo de glicose durante a acidose aguda. A presença de glicose no líquido ruminal pode favorecer o crescimento de *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus sp.*, os quais promovem a conversão de glicose/piruvato em ácido láctico, o que afeta o pH ruminal e reduz a adesão dos microrganismos celulolíticos, comprometendo a digestão da fibra em detergente neutro (SANTOS, 2011).

Nos últimos anos, o uso de sensores ruminais tem contribuído para os estudos de acidose ruminal, fato que implicou no aumento da precisão dos dados quanto ao grau de acidez encontrada neste órgão. Cooper et al. (1999) e Bevans et al. (2005) utilizaram a telemetria, por meio de *dataloggers* inseridos no rúmen com capacidade de registro do pH como forma de contabilizarem o comportamento dessa medida ao longo do tempo e, com isso, conhecer a severidade da acidose ruminal.

Bovinos alimentados com dietas com elevada proporção de concentrado apresentam grandes variações diárias de pH (SCHWARTZKOPF-GENSWEIN et al., 2004). Na avaliação do pH após alimentação, uma resposta importante é considerar o período de tempo em que o pH permanece abaixo de 5,6 e não apenas a média diária. Alguns estudos (BEVANS et al., 2005; GOZHO et al., 2005) obtiveram, por meio de sensores ruminais, o tempo em que o pH permaneceu abaixo de 5,6 e 5,8 em novilhos induzidos à acidose, indicando a duração da acidose subclínica. Com o uso desta metodologia, tem sido possível caracterizar as flutuações de pH pelos produtos da fermentação e população microbiana de forma mais clara do que apenas amostrando o pH de forma espaçada dentro de algumas coletas diárias.

2.1.2 Produção de ácidos graxos de cadeia curta no rúmen

A acidose é associada a mudanças súbitas na microbiota ruminal que apresentam diferentes afinidades por substratos e alteram o padrão de fermentação e o perfil de

AGCC gerados. Quantificar a produção de ácidos no rúmen tem grande importância na predição do fornecimento de nutrientes, bem como conhecer o potencial de depressão do pH (ASCHENBACH et al., 2011).

Como visto, o acréscimo nos carboidratos fermentescíveis da dieta induz a um aumento inicial na taxa de crescimento da maioria das bactérias ruminais. Isso se deve à maior disponibilidade de substratos para degradação e menor competição entre elas (NOCEK, 1997). À medida que a fermentação e a concentração de produtos da fermentação, tais como acetato, propionato e butirato, aumenta a máxima capacidade de absorção das papilas é alcançada e a concentração de AGCC no rúmen aumenta.

Animais recebendo dietas com elevada proporção de concentrado apresentam maior concentração de AGCC, o que é um resultado nutricionalmente desejável. Por outro lado, a maior inclusão de ingredientes concentrados na dieta, diminui o tempo de ingestão e ruminação, reduzindo a capacidade de neutralização dos ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação (PLAIZIER et al., 2008).

Conforme observado por Goad, Goad e Nagaraja (1998), o total de AGCC foi maior nos animais recebendo dietas com elevada proporção de concentrado, com queda na proporção de acetato e aumento na proporção de propionato ao longo das 60 horas de avaliação. Diferentes protocolos de adaptação (gradual ou rápida) à dieta com elevada proporção de concentrado (90%) não afetaram a concentração ruminal de acetato, propionato ou butirato, assim como a relação acetato:propionato, determinada 0, 8 e 18 horas após a alimentação (BEVANS et al., 2005).

2.1.3 Produção de lactato

De acordo com Owens et al. (1998), as bactérias do rúmen podem ser classificadas como produtoras ou consumidoras de lactato, sendo que o balanço entre os dois grupos determinará o acúmulo ou não deste metabólito. A sensibilidade ao baixo pH é maior entre as consumidoras, o que aumenta as chances de acúmulo de lactato nessas condições, onde as produtoras, mais tolerantes, prevalecem.

O metabolismo do lactato tem grandes implicações na acidose aguda, sua absorção é mais lenta que AGCC e há um aumento desproporcional do D-lactato, o qual passa a representar mais da metade do total de ácido láctico no líquido ruminal. A localização

das enzimas que convertem o L-lactato (Lactato desidrogenase, localizada no citoplasma) e o D-lactato (D-2-hidroxi ácido desidrogenase, localizada nas mitocôndrias) é determinante no acúmulo de lactato não metabolizado, visto que D-lactato terá que se translocar para a mitocôndria para ser convertido a piruvato (SANTOS, 2011).

Sob condições normais, o ácido láctico é metabolizado por utilizadores de lactato (*Megasphaera elsdenii* e *Selenomonas ruminantium* spp *lactilytica*). *S. ruminantium* é sensível ao baixo pH do rúmen e, apesar de utilizar lactato, seu nicho primário é a utilização de açúcares (sacarose). Por outro lado, a *M. elsdenii* apresenta maior tolerância ao baixo pH, e chega a ser responsável pela metabolização de 60 a 80% do lactato produzido, onde sua alta afinidade a torna uma das bactérias chave no controle do metabolismo do ácido láctico (COUNOTTE; PRINS; JANSSEN, 1981; RUSSEL, 2002).

Animais submetidos à rápida adaptação à dieta com elevada proporção de concentrado sem receber inóculo com cepas de *M. elsdenii* precisaram de um maior tempo (4 dias) em relação aos animais inoculados para apresentar uma contagem satisfatória à degradação dos substratos (KLIEVE et al., 2003).. Porém, decorridos 13 dias, a colonização de *M.elsdenii* foi semelhante entre os tratamentos Estes resultados demonstram que, mesmo sem o fornecimento oral, as cepas de *M. elsdenii* apresentam alta capacidade de colonização e vantagem competitiva no ambiente ruminal caracterizado por baixo pH e com a presença de lactato (MILLER; VAN BIBBER; DROUILLARD, 2012).

Nesse sentido, o conhecimento do metabolismo e controle das atividades de diferentes populações microbianas parece ser preponderante na tentativa de regular os processos envolvidos na acidose.

2.1.4 Osmolaridade

A ocorrência de acidose também aumenta a osmolaridade ruminal, pois a quantidade de solutos (AGCC, minerais, lactato e glicose) presentes é maior em relação aos solventes no fluido ruminal. Assim, concentrações normais de 240 a 265 mOsm/L, com dietas à base de forragem podem aumentar para níveis entre 280 a 300 mOsm/L, em dietas à base de concentrado (OWENS et al., 1998).

Quando a osmolaridade ruminal é maior que a do sangue, a água do sangue é rapidamente transferida através da parede ruminal para o interior do rúmen. A entrada rápida neutraliza a pressão osmótica, porém pode provocar inchaço e romper as papilas ruminais pela remoção interna das camadas da superfície, comprometendo a capacidade de absorção (KHAFIPOUR; KRAUSE; PLAIZIER, 2009).

Com a migração da água do sangue para o rúmen, ocorre um aumento da osmolaridade do sangue, pela adição de solutos oriundos do rúmen e aumento de sua proporção em relação ao solvente (água) presente na circulação. Como consequência, o animal atinge um estado de desidratação, com aumento dos eritrócitos sanguíneos (OWENS et al., 1998).

A acidose ruminal é caracterizada como um distúrbio envolvendo alguns fatores com múltiplas inter-relações, sendo que a osmolaridade desempenha importante papel principalmente na regulação da ingestão (GALYEAN; ENG, 1998). A compreensão das inter-relações existentes entre a ingestão de alimentos, população microbiana e tipo de dieta exige o conhecimento do grau de mudança na fermentação ruminal e população microbiana que atuam durante o fornecimento de dietas com elevada proporção de concentrado.

Calsamiglia et al. (2012), em recente discussão sobre quais os principais responsáveis pela ocorrência de acidose, concluíram que esse distúrbio não é apenas uma patologia pH dependente, mas um distúrbio que resulta em mudanças na população microbiana, ligada ao tipo de dieta fornecida.

2.1.5 População microbiana

O aumento na disponibilidade de carboidratos fermentescíveis leva ao aumento da glicose ruminal (GALYEAN; RIVERA, 2003) que, quando em excesso, estimula o crescimento de microrganismos produtores de lactato (principalmente *Streptococcus bovis*). Além disso, essa condição promove o aumento da taxa de fermentação e dos produtos finais da fermentação, o que diminui o pH do rúmen e aumenta consideravelmente a osmolaridade do conteúdo ruminal (OWENS et al., 1998).

O baixo pH que ocorre no quadro de acidose clínica tem, como consequência, o acúmulo de ácido lático, que tem sua produção aumentada em função da maior

proliferação de microrganismos que fermentam glicose a lactato. O balanço entre os microrganismos que produzem e aqueles que metabolizam lactato garante que a concentração de ácido láctico dentro do rúmen não exceda 5 mmol/L, considerado limite para predisposição à acidose aguda (OWENS et al., 1998).

Entre os microrganismos ruminais, apenas as bactérias e os protozoários ciliados parecem ser os principais participantes no aumento da fermentação associada ao fornecimento de grãos, uma vez que, apesar de apresentarem atividade de enzimas amilases, os fungos estão presentes em número reduzido quando dietas com elevada proporção de concentrado são fornecidas (NAGARAJA; TITGEMEYER, 2007).

Streptococcus bovis é classificado como um microrganismo anaeróbio facultativo, encontrado não apenas no rúmen como também no ceco e cólon dos bovinos. A contagem em animais alimentados com forragem não é alta (10^4 a 10^7 /g de conteúdo ruminal), mas em dietas com carboidratos prontamente fermentescíveis pode alcançar valores acima de 10^{11} /g de conteúdo ruminal. Essa característica de rápida taxa de crescimento (duplica sua população em 12 minutos), aliada à rápida degradação do amido, torna o *S. bovis* a principal cepa causadora de acidose ruminal (McALLISTER et al., 1990).

De acordo com Fernando et al. (2010), o fornecimento de dietas com elevada proporção de concentrado (60 e 80%) durante adaptação ao confinamento aumentou as populações de *Megasphaera elsdenii*, *Streptococcus bovis* e *Selenomonas ruminantium*. Por outro lado, as populações de *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Fibrobacter succinogenes* foram 40 e 20 vezes menores, respectivamente, quando comparadas àquelas encontradas em animais recebendo dieta com alta forragem.

Conforme discutido por Nagaraja e Titgemeyer (2007), em condições de acidose, de modo geral, são observadas alterações na população de bactérias fermentadoras de açúcares solúveis e amido, assim como nas bactérias fermentadoras de ácido láctico. A queda das populações de bactérias fibrolíticas deve-se à diminuição no pH ruminal pela maior disponibilidade de substratos fermentescíveis. O aumento de *Megasphaera elsdenii* é descrito como um mecanismo de manter o pH ruminal, utilizando o ácido láctico produzido intensivamente dentro do rúmen como substrato (FERNANDO et al., 2010).

Os protozoários ciliados são mais sensíveis do que as bactérias às flutuações e reduções do pH ruminal, onde a queda no número destes pode ser um indicativo de acidose (GOAD; GOAD; NAGARAJA, 1998).

Segundo Nagaraja et al. (1986), os protozoários ciliados têm um papel significativo no metabolismo ruminal do amido e do ácido láctico, sendo descrita uma relação inversa entre protozoários ciliados e a concentração de ácido láctico no rúmen. Isso se deve ao uso dos açúcares e amido como substratos pelos protozoários, impedindo que esses produtos sejam utilizados na fermentação bacteriana (NEWBOLD; CHAMBERLAIN; WILLIAMS, 1986). Alguns gêneros de protozoários ciliados apresentam maior resistência ao baixo pH, como o gênero *Entodinium*, predominante em animais alimentados com dietas com altas proporções de concentrado (HRISTOV et al., 2001).

Owens et al. (1998) retrataram que, apesar de os protozoários participarem ativamente retardando a fermentação de grandes quantidades de amido pelas bactérias, em situações de altas concentrações de ácido no rúmen, os protozoários sofrem lise e liberam grandes quantidades de amilase, o que acelera a produção de glicose e pode aumentar a probabilidade de acidose.

2.1.6 Comportamento alimentar

Conforme discutido anteriormente, os efeitos do fornecimento de dietas acidogênicas são mais pronunciados com o aumento da proporção de concentrado, bem como da taxa e extensão da degradabilidade dos ingredientes. Assim, dietas com menor proporção de forragem e menor tamanho de partículas têm como característica maior densidade, o que permite rápida taxa de ingestão e, conseqüentemente, maiores quantidades ingeridas por refeições, com menor insalivação do alimento (BEAUCHEMIN et al., 2008).

Medidas do comportamento alimentar, especialmente a quantidade ingerida por refeição e sua distribuição ao longo do dia podem refletir o tempo de sincronização entre a produção e eliminação de ácidos, determinantes da susceptibilidade dos animais à acidose. Portanto, a taxa de ingestão é uma medida importante, com grande capacidade de influenciar na acidose. De acordo com González et al. (2012), quanto

maior a taxa de ingestão, menor quantidade de saliva por unidade de alimento é secretada, diminuindo a capacidade de tamponamento ruminal.

Faleiro et al. (2011) observaram que novilhas recebendo dieta com maior proporção de concentrado apresentaram menor tempo ruminando por unidade de MS ingerida, o que refletiu em mudanças no perfil de fermentação e menor pH ruminal (5,46) em comparação à dieta com maior proporção de forragem (6,09).

No sentido de minimizar as consequências de um menor tempo de ruminação em dietas com elevada proporção de concentrado, a adição de aditivos alimentares como a monensina tem repercutido em aumento do número de refeições e diminuição na taxa de ingestão de matéria seca (IMS) em porcentagem por hora. Isso, de certa forma, evita quedas bruscas de pH e garante padrões de fermentação mais estáveis ao longo do dia (ERICKSON et al., 2003).

Bingham et al. (2009) utilizaram câmeras de vídeo para avaliar o comportamento ingestivo de novilhas com diferentes valores de consumo alimentar residual (CAR). Para esta avaliação foi considerado o tempo em que os animais permaneceram com a cabeça abaixada sobre o comedouro. Os animais menos eficientes (CAR positivo) ingeriram maiores quantidades de MS, com taxa de ingestão ($99,6$ vs $62,8 \pm 3,3$ g/min) e frequência diária ($119,1$ vs $90,5 \pm 3,9$ eventos/dia) superiores aos classificados como de baixo CAR e, portanto, mais eficientes.

A avaliação do comportamento alimentar de bovinos pode ser uma ferramenta importante quando avaliada em conjunto com o pH ruminal, facilitando a compreensão da acidose.

2.1.7 Características sanguíneas

Aproximadamente metade do bicarbonato que adentra o rúmen, no intuito de exercer função tamponante, é proveniente da saliva. A outra metade chega ao rúmen por meio da corrente sanguínea através do mecanismo de ionização dos AGCC, durante o processo de absorção. Entretanto, o volume de saliva produzido é reduzido em dietas com elevada proporção de concentrado, fazendo com que a contribuição de bicarbonato sanguíneo tenha de ser maior. Este fato reduz a quantidade de bases do

sangue e, dependendo da severidade, poderá acarretar na queda do pH sanguíneo (OWENS et al., 1998).

A acidose causa migração de ácidos do ambiente ruminal para o sangue, devido à diferença de osmolaridade dos dois ambientes, concomitantemente com a baixa concentração de bicarbonato, que foi em grande parte deslocado para o rúmen, dificultando desta forma a sua neutralização (GALYEAN; RIVERA, 2003). Outros efeitos sistêmicos da acidose também são observados na elevação da concentração de lactato sanguíneo (BROWN et al., 2000), redução do excesso de bases e bicarbonato plasmáticos e aumento do volume globular (NAGARAJA; TITGEMEYER, 2007).

A indução à acidose por meio da adição de doses crescentes de glicose intraruminal (0, 6, 12 e 18 g/kg de peso vivo) gera queda linear no pH do plasma e concentrações máximas de D-lactato de 5,5 mM, 12 h após o fornecimento de glicose (KREHBIEL et al., 1995). Esses resultados indicam um desequilíbrio no sistema ácido-básico, com aumento na severidade da acidose.

Goad, Goad e Nagaraja (1998) relataram que, durante acidose subclínica, foram observadas mínimas alterações no pH ruminal de bovinos adaptados ou não a altas proporções de concentrado. Da mesma forma, as concentrações de bicarbonato e excesso de base também apresentaram menores níveis sanguíneos, indicando certo grau de compensação fisiológica, devido ao aumento na absorção de AGCC.

Brown et al. (2000) observaram que animais confinados sujeitos à acidose clínica apresentaram queda no pH, nos níveis de bicarbonato, de CO₂ total e excesso de bases do sangue. Nessas condições, os efeitos das alterações no sistema ácido-base persistem por maior tempo (10 dias) do que quando comparado aos animais que apresentavam acidose subclínica (7 dias).

2.2 Uso de aditivos alimentares

O uso de aditivos alimentares tem sido uma ferramenta importante na garantia de melhor eficiência de fermentação e condição de saúde ruminal, podendo ser um importante aliado na redução do tempo de adaptação dos animais ao confinamento.

Diferentes estratégias de manejo e planejamento nutricional são descritas na literatura quando são testadas soluções em relação ao tipo de adaptação a ser utilizada para animais na fase inicial do confinamento.

Períodos de adaptação mais prolongados podem resultar em melhor desempenho na fase de adaptação ou ao longo do confinamento, quando comparado à adaptação com aumento crescente de concentrado (55% para 90%) por períodos menores que 14 dias (BROWN; PONCE; PULIKANTI, 2006). Da mesma forma, Schwartzkopf-Genswein et al. (2004) apresentam um período mínimo de 10 a 14 dias para a transição de dietas de alta forragem para dietas com elevada proporção de concentrado.

Bevans et al. (2005) testaram o aumento da proporção de concentrado na dieta de 40% para 90%, adaptando os animais de forma gradual (cinco dietas intermediárias por 15 dias) ou adaptação rápida (fornecimento de 90% de concentrado). Animais rapidamente adaptados apresentaram as maiores variações de pH ruminal, permanecendo maior tempo sob condições de pH menores que 6,2; 5,6 e 5,2. Estas condições podem aumentar a predisposição para ocorrência de acidose em alguns indivíduos. Por outro lado, períodos mais curtos de adaptação à dieta com elevada proporção de concentrado (10 dias) demonstraram-se satisfatórios e não comprometeram o desempenho dos animais ao final da terminação, quando níveis de 33 ou 44 mg/kg de monensina foram utilizados (WALKER et al., 2010).

A inclusão de aditivos alimentares que regulam o consumo de alimento e diminuem o tamanho das refeições (OWENS, 2007) pode ser uma alternativa importante para sistemas que adotam elevada proporção de concentrado na dieta, em busca de respostas à prevenção de distúrbios metabólicos.

2.2.1 Monensina sódica

Monensina é um ionóforo poliéster carboxílico produzido naturalmente a partir de cepas *Streptomyces ciannammonensis*. Os ionóforos agem no transporte de íons através da membrana celular, o que altera o balanço químico entre o meio interno e externo da célula, forçando a constante perda de energia e morte celular (DUFFIELD; RABIEE; LEAN, 2008).

O mecanismo de ação da monensina é mais efetivo contra bactérias gram-positivas (produtoras de hidrogênio, formato, amônia, lactato) do que sobre as gram-negativas, principalmente devido à ausência de membrana externa de proteção nas gram-positivas, o que as torna mais susceptíveis à ação da monensina (MORAIS; BERCHIELLI; REIS, 2011).

Quando *S. bovis*, bactéria ruminal gram-positiva e ácido tolerante, foi tratada com monensina houve uma grande depressão na quantidade de potássio intracelular e grande entrada de sódio e prótons, repercutindo em queda na produção de ATP (RUSSEL, 1987).

Marounek, Petr e Simunek (1993) observaram que, além da monensina inibir o crescimento de *S. bovis*, sua presença no meio não tem efeito sobre a contagem de *M. elsdenii*, garantindo a fermentação do lactato presente no rúmen.

Russell e Strobel (1989) descrevem os efeitos da monensina em relação aos AGCC no rúmen, a qual, via de regra, aumenta a proporção molar de propionato e isovalerato, e diminui a proporção molar de acetato, butirato e valerato. Dessa forma, o uso da monensina melhora o metabolismo energético, através do aumento do fluxo gliconeogênico hepático (devido ao aumento do ácido propiônico no rúmen), além de melhorar o metabolismo do nitrogênio.

Os ionóforos, em particular, apresentam grande emprego como ferramenta de manejo para regular a ingestão de alimentos e agir no controle da acidose (NAGARAJA; LECHTENBERG, 2007), especialmente a monensina, por afetar diretamente os microrganismos ruminais produtores de ácido láctico (*Streptococcus bovis* e *Lactobacillus spp.*), estabilizando a fermentação ruminal (COE et al., 1999) e prevenindo quedas bruscas do pH ruminal (BURRIN; BRITTON, 1986).

No Brasil, os ionóforos são preponderantemente utilizados em dietas de confinamento, com níveis médios de recomendação de 21,9 mg/kg de MS ingerida para animais em terminação (MILLEN et al., 2009).

Sob condições de alimentação *ad libitum*, novilhos recebendo monensina apresentaram menor tempo e quantidade por refeição ingerida, o que foi efetivo no controle da flutuação do pH ruminal (ERICKSON et al., 2003). Redução na variação do

consumo diário de novilhos recebendo monensina também foi observada por Burrin, Stock e Britton (1988).

O mecanismo envolvido na regulação do consumo com monensina não está completamente esclarecido, conforme destacado por Nagaraja e Lechtenberg (2007). Os autores sugerem que este mecanismo seja oriundo da combinação de efeitos antimicrobianos sobre a fermentação ruminal, bem como a ocorrência de aversão ao sabor da monensina.

Os efeitos de diferentes níveis de adição de monensina foram testados por Burrin e Britton (1986). Foram utilizados três tratamentos (0, 150, 300 mg monensina/animal/dia) com 75% de concentrado, fornecidos de forma abrupta. Queda no pH ruminal de 6,5 para 5,5 foi registrada 12 horas após fornecimento, sugerindo a ocorrência de acidose subclínica. Os maiores níveis de monensina tiveram maior pH 16 horas após o fornecimento da dieta, com baixas concentrações de lactato. O pico de AGCC ocorreu entre 12 e 16 horas após ingestão. Menores concentrações de acetato e butirato ocorreram às 8, 12 e 16 horas e aumento do propionato 20 horas após o início da adaptação foram observadas para dietas com inclusão de monensina.

A suplementação de níveis crescentes de monensina (0, 11, 33 mg/kg MS ingerida) para novilhos cruzados durante adaptação à dieta com elevada proporção de concentrado reduziu a IMS e a variação na ingestão, melhorando a eficiência de ganho. (BURRIN; STOCK; BRITTON, 1988).

Níveis de 33 ou 44 mg de monensina/kg MS ingerida adicionados à dieta com 93% de concentrado foram avaliados por Walker et al. (2010) durante o período de adaptação e posteriormente, até o final da terminação. O aumento na dose de monensina diminuiu a IMS em ambos os períodos avaliados, bem como apresentou melhora de 8 e 3% na eficiência de ganho para os primeiros 50 dias e durante a terminação (153 dias), respectivamente.

2.2.2 Óleos funcionais

Produzidos a partir do metabolismo secundário das plantas, sem contribuição direta ao seu desenvolvimento, os óleos e extratos destas plantas tem sido classificados como óleos essenciais (CALSAMIGLIA et al., 2007). Entretanto, outros óleos não podem ser

classificados como óleos essenciais, pois não são originados de essências de plantas, como é o caso dos óleos funcionais.

Os óleos de mamona e líquido da casca de caju têm sido descritos como óleos funcionais principalmente pela sua ação antimicrobiana (BESS et al., 2012), surgindo como potencial substituto dos antibióticos, comumente empregado na nutrição animal nas últimas décadas.

Bactérias gram-positivas são mais susceptíveis às propriedades antibacterianas dos óleos essenciais do que as gram-negativas. As bactérias gram-negativas possuem uma membrana externa que contém lipossacarídeos formando uma superfície hidrofílica. O caráter hidrofílico cria uma barreira à permeabilidade das substâncias hidrofóbicas, como os óleos essenciais (DORMAN; DEANS, 2000; BURT, 2004).

São inúmeros os extratos de plantas que foram estudados e apresentaram ação comprovada sobre a atividade microbiana. Pesquisa com óleo de anis, de pimenta e a combinação óleo de canela e de cravo comprovou a melhora no perfil de fermentação, com redução de acetato e amônia, bem como aumento na concentração de propionato ruminal, em bovinos de corte recebendo dieta com elevada proporção de concentrado (CARDOZO et al., 2006).

Dentre a grande variedade de óleos funcionais existentes, o óleo da mamona (*Ricinus communis* L) e líquido da casca de caju (*Anacardium occidentale*) têm sido utilizados de forma combinada (Essential – Oligobasic®) na dieta de ruminantes (Coneglian, 2009) e não-ruminantes (Bess et al., 2012).

A mamona é uma oleaginosa pertencente à família *Euforbiaceae*. O óleo de mamona é conhecido como óleo de rícino e diferencia-se dos demais vegetais pela maior quantidade de hidróxidos. Esse triglicerídeo possui aproximadamente 90% de suas cadeias de ácidos graxos composta por ácido ricinoléico. O ácido ricinoléico contém um grupo carboxila no carbono 1, uma dupla ligação no carbono 9 e outra hidroxila no carbono 12 que conferem a esse composto alta estabilidade e alta viscosidade (SAVY FILHO; BANZATTO; BARBOZA, 1999).

Os princípios ativos do líquido da casca de caju são o ácido anacárdio (2 a 3%), cardol (15 a 18%) e cardanol (75 a 80%). Todos os componentes são caracterizados

pela presença de cadeia linear de 15 carbonos, com variações quanto ao grau de insaturação (SHOBHA; RAMADOSS; RAVINDRANATH,1994).

Himejima e Kubo (1991) isolaram 16 compostos fenólicos a partir do óleo de caju, observando extensa atividade antimicrobiana contra 12 microrganismos. Entre esses compostos fenólicos, o ácido anacárdio apresentou a atividade mais inibitória contra as bactérias gram-negativas testadas. Por outro lado, o cardanol possui atividade tanto anti-inflamatória como antioxidante.

A atividade antimicrobiana comprovada dos óleos funcionais tem direcionado algumas pesquisas para investigar o potencial desses na manipulação da fermentação ruminal, visando melhoria na utilização de nutrientes pelos ruminantes.

Coneglian (2009) testou o uso de óleos funcionais de mamona e líquido da casca de caju ou monensina para bovinos recebendo dieta com elevada proporção de concentrado (80%). A monensina foi fornecida na dosagem de 200 mg/dia e os óleos funcionais adicionados nos níveis de 1, 2, 4 e 8 g/dia. Os tratamentos não alteraram a IMS, produção de N-amoniaco ruminal, concentração de propionato, butirato ou de AGCC totais. O nível de 4 g/dia de óleos funcionais foi recomendado para animais em crescimento mantidos no sistema confinado.

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar a fermentação ruminal, as variáveis sanguíneas, os microrganismos ruminais e o comportamento ingestivo, quando monensina e óleos funcionais de mamona e líquido da casca de caju foram utilizados em dieta com elevada proporção de concentrado fornecida de forma abrupta a bovinos canulados da raça Nelore.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais, instalações e dieta

O protocolo experimental do presente experimento foi aprovado pelo Comitê de ética e bem-estar animal da Universidade de São Paulo (Processo número 2011.1.1695.74.9).

Esse estudo foi conduzido nas instalações de bovinos canulados da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP). Foram utilizados 12 novilhos Nelore canulados no rúmen (532 ± 14 kg PV). Os animais foram mantidos em galpão coberto, em baias individuais com comedouro de cimento e bebedouros automáticos.

Foi utilizado o delineamento de blocos ao acaso com medidas repetidas no tempo, em dois períodos experimentais, sendo que cada período experimental constituiu um bloco. Foram adotados quatro tratamentos e seis repetições, com cada animal considerado uma unidade experimental, em dois períodos de coleta de 21 dias.

Todos os tratamentos foram compostos por uma dieta basal distintas apenas em relação aos aditivos alimentares utilizados, como segue: sem aditivos (CTR), com 400 mg de óleos funcionais de mamona e líquido da casca de caju/kg de MS (OF), 30 mg de monensina sódica/kg de MS (M30) e 40 mg de monensina sódica/kg de MS (M40).

A dose de 30 mg de monensina foi utilizada simulando as condições práticas adotadas em confinamentos. A estratégia de uso de 40 mg de monensina foi proporcionar menor desafio metabólico aos animais, contando com a redução na ingestão de matéria seca. Em relação aos óleos funcionais a dose utilizada foi baseou-se nos resultados obtidos por Coneglian (2009).

Os princípios ativos presentes na mistura de óleos funcionais de mamona e líquido da casca de caju (Oligobasic Agroindustrial Ltd., Cascavel, PR, Brasil). bem como monensina sódica (Phibro, Guarulhos, SP, Brasil) apresentam ação antimicrobiana e, dessa forma potencial de modificarem as características ruminais.

Os aditivos (monensina e óleos funcionais) em conjunto com milho moído foram colocados em misturador tipo Y para obter-se uma pré-mistura. Logo após, todos os demais ingredientes foram acrescentados à pré-mistura e permaneceram por cinco minutos no misturador horizontal com roscas tipo helicoidais. A porção concentrada da dieta foi ensacada e armazenada em local limpo e seco.

As dietas foram formuladas para atender as exigências de terminação conforme as recomendações do NRC (1996). A composição química dos ingredientes (Tabela 1), bem como a proporção destes na dieta basal (Tabela 2) são apresentados abaixo.

Tabela 1. Composição química dos ingredientes.

Nutrientes	Feno de tifton (<i>Cynodon dactylon</i>)	Milho quebrado	Farelo de soja
Matéria seca, %	79,2	81,62	82,00
Proteína bruta, % MS	9,33	10,16	53,36
Fibra em detergente neutro, % MS	77,29	12,08	11,19
Fibra em detergente ácido, % MS	36,42	5,26	8,12
Extrato etéreo, % MS	1,35	4,49	3,12
Amido, % MS	0,00	66,32	2,00
Nutrientes digestíveis totais ¹ , % MS	68,92	92,83	84,29

¹Estimado de acordo com equação de Weiss, Conrad e St. Pierre (1992)

Tabela 2. Proporção de ingredientes e composição química da dieta basal.

Ingredientes	% MS
Feno de Tifton (<i>Cynodon dactylon</i>)	7,75
Milho quebrado	82,41
Farelo de soja 45%	6,78
Ureia	1,29
Núcleo mineral ¹	1,77
Composição química ²	
Matéria seca total, %	82,00
Proteína bruta	16,74
Fibra em detergente neutro	16,63
Fibra em detergente ácido	7,68
Extrato etéreo	4,00
Amido	54,53
Nutrientes digestíveis totais ³	87,21

¹Suplemento vitamínico e mineral para bovinos de corte (níveis de garantia por kg de ração): Cálcio 120 g/kg, fósforo 40 g/kg, Manganês 1000 mg/kg, magnésio 10 g/kg, zinco 2000 mg/kg, cobre 560 mg/kg, iodo 30 mg/kg, cobalto 15/mg/kg, selênio 6 mg/kg, enxofre 30 mg/kg, sódio 60 mg/kg, potássio 100g/kg.

²Valores determinados em laboratório.

³Estimado de acordo com equação de Weiss, Conrad e St. Pierre (1992)

4.2 Período experimental

Esta pesquisa foi realizada em dois períodos de 21 dias cada, ambos antecidos por um período mínimo de seis semanas, no qual os animais não receberam dieta à base de grãos, tendo acesso *ad libitum* somente a uma dieta a base de feno de *Cynodon dactylon*.

No d-2 e d-1 (dias anteriores à transição abrupta), o fluido ruminal foi coletado 6 horas após o fornecimento da dieta e as determinações de cada variável determinadas. Neste último caso, após as análises, a média de cada variável foi calculada e apresentada como “linha base”. Ainda no d-1 foi realizada coleta para determinação dos metabólitos sanguíneos.

O fornecimento da dieta concentrada (92,25% de concentrados) ocorreu de forma abrupta, logo no primeiro dia da entrada dos animais em confinamento (d 1). A quantidade inicial de alimento fornecido no d 1 foi equivalente a 1,8% do peso corporal, permitindo acesso *ad libitum* à dieta nos dias posteriores. O fornecimento ocorreu pela manhã às 7h00, durante os dias 1 a 21 de cada período experimental.

Como os tratamentos foram instituídos de forma abrupta, as variáveis ruminais foram monitoradas ao longo das primeiras 60 horas após a transição de forragem para elevada proporção de concentrado. Posteriormente, as coletas foram espaçadas ao longo dos dias em cada período experimental.

4.3 Ingestão de matéria seca e comportamento ingestivo

A ingestão individual de matéria seca (IMS) foi avaliada diariamente entre os d -4 e d 21 dentro de cada período experimental. O nível de oferta foi ajustado para 5% de sobras. Amostras compostas das sobras foram formadas a partir da retirada e pesagem diária, sendo congeladas para posteriores análises bromatológicas. A IMS diária foi calculada pela quantidade de MS da dieta fornecida menos a quantidade de MS das sobras. A flutuação na IMS foi obtida pela diferença entre a ingestão do dia em relação ao dia anterior.

O comportamento ingestivo foi registrado por microcâmeras (modelo 420 TVL, Sony, Tokyo, Japão) no d 1, 2, 3, 12 e 20 de cada período durante 24 h consecutivas. O método direto de observação contínua foi empregado para análise do comportamento

ingestivo, conforme descrito por Bingham et al. (2009). Foi registrado o número de vezes em que o animal abaixou a cabeça (*head-down*) para comer (eventos/dia). O início de um novo evento foi considerado quando o novilho abaixou a cabeça para ingerir e finalizado quando o animal levantou a cabeça acima do alimento. A duração (min) de cada vez em que o animal abaixou a cabeça foi registrada e apresentada em minutos/dia. A taxa de ingestão (g MS/min) foi calculada como a IMS diária dividida pela duração de cada evento.

Atividades comportamentais e a postura dos novilhos foram avaliadas em intervalos de cinco minutos. As atividades individuais de cada animal incluíram: ingerindo, bebendo, ruminando em pé, ruminando deitado e atividades não ingestivas como: ócio, interação social e limpeza corporal (lambendo e coçando). Interação social foi registrada quando um animal estava lambendo ou cheirando o animal ao lado, conforme descrito em Robles et al. (2007). As atividades comportamentais foram apresentadas como porcentagem diária, a partir da soma do número de vezes em que cada atividade foi registrada e divisão desta pelo número total de observações diária (288 observações).

4.4 Análises bromatológicas

Amostras da dieta fornecida e das sobras foram secas em estufa de circulação forçada a 65 °C por 48 horas, sendo posteriormente moídas em moínho de facas tipo Willye (modelo TE-651/2, Tecnal, São Paulo, Brazil) e armazenadas para determinações bromatológicas. A determinação da matéria seca e cinzas foram realizadas conforme os procedimentos da AOAC (1990). O conteúdo de nitrogênio das amostras foi determinada pelo método micro Kjeldahl (AOAC, 1990), com posterior cálculo da proteína bruta (nitrogênio x 6,25). A fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido foram determinadas pelo método sequencial, descrito por Van Soest, Robertson e Lewis (1991).

4.5 Medida do pH ruminal

O pH do rúmen foi monitorado de forma contínua através de um *datalogger* (Dascor, Escondido, CA) inserido no rúmen. No d-3 (antes da transição abrupta) o

datalogger foi calibrado e inserido no rúmen via cânula ruminal. Solução padrão de pH 7 e pH 4 foram usadas com intuito de calibrar o eletrodo de pH (modelo S655CDHT, Dascor, Escondido, CA), conforme recomendações de Penner, Beauchemin e Mutsvangwa (2006). Os dados do pH ruminal foram armazenados em intervalos de 15 minutos do d-2 ao d 21. No d 14, os *dataloggers* foram retirados às 09h00 para descarregar os dados e recalibrar o eletrôdo de pH. Os dados de pH ruminal foram agrupados por novilho como pH médio diário, mínimo e máximo. Os tempos de pH abaixo de 5,6 e 5,2 foram utilizados como critério para caracterizar a condição de acidose subclínica ou clínica, respectivamente (BEVANS et al., 2005). Áreas da curva com pH abaixo de 5,6 e 5,2 foram utilizadas com indicadores da severidade em que a acidose subclínica e clínica ocorreram, respectivamente.

4.6 Análise do fluido ruminal

Anteriormente à transição abrupta (d-2 e d-1), amostras foram coletadas 6 h após o fornecimento da dieta e a média destes apresentada como “linha base”. Nos três dias iniciais a partir do fornecimento da dieta com elevada proporção de concentrado, amostras de fluido ruminal foram coletadas às 0, 6, 12, 24, 30, 36, 48, 54 e 60 h. Em nove dias (d 1, 2, 3, 5, 7, 10, 13, 17 e 21) dentro de cada período, as amostras foram coletadas 6 horas após o fornecimento da dieta. Os horários de coleta foram estabelecidos de acordo com os resultados obtidos por Coe et al. (1999) e Bevens et al. (2005).

Amostras de fluido ruminal (aproximadamente 200 mL) foram retiradas de diferentes porções do rúmen, usando uma bomba elétrica à vácuo. Posteriormente, o fluido ruminal foi filtrado em gaze e manualmente separado. Quatro subamostras de 15 mL foram pipetadas em microtubos e posteriormente congeladas a -20°C até o momento das análises.

As amostras para análise de AGCC (acetato, propionato e butirato) e ácidos graxos de cadeia ramificada (isobutírico, valérico e isovalérico) foram descongeladas e centrifugadas a 18.000 x g por 10 min. Então, 200 µL de ácido fórmico e 100 µL de padrão interno (ácido 2-etilbutírico) foram adicionados a 800 µL retirado do sobrenadante da amostra. Os AGCC foram determinados em cromatógrafo a gás

(Shimadzu, GC-2014) equipado com coluna capilar (Stabilwax, comprimento: 30 m, diâmetro interno: 0,53 mm). A temperatura de operação do injetor e detector de ionização de chama foi de 250 °C, sendo utilizado hélio como gás de arraste (vazão de 8,01 mL/min).

Antes de serem congeladas as amostras de nitrogênio amoniacal foram acidificadas com 1 mL de ácido sulfúrico a 1 N. Após descongelar, as amostras foram centrifugadas 1570 x *g* por 15 min, destiladas em destilador micro-Kjeldahl e tituladas usando-se ácido sulfúrico 0,05 N. Assim, a concentração de nitrogênio amoniacal foi obtida a partir da eq. 1, multiplicando-se o resultado final por 1000 para obter a unidade mg/dL:

$$\% \text{Nitrogênio amoniacal} = \frac{(\text{normalidade do H}_2\text{SO}_4 \times \text{miliequivalente do N} \times 100)}{(\text{volume da amostra} \times \text{volume H}_2\text{SO}_4)} \quad (1)$$

Sendo:

Normalidade do H₂SO₄: 0,05

Miliequivalente do N: 0,014

Volume da amostra: 5 mL

Volume de H₂SO₄: volume gasto na titulação (mL)

Para determinação do ácido láctico as amostras foram centrifugadas a 15.000 x *g* por 15 min e o sobrenadante foi analisado de acordo com Pryce (1969), usando espectrofotômetro (Nova 2000 UV) na faixa de leitura de 565 nm.

A osmolaridade foi determinada pela depressão do ponto de congelamento usando um micro-osmômetro automático (Modelo 3300, Advanced Instruments, Inc.).

4.7 Contagem de protozoários

Nos d 5 e d 21, amostras do conteúdo ruminal foram obtidas 6 h após o fornecimento da dieta. A partir de diferentes regiões do rúmen, uma amostra composta da fração sólida foi obtida e, depois espremida manualmente em gaze. Uma alíquota de 10 mL do fluido ruminal previamente filtrado foi pipetada em tubos de vidro contendo 20 mL de formaldeído a 37% (vol/vol). As amostras permaneceram em repouso até o momento da contagem dos gêneros de ciliados (DEHORITY, 2003). Foram identificados os gêneros *Entodinium*, *Diplodinium*, *Epidinium*, *Isotricha*, *Dasytricha*, *Ostracodinium*, *Eudiplodinium* e *Enoploplastron*. Para a identificação destes gêneros foi utilizada

câmara de contagem de Sedgwick-Rafter com capacidade de 1 mL e microscópio ótico comum provido de retículo com área de 0,4362 mm².

4.8 Quantificação relativa de bactérias ruminais

Amostras do conteúdo (25 g) e fluido ruminal (25 mL) foram coletadas de diferentes regiões do rumen, 6 h após o fornecimento da dieta, nos dias d-1 (linha base), 2, 5, 10 e 21 de cada período. As amostras foram processadas de acordo com a metodologia descrita por Stevenson e Weimer (2007). Posteriormente, o pélete bacteriano obtido foi dissolvido em 700 µL de solução tampão (Tris 100mM, EDTA 10mM e NaCl 0,15M, pH 8,0) e mantido a -80°C até a extração de DNA.

Duplicatas de 100 µL oriundas de cada amostra foram utilizadas para extração do DNA, realizada com o uso de kit comercial Qiagen DNA stool (QIAGEN, Hilden, Germany). A extração foi realizada segundo o protocolo descrito pelo fabricante. A extração iniciou-se com 200 µL de pélete ruminal em tampão. Em seguida, a amostra foi aquecida a 95°C e posteriormente, incubada com uma resina (INHIBITEX®) que tem por finalidade, retirar as substâncias nocivas ao DNA e inibidores de PCR. Foi realizada a digestão de proteínas com proteinase K e aquecimento a 70°C. Em seguida, foram realizadas sucessivas lavagens com tampões para permitir a ligação do DNA a membrana de sílica e retirada das impurezas. O último passo utilizou-se 200 µL de um tampão de recuperação com baixa quantidade de sais com o intuito de facilitar a separação do DNA da membrana de sílica da coluna de extração.

A quantificação relativa em relação ao total de bactérias (16 SDNA_r) foi estimada mediante a técnica de PCR em tempo real, utilizando o sistema de detecção ABI Prism® 7500 (Applied Biosystems) e tecnologia SYBR (Invitrogen®), com placas de 96 poços. As amostras foram processadas em duplicata e com controle negativo para cada gene de estudo. Em cada reação foram adicionados 1X SYBR Green (Applied Biosystems), 300 nM cada *primer*, 6,6 µl de água livre de nucleases e 1 µl de amostra de DNA, totalizando 20 µl. As sequências de *primers* utilizados estão descritos na Tabela 3. Os ciclos de amplificação da PCR em tempo real incluíram uma desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida por 44 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 30 segundos, bem como uma última etapa de extensão final a 72 °C por 30 segundos. A

especificidade de cada *primer* foi verificada através da curva de dissociação. Foi realizada uma curva padrão para cada bactéria de estudo a partir de diluições seriadas com *pool* das amostras. Como as bactérias alvos (*Streptococcus bovis*, *Fibrobacter succinogenes* e *Megasphaera elsdenii*) apresentaram eficiências semelhantes, a população total de bactérias (*total bacter*) e a quantificação relativa das populações foram avaliadas adotando-se o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 3. Sequências de *primers* utilizados para quantificação relativa de bactérias por reação da cadeia de polimerase em tempo real.

Microrganismo	Sequência ¹ (5' – 3')	Referências
<i>Total bacteria</i>	F: GTGSTGCAYGGYTGTCGTCA R: ACGTCRTCCMCACCTTCTC	Maeda et al. (2003)
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	F: GGTATGGGATGAGCTTGC R: GCCTGCCCCTGAACTATC	Koike and Kobayashi (2001)
<i>Megasphaera elsdenii</i>	F: GACCGAAACTGCGATGCTAGA R: TCCAGAAAGCCGCTTTCGCCACT	Ouwerkerk et al. (2002)
<i>Streptococcus bovis</i>	F: TTCCTAGAGATAGGAAGTTTCTTCGG R: ATGATGGCAACTAACAATAGGGGT	Stevenson and Weimer (2007)

¹Forward and Reverse

4.9 Análises sanguíneas

Amostras de sangue venoso foram coletadas da veia jugular em tubos com ativador de coágulo e gel separador (BD, SST II, Franklin Lakes, NJ, USA) em seringas para gasometria (Monovette, SARSTEDT, Nümbrecht, Alemanha). As coletas foram realizadas 6 h após o fornecimento da alimentação nos d 2, 3, 5, 10 e 21 de cada período experimental. Amostras provenientes do tubo com gel separador foram centrifugados (1.000 x g por 15 minutos) dentro de 1 hora após a coleta, seguido do armazenamento de 1 mL do soro a -20°C até análise. A osmolaridade do soro foi determinada pela depressão do ponto de congelamento usando um micro-osmômetro automático (Modelo 3300, Advanced Instruments, Inc.).

Após a coleta do sangue para gasometria, este foi rapidamente inserido no cartucho (modelo CG4⁺, Abbott Park, IL, USA), o qual foi então introduzido no analisador sanguíneo portátil (i-STAT, Abbott Park, IL, USA) e, após alguns instantes, os resultados foram gerados. Foram analisados o pH do sangue, a pressão parcial de CO₂, pressão parcial de O₂, CO₂ total, bicarbonato, saturação de O₂ e lactato. Para análise do volume globular sanguíneo foram coletados 10 mL de sangue venoso em tubo com

EDTA (BD, Franklin Lakes, NJ, USA). A determinação ocorreu em analisador hematológico automatizado (pocH-100iV Diff, Sysmex, Kobe, Japão).

4.10 Análise estatística

A média de cada variável coletada antes da transição abrupta foi calculada e apresentada como “linha base”. Estes valores não Cada novilho recebendo um tratamento dentro do respectivo período foi considerado como uma unidade experimental em todas as análises. Os dados foram analisados de acordo com o Proc Mixed (SAS Inst. Inc., Cary, NC), tendo os dias após a transição abrupta ou horas após o fornecimento da alimentação (6, 12, 24, 30, 36, 48, 54 e 60 h) como medidas repetidas. Dentre as estruturas de covariância testadas, a que melhor se ajustou ao modelo estatístico com maior frequência foi a Simetria Composta Heterogênea (CSH), baseado no menor valor do critério de informação Akaike corrigido (AICC) (WANG; GOONEWARDENE, 2004). Animal alinhado dentro de tratamento e período foi utilizado como erro termo. O modelo incluiu efeito fixo de tratamento, tempo (dias) e a interação entre tratamento e dia, tendo período (bloco) como efeito aleatório. O efeito fixo de horas após o início da transição abrupta foi utilizado no mesmo modelo para as variáveis de fermentação ruminal. Os dados foram analisados em relação à presença de *outliers*, normalidade dos resíduos (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (teste de Hartley). Quando a premissa de normalidade não foi atendida, a transformação logarítmica em base 10 (contagem de protozoários, tempo pH abaixo de 5,6 e 5,2) e raiz quadrada (área abaixo pH 5.6) foi necessária. O tempo de pH abaixo de 5,2 e área da curva com pH abaixo de 5,2 considerando as horas após o início da transição abrupta, não apresentaram distribuição normal. Assim os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. As médias de todas as variáveis apresentadas correspondem as médias corrigidas pela metodologia dos quadrados mínimos. Na ocorrência de interação entre tratamento e tempo, os valores foram desmembrados entre os tratamentos em cada período de tempo correspondente. As comparações de médias entre os tratamentos foram realizadas por meio do teste ajustado de Tukey ($\alpha = 0,05$).

5. RESULTADOS

As variáveis ruminais coletadas anteriormente à transição abrupta (novilhos recebendo feno) são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Ingestão de matéria seca e características ruminais de novilhos Nelore antes da transição abrupta de forragem para dieta com elevada proporção de concentrado.

Item	Média	Mínimo	Máximo	EPM
Ingestão de matéria seca				
kg/dia	6,07	3,98	7,92	0,08
% peso corporal	1,14	0,92	1,31	0,01
Parâmetros ruminais (mol/100 mol)				
Concentração total (mM)	82,59	42,89	116,13	2,77
Acetato (A)	72,22	69,82	74,47	0,18
Propionato (P)	16,59	15,29	17,91	0,10
Butirato	8,01	7,29	8,62	0,05
Isobutirato	0,93	0,63	1,12	0,01
Valerato	0,95	0,71	1,25	0,01
Isovalerato	1,33	0,64	2,14	0,06
Relação A:P	4,35	3,92	4,86	0,03
N-amoniacal, mg/ dL	4,20	2,24	7,98	0,18
Lactato, mM	ND	ND	ND	ND
Osmolaridade, mOsm/L	260,95	239,00	279,00	2,07

ND: Não detectado

5.1 Características ruminais – Avaliação das primeiras horas após transição abrupta

O período inicial após transição abrupta é apresentado a seguir e compreende oito coletas iniciando 6 h e finalizando 60 h após o início da transição abrupta de forragem para elevada proporção de concentrado (Tabela 5).

A proporção de propionato no rúmen sofreu efeito ($P = 0,028$) da interação entre tratamento e horas após a transição abrupta (Figura 1). A partir das 36 h até 60 h após transição abrupta a proporção de propionato foi maior para M30 e M40 comparado às dietas OF e CTR. Por outro lado, os aditivos alimentares não afetaram significativamente a proporção de acetato ($P = 0,633$). Dessa forma, a relação A:P diminuiu ($P = 0,020$) com o fornecimento de monensina comparado ao tratamento CTR, sem diferença em relação ao tratamento OF. Maior proporção de butirato ($P = 0,039$) foi observada no tratamento CTR em comparação ao M40, não sendo observadas diferenças para OF e M30. O uso de OF diminuiu a proporção de isovalerato ($P = 0,020$) comparado com M30. A concentração total de AGCC ($P = 0,257$), as proporções

de isobutirato ($P = 0,730$), valerato ($P = 0,616$), N-amoniacal ($P = 0,908$) e lactato ($P = 0,088$) não diferiram entre os tratamentos (Tabela 5).

O uso de aditivos alimentares não resultou em mudanças significativas no pH ruminal médio ($P = 0,370$) e tempo de pH abaixo de 5,6 ($P = 0,242$) durante as 60 horas iniciais de avaliação após a transição abrupta. Porém, M30 apresentou menor ($P = 0,004$) área da curva com pH abaixo de 5,6 comparado à M40. Em todos os tratamentos, exceto M30, os novilhos apresentaram tempo de pH abaixo de 5,2, bem como, área da curva com pH abaixo de 5,2 ao longo do período inicial de análise, levando a diferenças significativas ($P = 0,047$ e $P = 0,022$, respectivamente).

A proporção de AGCC, o N-amoniacal e as variáveis de pH ruminal, com excessão da concentração de lactato, sofreram diferenças significativas entre horas após o início da transição abrupta (Tabela 5; $P \leq 0,008$). A concentração total de AGCC foi 86,4 mM 6 h após o fornecimento da dieta, mantendo, então, aumento constante até às 48 h após o fornecimento da dieta (126,6 mM). Entre 54 e 60 h após o fornecimento da dieta a concentração permaneceu entre 121,8 a 116,1 mM. A proporção ruminal de acetato diminuiu gradualmente, sendo observado 68,5% 6 horas após e 52,5% 48 horas após o fornecimento da dieta, e mantendo-se praticamente estável, entre 54,1 e 52,6%, 54 e 60 h após o fornecimento da dieta, respectivamente. Redução também foi observada na relação A:P, a qual 6 horas após foi 3,59 e 2,21 60 horas após o fornecimento da dieta. A proporção molar de butirato por sua vez, aumentou rapidamente de 8,2%, 6 horas após, para 18,3%, 24 horas após o fornecimento da dieta, permanecendo entre 18,6 e 16,8% entre as coletas realizadas às 30 e 60 h após o fornecimento da dieta. Isobutirato foi 1,17% 6 h após, diminuindo para 1,04% na coleta 36 h após, o qual permaneceu constante até atingir 1,47% 60 h após o fornecimento da dieta. Valerato aumentou de 0,97% para 1,23% entre 6 e 60 h após o fornecimento da dieta. A proporção de isovalerato permaneceu entre 1,35 e 1,9% das 6 até 36 h após o fornecimento da dieta, e entre 2,53 e 2,82% 48, 54 e 60 h após o fornecimento da dieta. A concentração de N-amoniacal aumentou de 20,5 para 27,5 mg/dL entre 6 e 36 h, apresentando 25,8 mg/dL 60 h após o fornecimento da dieta (Dados não mostrados).

O pH médio de 6,82 foi registrado 6 horas, diminuindo para 5,64 36 horas após, seguido por um aumento 48 e 54 h (pH 5,82 e 6,01, respectivamente) e,

posteriormente, houve uma queda 60 h após o fornecimento da dieta (pH 5,61). A partir de 24 h após o fornecimento da dieta, as primeiras ocorrências de pH abaixo de 5,6 foram observadas (20,8 min/dia). Então, o tempo de pH abaixo de 5,6 sofreu aumento gradativo até atingir 222,7 min/dia 48 h após, diminuindo para as coletas subsequentes (150,2 e 133,2 min/dia, 54 e 60 h após o fornecimento da dieta).

Tabela 5. Características do fluido ruminal de novilhos Nelore durante as primeiras horas (6 – 60 horas) após o fornecimento abrupto da dieta com elevada proporção de concentrado¹.

Item	Tratamento ²					P-valor		
	CTR	OF	M30	M40	EPM	Trat	Hora ³	Trat*Hora
Características ruminais (mol/100 mol)								
Concentração total de AGCC (mM)	121,12	113,49	117,33	109,08	1,72	0,257	<,0001	0,867
Acetato (A)	57,04	57,16	55,41	56,62	0,46	0,633	<,0001	0,937
Propionato (P)	20,82	21,81	24,93	25,85	0,34	0,005	0,002	0,028
Butirato	17,97a	16,82ab	14,86ab	13,14b	0,41	0,039	0,0008	0,124
Isobutirato	1,13	1,22	1,13	1,11	0,03	0,730	0,0003	0,492
Valerato	1,07	1,13	1,17	1,13	0,02	0,616	0,0085	0,768
Isovalerato	2,00ab	1,89b	2,31a	2,18ab	0,05	0,0207	0,0012	0,257
Relação A:P	2,85a	2,71ab	2,30b	2,32b	0,05	0,0203	<,0001	0,109
N-amoniacal, mg/ dL	21,89	20,52	20,53	21,44	0,67	0,908	<,0001	0,120
Lactato, mM	0,517	0,450	0,534	0,438	0,02	0,088	0,400	0,252
Osmolaridade, mOsm/L	312,39	300,87	311,34	301,16	2,26	0,221	<,0001	0,861
pH ruminal								
Médio	5,93	5,94	6,26	6,01	0,04	0,370	0,001	0,157
Tempo < 5,6, min/d	79,72	78,97	45,41	111,65	8,63	0,242	<,0001	0,088
Tempo < 5,2, min/d ⁴	13,61	12,22	0,00	23,37	3,81	0,047	NA	NA
Área < pH 5,6, pH x min/d	0,287ab	0,307ab	0,124b	0,510a	0,05	0,004	0,016	0,135
Área < pH 5.2, pH x min/d ⁴	0,06	0,03	0,00	0,11	0,02	0,022	NA	NA

NA: Não analisado pois não respeitou a normalidade dos resíduos.

^{a-b} Médias acompanhadas por letras distintas em cada linha são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

¹ Forragem: Concentrado: 7,75:92,25.

² CTR = controle (sem adição de aditivos alimentares), OF = óleo funcionais (mistura de óleo de mamona e líquido da casca de caju fornecido a 400 mg/kg), M30 = Monensina fornecida a 30 mg/kg, e M40 = Monensina fornecida a 40 mg/kg.

³ Hora: Amostragem de fluido ruminal ocorreu às 6, 12, 24, 30, 36, 48, 54 e 60 h após o fornecimento da dieta.

⁴ Médias comparadas pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

Figura 1. Proporção de propionato ruminal de novilhos Nelore recebendo dietas com elevada proporção de concentrado fornecidas de forma abrupta com o uso de diferentes aditivos alimentares.

CTR = controle (sem adição de aditivos alimentares), OF = óleo funcionais (mistura de óleo de mamona e líquido da casca de caju fornecido a 400 mg/kg), M30 = Monensina fornecida a 30 mg/kg, e M40 = Monensina fornecida a 40 mg/kg. As letras indicam diferenças entre os tratamentos nas respectivas horas ($P \leq 0,05$). Linhas verticais representam o fornecimento da alimentação.

5.2 Ingestão de matéria seca

Novilhos submetidos à transição abrupta de forragem para elevada proporção de concentrado apresentaram IMS média de 9,45, 9,35, 8,68 e 8,54 kg/d, respectivamente nos tratamentos CTR, OF, M30 e M40. Houve interação significativa ($P = 0,008$) entre tratamento e dias após a transição abrupta (Tabela 6). Os tratamentos monensina (M30 e M40) apresentaram menor IMS no d 3, d 8 e d 9 após transição abrupta comparado com tratamento controle ($P < 0,05$) (Figura 2a). Novilhos recebendo OF apresentaram maior IMS em relação aos demais tratamentos no d 12, enquanto no d 4 e d 9 o grupo

OF apresentou maior IMS do que M40. Entretanto, no d 17 os animais recebendo FO tiveram a menor IMS comparada ao CTR ($P = 0,045$) (Figura 2a). O mesmo comportamento de ingestão ao longo dos dias foi observado para IMS em porcentagem do peso corporal (IPC). Também houve interação entre tratamento e dias para IPC ($P = 0,045$). Os tratamentos M30 e M40 tiveram menor IPC no d 3, d 8 e d 9 em relação ao CTR. No d 10 observou-se diferença entre M40 ($P = 0,043$) comparado ao CTR. Maior IPC foi observado para OF no d 9 e d 12 em relação à M40 e M30, respectivamente. Entretanto, IPC de novilhos recebendo OF foi menor no d 16 e d 17 em relação ao CTR, bem como no d 18 comparado à M30 (Figura 2b). A flutuação na IMS não sofreu efeito dos tratamentos ($P = 0,38$).

Tabela 6. Ingestão de matéria seca e características ruminais durante todo o período experimental de novilhos recebendo dieta com elevada proporção de concentrado de forma abrupta¹.

Item	Tratamento ²				EPM	P-valor		
	CT	OF	M30	M40		Trat	Dia ³	Trat*Dia
Ingestão de matéria seca								
kg/dia	9,45	9,35	8,68	8,54	0,11	0,505	<,0001	0,008
% peso corporal	1,84	1,70	1,68	1,57	0,02	0,014	<,0001	0,045
Flutuação (kg/dia)	0,33	0,49	0,32	0,22	0,08	0,380	<,0001	0,330
Características ruminais								
Concentração total de AGCC (mM)	115,77a	111,55ab	117,36a	105,02b	1,55	0,017	<,0001	0,485
Acetato (A)	55,96	54,69	54,43	56,35	0,99	0,520	<,0001	0,946
Propionato (P)	24,22	25,39	28,46	27,19	1,12	0,125	<,0001	0,034
Butirato	14,64a	14,63a	12,35ab	11,89b	0,71	0,014	<,0001	0,27
Isobutirato	1,17	1,09	1,07	1,03	0,03	0,615	0,004	0,174
Valerato	1,40	1,60	1,37	1,12	0,05	0,027	0,610	0,031
Isovalerato	2,75	2,68	2,49	2,61	0,09	0,578	<,0001	0,217
Relação A:P	2,59a	2,46ab	2,12b	2,29ab	0,06	0,030	<,0001	0,352
N-amoniaco, mg/ dL	28,46	27,35	28,33	28,67	0,69	0,861	<,0001	0,113
Lactato, mM	0,77a	0,62b	0,65ab	0,54b	0,02	0,0012	0,562	0,084
Osmolaridade, mOsm/L	340,91a	335,20ab	333,7ab	317,14b	3,00	0,040	<,0001	0,601

^{a-b} Médias acompanhadas por letras distintas em cada linha são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

¹ Forragem:Concentrado: 7,75:92,25.

²CTR = controle (sem adição de aditivos alimentares), OF = óleo funcionais (mistura de óleo de mamona e líquido da casca de caju fornecido a 400 mg/kg), M30 = Monensina fornecida a 30 mg/kg, e M40 = Monensina fornecida a 40 mg/kg.

³ Dia: Amostragem do fluido ruminal foram realizadas 6 h após o fornecimento da dieta, nos d 1, 2, 3, 5, 7, 10, 13, 17 e 21. A ingestão de matéria seca foi obtida diariamente (d 1 a 21).

A.

B.

Figura 2. Ingestão de matéria seca em kg/dia (A) e em porcentagem do peso corporal (B) de novilhos Nelore recebendo dieta com elevada proporção de concentrado fornecida de forma abrupta com o uso de diferentes aditivos alimentares.

CTR = sem adição de aditivos alimentares, OF = óleo funcionais fornecido a 400 mg/kg, M30 = Monensina fornecida a 30 mg/kg, e M40 = Monensina fornecida a 40 mg/kg. A seta indica o dia que a dieta com elevada proporção de concentrado foi fornecida de forma abrupta. Os asteriscos indicam diferenças entre os tratamentos nos respectivos dias ($P \leq 0,05$).

5.3 Características ruminais – Avaliação do período experimental

Houve efeito da interação entre tratamento e dia para a proporção de propionato ($P = 0,034$) e valerato ($P = 0,031$). O fornecimento de M30 ou M40 aumentou ($P \leq 0,005$) a proporção de propionato no d 3, sendo que os maiores níveis de propionato persistiram até o d 5 para os novilhos recebendo M40, comparado aos níveis apresentados pelos tratamentos CTR ($P = 0,003$) e OF ($P = 0,01$) (Figura 3a). Maiores proporções de valerato no d 5 foram observadas para OF ($P = 0,005$) em relação aos demais tratamentos, alcançando a maior concentração no d 17 ($P \leq 0,027$), enquanto no d 21 foi maior ($P = 0,008$) em relação à M40 (Figura 3b).

A proporção molar de acetato ($P = 0,520$; média 55,35 mol/100 mol), isobutirato ($P = 0,615$; média 1,09 mol/100 mol), isovalerato ($P = 0,578$; média 2,63 mol/100 mol) e a concentração de N-amoniaco ($P = 0,861$; média 28,20 mg/dL) não foram afetadas pelos tratamentos (Tabela 6). Entretanto, a concentração total de AGCC sofreu efeito de tratamento ($P = 0,017$), sendo as maiores concentrações observadas para M30 e CTR comparados à M40. Os tratamentos também afetaram significativamente a proporção de butirato ($P = 0,014$), que foi menor para M40 em relação à dieta CTR e OF. Novilhos recebendo M30 apresentaram menor relação A:P ($P = 0,030$) comparado ao CTR, porém não foram encontradas diferenças em relação ao OF e M40.

A osmolaridade ruminal sofreu efeito de tratamento ($P = 0,040$), com menor osmolaridade ruminal registrada para M40 (317,1 mOsm/L) comparado ao CTR (340,9 mOsm/L), sem diferenças para os demais tratamentos (OF e M30). Menores concentrações de lactato ruminal ($P = 0,001$) foram encontradas nos tratamentos OF e M40 comparados ao CTR, sem diferença em relação ao M30 (Tabela 6).

As concentrações dos AGCC, N-amoniaco, osmolaridade ruminal, mas não de lactato, sofreram efeito de dia após a transição abrupta ($P \leq 0,004$; Tabela 6). As variações médias diárias das principais características ruminais são apresentadas na Figura 4.

A.

B.

Figura 3. Proporção molar de propionato (A) e valerato (B) ruminal de novilhos Nelore recebendo dieta com elevada proporção de concentrado fornecida de forma abrupta com o uso de diferentes aditivos alimentares. CTR = controle (sem adição de aditivos alimentares), OF = óleo funcionais (mistura de óleo de mamona e líquido da casca de caju fornecido a 400 mg/kg), M30 = Monensina fornecida a 30 mg/kg, e M40 = Monensina fornecida a 40 mg/kg. Os asteriscos indicam diferenças entre os tratamentos nos respectivos dias ($P \leq 0,05$).

Figura 4. Concentração total de AGCC (A), proporção molar de acetato (B), relação acetato:propionato (C) e proporção molar de butirato (D) ruminal ao longo dos dias de coleta. Os efeitos de tratamentos estão descritos na Tabela 6. Não foram observados efeitos de interação entre tratamento e dia após transição abrupta ($P \geq 0,05$). Dessa forma, os valores dentro de cada dia referem-se à média dos tratamentos. As letras indicam diferenças entre os dias segundo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média.

5.3.1 pH do rúmen

Após a transição abrupta houve efeito ($P = 0,040$) da interação entre tratamento e dia para o pH médio diário (Tabela 7). Maior pH médio foi observado no d 3 para M30 (pH 6,17) em relação à dieta CTR (pH 5,64) e M40 (pH 5,56) (Figura 5). Posteriormente, todos os tratamentos tiveram o pH diminuído até o d 10. O tratamento M40 apresentou menor pH médio em relação ao CTR no d 14 (5,58 vs 6,02, $P = 0,025$), d 15 (5,59 vs 6,01, $P = 0,025$) e d 19 (5,67 vs 6,23, $P = 0,003$), enquanto M30 apresentou pH médio menor do que CTR no d 14 (5,62 vs 6,02, $P = 0,038$), d 19 (5,74 vs 6,23, $P = 0,012$) e d 21 (5,69 vs 6,08, $P = 0,045$) (Figura 5). O pH médio diário foi menor ($P = 0,026$) para OF (5,58) comparado ao CTR (6,01) no d 15, mas aumentou no d 19 e foi maior que M40 (6,10 vs 5,67, $P = 0,029$). Não houve efeito de tratamento para pH diário mínimo ($P = 0,910$) ou máximo ($P = 0,985$), que apresentaram média de pH 5,21 e 6,49, respectivamente. Os tratamentos também não alteraram a área da curva com pH abaixo de 5,6 (média de 2,72 pH x hora/dia, $P = 0,980$), área da curva com pH abaixo de 5,2 (média de 0,58 pH x hora/dia, $P = 0,883$), tempo de pH abaixo de 5,6 (média de 8,9 hora/dia, $P = 0,738$) e tempo de pH abaixo de 5,2 (média de 2,65 hora/dia, $P = 0,884$).

Tabela 7. pH ruminal de novilhos Nelore recebendo dieta com elevada proporção de concentrado¹ de forma abrupta com o uso de diferentes aditivos alimentares.

Item	Tratamento ²				EPM	P-valor		
	CT	OF	M30	M40		Trat	Dia	Trat*Dia
pH ruminal								
Médio	5,83	5,80	5,77	5,74	0,02	0,870	<,0001	0,040
Mínimo	5,25	5,23	5,20	5,18	0,01	0,910	<,0001	0,247
Máximo	6,51	6,50	6,49	6,48	0,02	0,985	<,0001	0,058
Tempo abaixo (h/d)								
pH < 5,6	8,03	8,32	8,88	10,37	0,31	0,738	<,0001	0,204
pH < 5,2	3,17	2,26	3,02	2,15	0,22	0,884	0,0012	0,095
Área abaixo da curva (pH x h/d)								
Área < pH 5,6	2,86	2,65	2,76	2,63	0,16	0,980	0,0009	0,071
Área < pH 5,2	0,77	0,66	0,53	0,39	0,08	0,883	0,1867	0,889

¹ Forragem:Concentrado: 7,75:92,25.

²CTR = controle (sem adição de aditivos alimentares), OF = óleo funcionais (mistura de óleo de mamona e líquido da casca de caju fornecido a 400 mg/kg), M30 = Monensina fornecida a 30 mg/kg, e M40 = Monensina fornecida a 40 mg/kg.

Figura 5. pH ruminal médio de novilhos Nelore recebendo dietas com elevada proporção de concentrado fornecidas de forma abrupta com diferentes aditivos alimentares.

CTR = controle (sem adição de aditivos alimentares), OF = óleo funcionais (mistura de óleo de mamona e líquido da casca de caju fornecido a 400 mg/kg), M30 = Monensina fornecida a 30 mg/kg, e M40 = Monensina fornecida a 40 mg/kg. Os asteriscos indicam diferenças entre os tratamentos nos respectivos dias ($P \leq 0,05$).

5.4 Comportamento animal

A duração dos eventos de *head-down* ($P = 0,775$), frequência ($P = 0,062$) e taxa de ingestão ($P = 0,836$) não foram alteradas pelos tratamentos (Tabela 8). Valores médios dos tratamentos foram 152,71 min/d ingerindo, 76,81 eventos/d e 60,05 g MS/min. Por outro lado, os dias após a transição abrupta diminuiram a duração dos eventos de *head-down* (175,3 no d 1 vs 147,7 min/dia no d 20; $P = \leq ,0001$) e a frequência (90,87 no d 1 vs 65,45 eventos/dia no d 20; $P = \leq ,0001$). No d 3, os novilhos apresentaram a menor taxa de ingestão (51,6 g MS/min). Porém no d 20 houve aumento significativo, sendo observada a maior taxa de ingestão do período experimental com 80,53 g MS/min (Figura 6). Interação entre tratamento e dia não foi significativa para nenhuma das variáveis comportamentais ($P \geq 0,05$).

A inclusão de diferentes aditivos alimentares em dietas com elevada proporção de concentrado fornecidas de forma abrupta não afetou a porcentagem diária das atividades comportamentais (Tabela 9), em que os animais gastaram em ócio (média 65,9%, $P = 0,81$), ingerindo (média 14,3%, $P = 0,55$), ruminando deitado (média 10%, $P = 0,21$), ruminando em pé (média 2,63%, $P = 0,53$), bebendo água (média 2,85%, $P = 0,40$), comportamento social (média 2,7%, $P = 0,97$) e limpeza corporal (média 1,6%, $P = 0,34$). O percentual de tempo diário em que os novilhos gastaram bebendo água foi diferente ($P = 0,02$) entre os dias após a transição abrupta. No d 2 os novilhos apresentaram maior tempo bebendo comparado ao d 3 (3,15% vs 2,01%, $P = 0,05$) (dados não mostrados).

Tabela 8. Comportamento ingestivo de novilhos Nelore recebendo dieta com elevada proporção de concentrado¹ fornecida de forma abrupta com diferentes aditivos alimentares.

Item	Tratamento ²				EPM	P-valor		
	CTR	OF	M30	M40		Trat	Dia	Trat*dia
<i>Head-down</i> ³								
Duração (min/dia)	150,6	159,1	141,6	159,5	3,9	0,775	<,0001	0,151
Frequência (eventos/dia)	99,6	70,5	73,7	63,4	2,8	0,062	<,0001	0,134
Taxa ingestão (g MS/min)	66,03	61,77	57,51	54,92	2,2	0,836	0,024	0,817

¹ Forragem:Concentrado: 7,75:92,25.

²CTR = controle (sem adição de aditivos alimentares), OF = óleo funcionais (mistura de óleo de mamona e líquido da casca de caju fornecido a 400 mg/kg), M30 = Monensina fornecida a 30 mg/kg, e M40 = Monensina fornecida a 40 mg/kg.

³ Metodologia de avaliação do comportamento ingestivo conforme descrita por Bingham et al. (2009).

Tabela 9. Atividades comportamentais (porcentagem diária) de novilhos Nelore recebendo dieta com elevada proporção de concentrado¹ fornecida de forma abrupta.

Atividade	Tratamento ²				EPM	P-valor		
	CTR	OF	M30	M40		Trat	Dia	Trat*Dia
Comendo	15,34	14,14	13,22	14,51	0,33	0,55	0,12	0,32
Ócio	64,33	65,60	66,74	66,95	0,63	0,81	0,32	0,56
Ruminando deitado	10,04	10,77	11,28	7,89	1,74	0,21	0,13	0,30
Ruminando em pé	2,98	2,94	1,62	2,99	0,24	0,53	0,23	0,69
Bebendo	3,08	2,62	2,45	3,25	0,15	0,40	0,02	0,25
Interação social	2,64	2,63	2,93	2,72	0,22	0,97	0,30	0,22
Limpeza corporal	1,59	1,30	1,76	1,69	0,08	0,34	0,17	0,16

Atividades comportamentais foram registradas no d 1, 2, 3, 12 e 21 em intervalos de 5 minutos durante 24 horas.

¹ Forragem:Concentrado: 7,75:92,25.

²CTR = controle (sem adição de aditivos alimentares), OF = óleo funcionais (mistura de óleo de mamona e líquido da casca de caju fornecido a 400 mg/kg), M30 = Monensina fornecida a 30 mg/kg, e M40 = Monensina fornecida a 40 mg/kg.

Figura 6. Comportamento ingestivo de novilhos Nelore recebendo dieta com elevada proporção de concentrado fornecida de forma abrupta com diferentes aditivos alimentares.

Os tratamentos estão descritos na Tabela 8. Não foram observados efeitos de tratamento e interação entre tratamento e dia após transição abrupta ($P \geq 0,05$). Dessa forma, os valores referem-se à média dos tratamentos. As letras indicam diferenças entre os dias ($P \leq 0,05$). As barras representam o erro padrão da média.

5.5 Metabólitos sanguíneos

Foi observado efeito de tratamento para $p\text{CO}_2$ ($P = 0,038$) com maior nível para M30 comparado ao CTR, enquanto maiores níveis de HCO_3^- ($P = 0,006$) e TCO_2 ($P = 0,003$) foram encontrados para OF e M30 em relação ao CTR (Tabela 10). O fornecimento de OF proporcionou maior excesso de bases (EB) ($P = 0,026$) em relação à dieta CTR, sem diferenças para M30 e M40. Por outro lado, os tratamentos não apresentaram efeito para volume globular sanguíneo (VGS) (média 33,97%, $P = 0,259$), osmolaridade (média 285,8 mOsm/L, $P = 0,294$), pH (média 7,390, $P = 0,332$), lactato (média 0,547 mmol/L, $P = 0,700$), $p\text{O}_2$ (média 32,38 mm Hg, $P = 0,089$) e $s\text{O}_2$ (média 55,28, $P = 0,115$). Com exceção de $p\text{O}_2$ e $s\text{O}_2$, todas as variáveis sanguíneas

avaliadas apresentaram efeito significativo de dia após a transição abrupta ($P \leq 0,027$). Entretanto, não houve efeito de interação entre tratamento e dia após a transição abrupta para nenhuma das variáveis avaliadas ($P \geq 0,05$).

5.6 Microrganismos ruminais

Bactérias ruminais da espécie *Fibrobacter succinogenes* ($P = 0,465$), *Streptococcus bovis* ($P = 0,781$) e *Megasphaera elsdenii* ($P = 0,972$) não diferiram entre os tratamentos (Tabela 11). *Fibrobacter succinogenes* ($P < 0,0001$) e *Streptococcus bovis* ($P < 0,0001$) passaram a ter menor expressão ao longo dos dias, enquanto *Megasphaera elsdenii* ($P = 0,026$) apresentou maior expressão durante este período (Figura 7). Não foi observado efeito ($P \geq 0,05$) da interação entre tratamento e dia após a transição abrupta para a expressão de bactérias.

Todos os gêneros de protozoários ciliados avaliados (*Entodinium*, *Diplodinium*, *Epidinium*, *Isotricha*, *Dasytricha*), bem como a concentração total de protozoários foram significativamente alterados pelos tratamentos ($P < 0,0001$), porém sem alterações entre os dias após transição abrupta ($P \geq 0,05$) (Tabela 11).

Alguns gêneros de protozoários ciliados (*Ostracodinium*, *eudiplodinium*, *enoploplastron*), não foram observados nas amostras de fluido ruminal oriundas dos tratamentos monensina (M30 e M40). Independentemente do gênero de protozoários ciliados, observou-se maior contagem para o tratamento CTR ($P < 0,0001$), contagem intermediária para OF e as menores para novilhos recebendo M30 e M40.

Tabela 10. Variáveis sanguíneas de novilhos Nelore recebendo dieta com elevada proporção de concentrado¹ fornecida de forma abrupta com o uso de diferentes aditivos alimentares.

Item	Tratamento ²					Dia					EPM	P-valor		
	CTR	OF	M30	M40	EPM	2	3	5	10	21		Trat	Dia	Trat*dia
VGS, %	32,1	32,7	35,8	35,1	0,4	37,3a	35,7ab	34,7b	32,0c	30,0d	1,04	0,259	<,0001	0,75
Osmolaridade, mOsm/L	286,3	285,3	286,9	284,6	0,4	285ab	284,5b	285,3ab	286,1ab	288,0a	0,88	0,294	0,020	0,303
pH	7,381	7,404	7,389	7,386	0,003	7,418a	7,378b	7,386b	7,377b	7,391b	0,005	0,332	<,0001	0,350
Lactato, mmol/L	0,56	0,48	0,52	0,63	0,03	0,88a	0,60b	0,51bc	0,40cd	0,33d	0,07	0,700	0,002	0,800
pCO ₂ , mmHg	43,9b	45,6ab	46,6a	46,1ab	0,29	45,1b	44,8b	45,1ab	46,2a	46,5a	0,64	0,038	0,027	0,368
pO ₂ , mmHg	33,8	32,8	30,3	32,6	0,40	32,1	31,9	33,6	32,5	31,7	0,90	0,089	0,835	0,780
EB, mmol/L	0,93b	3,80a	3,13ab	2,60ab	0,25	4,5a	1,16c	2,16bc	1,96bc	3,29ab	0,52	0,026	<,0001	0,348
HCO ₃ ⁻ , mmol/L	25,7b	28,3a	27,8a	27,2ab	0,22	28,8a	26,2c	26,8bc	26,7bc	27,8ab	0,16	0,006	<,0001	0,347
tCO ₂ , mmol/L	26,9b	29,7a	29,3a	28,6ab	0,24	30,1a	27,3c	28,1bc	28,4abc	29,4ab	0,5	0,003	<,0001	0,497
sO ₂ , %	57,7	57,1	50,5	55,7	0,85	56,8	53,6	57,9	54,2	53,7	1,9	0,115	0,717	0,788

^{a-d} Médias acompanhadas por letras distintas em cada linha são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

¹ Forragem: Concentrado: 7,75:92,25.

² CTR = controle (sem adição de aditivos alimentares), OF = óleo funcionais (mistura de óleo de mamona e líquido da casca de caju fornecido a 400 mg/kg), M30 = Monensina fornecida a 30 mg/kg, e M40 = Monensina fornecida a 40 mg/kg.

VGS = Volume globular sanguíneo; pCO₂ = Pressão parcial de gás carbônico; pO₂ = Pressão parcial de oxigênio; EB = Excesso de bases; HCO₃⁻ = Bicarbonato; tCO₂ = Dióxido de carbono total; sO₂ = Saturação de oxigênio

Tabela 11. Expressão relativa de *F. Succinogenes*, *S. bovis* e *M. elsdenii* em relação ao tratamento controle e contagem de protozoários ciliados ($\times 10^4$ / mL) de novilhos Nelore recebendo dieta com elevada proporção de concentrado¹ fornecida de forma abrupta com o uso de diferentes aditivos alimentares.

	Tratamento ²				EPM	P-valor		
	CTR	OF	M30	M40		Trat	Dia	Trat*Dia
Mudanças na população ³								
<i>F. succinogenes</i>	1,0	1,3	0,7	1,3	0,22	0,465	<,0001	0,804
<i>S. bovis</i>	1,0	0,8	1,2	1,1	0,04	0,781	<,0001	0,992
<i>M. elsdenii</i>	1,0	1,0	0,9	0,8	0,29	0,972	0,026	0,673
Gênero de protozoários								
<i>Entodinium</i>	42,81a	26,55b	13,93c	13,18c	2,17	<,0001	0,32	0,31
<i>Diplodinium</i>	2,93a	1,01b	0,44c	0,37c	0,19	<,0001	0,29	0,22
<i>Epidinium</i>	1,48a	0,42b	0,15c	0,13c	0,10	<,0001	0,47	0,11
<i>Isotricha</i>	2,00a	0,77b	0,23c	0,22c	0,13	<,0001	0,67	0,93
<i>Dasytricha</i>	1,89a	0,71b	0,21c	0,14c	0,13	<,0001	0,93	0,74
<i>Ostracodinium</i>	0,83	0,21	ND	ND	0,08	<,0001	0,19	0,061
<i>Eudiplodinium</i>	0,54	0,16	ND	ND	0,05	0,0002	0,24	0,35
<i>Enoploplastron</i>	0,25	0,14	ND	ND	0,02	0,0021	0,01	0,01
Total	52,74a	35,27b	15,00c	14,05c	3,15	<,0001	0,28	0,24

ND: Não detectado.

^{a-c} Médias acompanhadas por letras distintas em cada linha são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

¹Forragem:Concentrado: 7,75:92,25.

²CTR = controle (sem adição de aditivos alimentares), OF = óleo funcionais (mistura de óleo de mamona e líquido da casca de caju fornecido a 400 mg/kg), M30 = Monensina fornecida a 30 mg/kg, e M40 = Monensina fornecida a 40 mg/kg.

³Mudanças na população baseadas no tamanho da população em novilhos Nelore recebendo o tratamento controle (CTR).

Figura 7. Mudanças na quantidade de *F. Succinogenes* (A), *S. bovis* (B) e *M. elsdenii* (C) de novilhos Nelore recebendo dieta com elevada proporção de concentrado fornecida de forma abrupta com diferentes aditivos alimentares. Letras distintas indicam diferenças entre os dias pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

6. DISCUSSÃO

6.1 *Ingestão de matéria seca*

Acidose ruminal é caracterizada pela ingestão de carboidratos fermentescíveis em quantidades suficientes para desencadear um acúmulo anormal de ácidos no rúmen, tendo como consequência a redução do pH (NAGARAJA; TITGEMEYER, 2007). O ionóforo monensina tem sido amplamente estudado (NAGARAJA; LECHTENBERG, 2007) e descrito como tendo capacidade de regular a ingestão de alimentos e, assim agir na prevenção de distúrbios ruminais, como a acidose. Menos estudados que os ionóforos, porém com potencial de uso como aditivo alimentar, os óleos funcionais tem recebido grande interesse da comunidade científica por sua ação antimicrobiana. Estes diferem quimicamente dos óleos essenciais por não serem derivados de essenciais ou temperos (BESS et al., 2012).

A interação significativa entre tratamento e dia para a ingestão evidenciou diferentes padrões de consumo entre os tratamentos durante o período experimental. Diferenças na IMS entre os tratamentos foram mais pronunciadas na primeira semana após a transição abrupta. No d 3 a IMS apresentou redução de 24,6%, 31,6%, 42,1% e 46,3%, respectivamente para CTR, OF, M30 e M40 comparado ao d 2.

Redução na IMS de 60% no quarto dia após novilhos receberem dieta com 95% de concentrado foi observada por Burrin, Stock e Britton (1988). Os resultados do presente estudo seguem os padrões de ingestão observados por Nocek, Allman e Kautz (2002), que relataram grande variação na primeira semana após mudança da dieta. Resultados semelhantes também são descritos por estudos avaliando sistema de rápida adaptação de dieta de forragem para dieta com elevada proporção de concentrado. Bevans et al. (2005) e Burrin, Stock e Britton (1988) observaram menor IMS no segundo e quarto dia após a transição para dieta com elevada proporção de concentrado, aumentando de 65% para 90% e de 75% para 95% de concentrado, respectivamente.

No presente estudo, o fornecimento de monensina durante o período experimental diminuiu a IMS em 9% comparado ao tratamento CTR (sem adição de aditivos alimentares). A administração de monensina para bovinos de corte recebendo dietas com elevada proporção de concentrado, analisada por meta-análise, reduziu em 3,1% a

IMS em relação aos animais não suplementados (DUFFIELD; MERRILL; BAGG, 2012). Estes valores estão abaixo dos observados neste estudo. Entretanto, a particularidade dos novilhos serem adaptados de forma abrupta pode ter contribuído para esta maior redução. Níveis reduzidos de ingestão foram evidenciados nos novilhos recebendo M30 e M40, principalmente durante a primeira e segunda semanas, com aumento constante da ingestão a partir de então.

Por outro lado, os tratamentos CTR e OF não apresentaram um padrão estabelecido de ingestão, e embora a variação na ingestão seja empregada como uma ferramenta na identificação de acidose subclínica (COOPER et al., 1999), esta não foi diferente entre os tratamentos (média 0,34 kg/ d; $P = 0,38$). O fornecimento de dietas com elevada proporção de concentrado com administração de óleos funcionais (PUREVJAV et al., 2013), bem como uso de monensina e mistura de óleo essenciais (DEVANT; ANGLAD; BACH, 2007) não alteraram a IMS. Torna-se importante ressaltar que as divergências na IMS podem ser explicadas principalmente pela dose e composto(s) ativo(s) dos diferentes óleos utilizados, além da forma com que a dieta foi fornecida aos animais.

Ao final do período experimental, independente do tratamento, todos os novilhos apresentaram nível de IMS considerados satisfatórios para dietas com elevada proporção de concentrado (CHOAT et al., 2002).

6.2 Características ruminais – Horas iniciais após transição abrupta

As maiores mudanças nas variáveis ruminais ocorreram às 48 h após o fornecimento da transição abrupta, onde a maior concentração total de AGCC, maior proporção de butirato e tempo de pH abaixo de 5,6, bem como a menor proporção de acetato ruminal foi observada. Entretanto, a relação A:P apresentou menores valores 60 h após o fornecimento da transição abrupta.

Aditivos alimentares não alteraram a concentração total de AGCC durante as horas iniciais após transição abrupta. O propionato tem sido descrito por atuar na regulação da IMS (ALLEN, 2000). Dessa forma, o aumento na proporção molar de propionato (Figura 1), pode contribuir para explicar a queda na IMS observada em todos os tratamentos no d 3. A proporção de propionato foi maior que 25 mol/100 mol nos

tratamentos monensina, enquanto para CTR e OF as concentrações permaneceram entre 19 e 21 mol/100mol e entre 22,6 e 23 mol/100mol, respectivamente 30 e 60 h após a transição abrupta. A partir da análise do pH, observou-se no d 3 maior pH médio, menor tempo de pH abaixo de 5,6, bem como menor área da curva com pH abaixo de 5,6 para o tratamento M30 comparado à M40 e CTR. Como apresentado, apesar de maior pH ruminal, os novilhos recebendo M30 também apresentaram queda brusca da ingestão no terceiro dia após transição abrupta. Essa divergência, especialmente entre os novilhos recebendo monensina não era esperada e pode indicar aspectos multi-fatoriais envolvidos na redução da IMS, ou seja, o pH como fator isolado não pode ser considerado responsável pela redução da IMS (GONZÁLEZ et al., 2012).

Os aditivos alimentares não alteraram o tempo de pH abaixo de 5,6, adotado neste trabalho como indicativo de acidose subclínica (OWENS et al., 1998; BEVANS et al., 2005). Entretanto, observou-se efeito significativo da hora de coleta após a transição abrupta. O maior tempo de pH abaixo de 5,6 foi registrado 48 h após a transição (222,7 min/dia), com diminuição nas horas subsequentes, sendo registrado 128 min/dia às 60 h após transição abrupta.

Neste trabalho foram observadas grandes variações individuais dos novilhos entre tratamentos. Para exemplificar, o desvio padrão (min/dia) obtido para tempo abaixo do pH 5,6 foi 124,2, 120,6, 94,2 e 165,9 para CTR, FO, M30 e M40, respectivamente. Variações semelhantes têm sido frequentemente observada em bovinos alimentados com dietas com elevada proporção de concentrado (SCHWARTZKOPF-GENSWEIN et al., 2004). Conforme Bevans et al. (2005), essa variação individual, pode indicar diferentes graus de compensação ou tolerância dos animais à condição de acidose, fator importante que precisa ser mais bem entendido.

6.3 Características ruminais – Avaliação do período experimental

A produção total de AGCC é um resultado direto da composição da dieta e do nível de ingestão (ASCHENBACH et al., 2011). Neste estudo, o fornecimento de M40 reduziu em média 9,9% a concentração total de AGCC comparado à CTR e M30, diminuiu a proporção molar de butirato, bem como a concentração de lactato e a osmolaridade ruminal em relação ao CTR, porém a relação A:P foi semelhante dentre os tratamentos.

O tratamento M30 além da maior concentração total de AGCC comparado ao M40, apresentou redução significativa de 18% na relação A:P comparado ao CTR. Ambos os tratamentos com monensina não reduziram a proporção molar de acetato comparado ao CTR. A capacidade de a monensina alterar o perfil de AGCC, via aumento da produção de propionato e redução da proporção molar de butirato e acetato tem sido relatada na literatura (BURRIN; BRITTON, 1986; DUFFIELD, MERRILL e BAGG, 2012). Doses crescentes de monensina para bovinos confinados recebendo dieta com elevada proporção de concentrado resultaram em aumentos de propionato, pouca variação na concentração de acetato, com as maiores variações observadas na concentração de butirato (ELLIS et al., 2012). Resultados similares ao do presente experimento com menor proporção molar de butirato no tratamento M40 e a ausência de alteração na proporção molar de acetato entre os tratamentos. A diferença na concentração total de AGCC entre as diferentes concentrações de monensina pode estar ligada ao efeito de dose dependente (ELLIS et al., 2012), bem como na quantidade da dieta ingerida.

O uso de óleos funcionais não alterou significativamente o metabolismo ruminal, com excessão da menor concentração de lactato ruminal comparado à dieta CTR. De forma similar, Devant, Anglad e Bach (2007) não observaram efeito na concentração de acetato e isovalerato, quando touros receberam monensina (32 mg/kg) ou uma mistura de óleos essenciais (2800 mg/kg) em relação ao controle (sem aditivos alimentares). Porém, menor relação A:P do rúmen foi observada para os animais recebendo aditivos alimentares. Outros estudos utilizando o líquido da casca de caju *in vitro* (Watanabe et al., 2010) e *in vivo* (Mitsumori et al., 2014) descreveram queda no acetato e butirato ruminal, com aumento do propionato. De forma contrária, o fornecimento de OF neste estudo não alterou a proporção molar de acetato, propionato e butirato comparado ao tratamento CTR.

Fandiño et al. (2008) relatam redução da proporção molar de butirato com o uso de monensina (238 mg/d), porém sem efeito para óleo essencial (Anise, 500 mg/d) comparado ao controle sem aditivos. Resultados de meta-análise, no entanto, indicaram que doses de óleos essenciais abaixo de 0,02% e acima de 0,05%, reduziram em 5,6% a proporção de butirato em relação ao controle (KHIAOSA-ARD; ZEBELI, 2013). Estes

resultados são similares aos desta pesquisa, onde a dose de 0,04% de óleos funcionais não apresentou diferença significativa em relação ao CTR.

Monensina e óleos essenciais foram apresentados como aditivos com capacidade de diminuir a produção de amônia ruminal, tanto *in vitro* como *in vivo* (YANG; RUSSEL, 1993; CASTILLEJOS et al., 2008). Entretanto, a concentração ruminal de amônia neste estudo não foi afetada pelos tratamentos (média de 28,2 mg/dL). McIntosh et al. (2003) relatam que o uso de uma mistura de óleos essenciais (timol, óleo de cravo, vanilina e limoneno) reduziu a produção de amônia *in vitro*, porém o efeito desapareceu com a adição de monensina ao fluido ruminal. Óleos essenciais reduziram a concentração ruminal de amônia comparado à monensina (GERACI et al., 2012) e ao controle, sem aditivos alimentares (CARDOZO et al., 2006). Por outro lado, como observado neste estudo, monensina e óleos essenciais não alteraram a amônia ruminal em dietas com elevada proporção de concentrado (DEVANT; ANGLAD; BACH, 2007). A ausência de diferença na concentração de amônia neste estudo pode ser um indicativo da falta de ação tanto da monensina como dos óleos funcionais em inibir a atividade de deaminação das bactérias (BENCHAAAR et al., 2008). Adicionalmente, variáveis como o tipo de dieta fornecida e a duração da adaptação precisam ser levadas em consideração (CALSAMIGLIA et al., 2007).

O fornecimento de M40 resultou em menor osmolaridade em relação ao CTR, porém durante o período experimental todos os tratamentos apresentaram osmolaridade ruminal acima dos níveis descritos como ideais por Owens et al. (1998). Alta osmolaridade ruminal reduz a taxa de absorção de ácidos e, desta forma, pode agravar o problema de acidose. Owens et al. (1998) descrevem o intervalo entre 280 a 300 mOsm/L, como osmolaridade ruminal normal para animais alimentados com dietas concentradas. Osmolaridade ruminal acima da descrita como normal também foi encontrada por Steele et al. (2011) que, durante a transição da dieta com inclusão de 65% de grãos, observaram aumento da osmolaridade, a qual atingiu 327 mOsm/kg na primeira semana após a transição.

A concentração ruminal de lactato manteve-se na maior parte do período experimental abaixo de 1 mM. Apesar da interação entre tratamento e dia não ter sido significativa, houve aumento no tratamento CTR para lactato ruminal, principalmente

nos d 5 e d 10 (dados não apresentados), o que não ocorreu nos outros tratamentos. Picos de lactato ruminal foram registrados em um novilho do tratamento CTR no d 5 (2,01 mM), enquanto nos demais tratamentos a maior concentração de lactato foi observada no d 5 (1,53 mM, OF) e d 21 (1,50 mM, M30 e 1,68 mM, M40). Animais induzidos à acidose clínica e subclínica demonstraram concentrações de lactato ruminal de 48,1 mM e 17,5 mM, respectivamente (BROWN et al., 2000). Assim, os episódios de acidose subclínica ocorridos no presente estudo (pH abaixo 5,6 mais que 12 h/dia) ocorreram possivelmente devido ao acúmulo de AGCC, e não ao excesso de lactato (COE et al., 1999, BEVANS et al., 2005).

Óleos essenciais são descritos como alternativas ao uso de antibióticos promotores de crescimento na indústria da produção animal (CALSAMIGLIA et al., 2007). Em meta-análise de diferentes compostos bioativos de óleos essenciais utilizados em diferentes dosagens observou-se que estes aditivos aumentaram o propionato em detrimento do acetato, sem, no entanto, reduzir a concentração total de AGCC (KHIAOSA-ARD; ZEBELI, 2013). Em contrapartida, os óleos essenciais e funcionais variam quanto ao potencial de alterar a fermentação e população microbiana ruminal (PATRA; YU, 2012).

No presente estudo, os óleos funcionais não alteraram de forma marcante as variáveis de fermentação ruminal e, apesar de reduzirem a concentração de lactato do rúmen, não foram observados efeitos na concentração de N-amoniacal, AGCC e no pH do rúmen. O uso de óleos funcionais (mistura dos óleos de mamona e líquido da casca de caju) apresentou o potencial de substituição dos ionóforos quando avaliado o desempenho de bovinos confinados (PUREVJAV et al., 2013) e a concentração total de AGCC (Watanabe et al., 2010). Infelizmente, ainda há um número restrito de pesquisas que estudaram a função ruminal dos óleos de mamona e líquido da casca de caju, apesar do efeito antimicrobiano da mistura destes óleos ter sido comprovada em frangos de corte (BESS et al., 2012).

6.4 pH do rúmen

Apesar de mudanças na proporção molar de propionato, butirato e relação A:P nas horas iniciais após a transição abrupta (Tabela 5), estas não alteraram o pH médio e nem o tempo de pH abaixo de 5,6.

Os tratamentos apresentaram diferentes valores de pH médios diários ao longo do período experimental. O pH ruminal médio entre os tratamentos foi 5,78, com pH mínimo de 5,21 e pH máximo de 6,49. Estes resultados são intermediários ao pH médio ruminal de 5,64 (MEYER et al., 2009) e 5,93 (VAKILI et al., 2013) encontrados para bovinos recebendo dieta com elevada proporção de concentrado.

O tempo abaixo de certo limite de pH é uma importante ferramenta de auxílio na caracterização da prevalência de acidose ruminal. A redução do pH ruminal entre 5,6 e 5,2, bem como abaixo do pH 5,2 por um período de tempo maior que 12 e 6 horas/dia tem sido adotado como critério para definir acidose subclínica e clínica, respectivamente (OWENS et al., 1998, BEVANS et al., 2005).

De acordo com os critérios apresentados, e a média do tempo de pH abaixo de 5,6, nenhum tratamento deste estudo apresentou episódios de acidose subclínica. Entretanto, ao longo dos dois períodos experimentais (42 dias) em que o pH do rúmen foi constantemente monitorado, todos os seis animais do tratamento CTR tiveram o tempo de pH abaixo de 5,6 por mais de 12 h por pelo menos um dia. Os demais tratamentos tiveram cinco animais cada com tempo de pH abaixo de 5,6 por mais de 12 h. Na média, estes animais apresentaram 16,03 hora/dia, 16,40 hora/dia, 16,98 hora/dia e 18,65 hora/dia com tempo de pH abaixo de 5,6 para M40, M30, OF e CTR, respectivamente (dados não apresentados).

No tempo de pH abaixo de 5,6 e de 5,2 houve apenas efeito de dia após a transição abrupta (Tabela 7). Neste estudo, novilhos ingerindo dieta com elevada proporção de concentrado de forma abrupta apresentaram o maior tempo de pH abaixo de 5,6 no d 10 (13 horas ou 54,1% de um período de 24 horas). Embora, o maior tempo de pH abaixo de 5,2 foi registrado mais tarde, no d 15 (4,74 horas ou 19,7% de um período de 24 horas).

O pH abaixo de 5,2 pode desencadear aumento de lipopolíssacarídeos liberados pela lise de bactérias gram-negativas e, assim, desencadear respostas inflamatórias devido ao dano ocorrido no tecido do epitélio ruminal (NAGARAJA, 2012).

Os efeitos positivos do fornecimento de monensina sobre a fermentação ruminal e na redução de ocorrências de acidose foram descrito por Burrin; Stock; Britton (1988) e Nagaraja; Lechtenberg (2007). No entanto, os níveis de monensina utilizados no

presente estudo não apresentaram efeito sobre o tempo e área abaixo pH 5,6 e 5,2. Da mesma forma, Meyer et al. (2009) não observaram efeito do uso de monensina no pH ruminal médio, tempo e área abaixo pH 5,3. Inicialmente, o uso da monensina atuou na manutenção do pH ruminal (TOWNE et al., 1990), mas seu uso prolongado (GUAN et al., 2006, 16 semanas e TOWNE et al., 1990, 17 semanas) não apresentou efeito no pH do rúmen.

A transição abrupta claramente submeteu os novilhos à experiência de acidose subclínica. Nesta condição de fornecimento da dieta, os dias após a transição abrupta foram mais determinantes ($P < 0,0001$) para todas as variáveis de pH ruminal, do que os tratamentos ($P > 0,05$).

6.5 Comportamento animal

O uso de aditivos alimentares em dietas com elevada proporção de concentrado tem como objetivo prevenir a ocorrência de distúrbios ruminais, pelo efeito direto sobre o fluido ruminal (mudanças na população microbiana) ou indiretamente, alterando o comportamento ingestivo (GONZÁLEZ et al., 2012).

Neste estudo, os aditivos alimentares, monensina e óleos funcionais adicionados à dieta com elevada proporção de concentrado fornecida de forma abrupta não alteraram o comportamento ingestivo. A monensina é descrita com capacidade de regular a IMS, pelo aumento da frequência e do tempo total de ingestão durante o dia. Entretanto, os resultados observados neste trabalho corroboram os resultados de Erickson et al. (2003), que avaliaram diferentes concentrações de monensina (0, 36,7 e 48,9 mg/kg), e Meyer et al. (2009), que compararam os efeitos de monensina, óleos essenciais e dieta controle sobre o comportamento ingestivo. Ambos, não encontraram diferenças significativas no tempo de ingestão e número de refeições por dia pelo uso de aditivos alimentares.

No início, novilhos gastaram maior tempo ingerindo (duração *head-down*) com maior frequência diária, o que refletiu em uma taxa de ingestão considerada intermediária (51,63 g MS/min). Entretanto, no terceiro dia recebendo dieta com elevada proporção de concentrado os animais reduziram a duração e frequência de ingestão, sem, no entanto, alterar a taxa de ingestão comparada ao primeiro dia, quando a

transição abrupta ocorreu. Após 20 dias recebendo elevada proporção de concentrado foram observadas menor duração e frequência quando comparadas à fase inicial. Embora tenha ocorrido um aumento na taxa de ingestão no d 20 (80,5 g MS/min) comparado ao d 3 (46,5 g MS/min), esse aumento não diferiu da taxa de ingestão observada no d 1 (51,6 g MS/min). Redução no tempo gasto ingerindo, somada a menor frequência por dia, resultou em maior taxa de ingestão, a qual está relacionada ao aumento na IMS observado ao longo do período experimental. Esta mudança no comportamento ingestivo é um indicativo da adaptação dos animais à dieta ao final do período experimental (Figura 6).

Diferenças entre os dias após transição abrupta eram esperados para as atividades de ingestão e ruminação. No entanto, exceto a atividade de ingestão de água, nenhuma atividade comportamental foi alterada ($P \geq 0,05$) ao longo dos dias de observação comportamental. A atividade de ruminação foi avaliada de acordo com a postura do animal, pois, conforme González et al. (2009), o tempo ruminando em pé pode ser um indicativo de comportamento anormal e tem sido associado à ocorrência de acidose. Entretanto, não foram observadas diferenças entre os tratamentos na atividade de ruminação (em pé e deitado), onde os animais apresentaram maior atividade de ruminação deitados do que em pé. De forma geral, novilhos gastaram 12,62% do tempo diário com a atividade de ruminação (deitado e em pé). De acordo com Krause, Combs e Beauchemin (2002), com a redução no tamanho de partícula da dieta, menor tempo de mastigação e ruminação são esperados. Considerando essas informações e a elevada proporção de concentrado utilizada neste estudo (92,25%), o tempo de ruminação foi menor que 23,45% observado em bovinos confinados por González et al. (2009). A ingestão de água foi alterada ao longo dos dias após transição abrupta, com maior tempo gasto bebendo no d 2 em relação ao d 3, período no qual foram registradas altas concentrações de AGCC no rúmen, conforme discutido acima. Maior ingestão de água tem sido associada a episódios de acidose ruminal em vacas lactantes (COTTEE et al., 2004) e ovelhas (COMMUN et al., 2012).

6.6 Metabólitos sanguíneos

O pH do sangue não foi alterado entre os tratamentos, mas diminuiu ao longo dos dias após a transição abrupta (pH 7,418 vs pH 7,391, no d2 e d 21, respectivamente). Vale ressaltar que, apesar disso, o pH sanguíneo permaneceu acima de 7,350, descrito por Radostits et al. (2007) como o limite fisiológico para a caracterização de acidose. Segundo Owens et al. (1998), a queda do pH sanguíneo pode ser em virtude da produção excessiva de ácidos, bem como da insuficiência na sua remoção. A dinâmica das variáveis sanguíneas durante a ocorrência de acidose tem sido estudada por vários autores. Krehbiel et al. (1995) não observaram diferenças nas concentrações de lactato, bicarbonato e pCO_2 sanguíneos em cordeiros experimentalmente induzidos à acidose pela crescente infusão intraruminal de glicose. O fornecimento de M30 aumentou pCO_2 comparado ao CTR, sem diferenças nos tratamentos M40 e OF. A pCO_2 aumentou entre o d 10 e 21 comparado ao d 2 após transição abrupta. Aumento da pCO_2 sanguínea tem sido observada em animais sob condições de acidose subclínica (MORGANTE et al., 2009; LI et al., 2012).

Novilhos recebendo o tratamento CTR apresentaram menor excesso de base, bicarbonato e concentração total de CO_2 comparados com os animais recebendo aditivos alimentares. Essas variáveis sanguíneas são utilizadas como indicadores do estado ácido-básico do animal (RADOSTITS et al., 2007). Os resultados do presente experimento corroboram com aqueles apresentados por Brown et al. (2000). Estes autores observaram que bovinos acidóticos apresentaram menor bicarbonato, excesso de bases e concentração total de CO_2 , bem como menor pH sanguíneo.

Conforme Owens et al. (1998), durante acidose clínica a alta pressão osmótica puxa o fluido do sangue em direção ao rúmen e conseqüentemente ocorre um aumento da osmolaridade e volume globular sanguíneo. A transição da dieta de forragem para elevada proporção de concentrado não alterou o pH e VGS (LI et al., 2012). No presente estudo, o VGS e osmolaridade também não diferiram entre os tratamentos. Apesar de não serem observados efeitos de tratamentos para VGS, pH e osmolaridade, os animais do tratamento CTR apresentaram maior propensão à ocorrência de desbalanço no sistema ácido-básico do sangue.

6.7 Microrganismos ruminais

Descrita como bactéria anaeróbia gram-negativa, *Fibrobacter succinogenes* é conhecida como um dos principais microrganismos com atividade celulolítica do rúmen (WEIMER, 1993). Em contrapartida, *Streptococcus bovis* é tida como a principal bactéria envolvida na ocorrência de acidose ruminal, principalmente, pela alta capacidade de multiplicação quando grandes quantidades de amido estão disponíveis, o que leva ao aumento da produção de lactato no ambiente ruminal (RUSSELL; HINO, 1985). Já *Megasphaera elsdenii* caracteriza-se como bactéria utilizadora de lactato com maior importância no rúmen, além de competir por substratos de glicose e maltose com as bactérias produtoras de lactato (HENNING et al., 2010).

Estudos conduzidos *in vitro* demonstraram a seletividade do líquido da casca de caju, um dos principais componentes dos óleos funcionais, contra bactérias ruminais gram-positivas (WATANABE et al., 2010).

Diferentes concentrações de monensina e o uso de óleos funcionais não alteraram significativamente a expressão relativa das bactérias ruminais (*F. Succinogenes*, *S. bovis* e *M. elsdenii*). *Fibrobacter succinogenes* apresentou-se 64,9 vezes menos expresso em novilhos alimentados com dieta de elevada proporção de concentrado comparada à ingestão de feno (d-1), e 5,73 vezes menos expresso durante o período de fornecimento da dieta com elevada proporção de concentrado (d 2 a d 21). A transição abrupta de forragem para elevada proporção de concentrado em ovinos também resultou em redução das bactérias celulolíticas (GRUBB; DEHORITY, 1975). Dietas de animais em confinamento, caracterizadas por elevada proporção de concentrado, reduzem o pH ruminal, criando um ambiente menos favorável às populações de bactérias celulolíticas (PETRI et al., 2012).

O período de fornecimento da dieta com elevada proporção de concentrado reduziu em 11,9 vezes a expressão relativa de *Streptococcus bovis*, e aumentou em 10 vezes a expressão relativa da *Megasphaera elsdenii*.

Ao longo do período experimental foi observado aumento na IMS, e consequentemente um aumento na quantidade de carboidratos fermentescíveis ingerida. *Streptococcus bovis* predominam sob condições de acidose, o que comprova a tolerância desta espécie em se proliferar mesmo em condições de baixo pH do rúmen

(PETRI et al., 2013). Com isso, esperava-se crescimento na população ao longo dos dias após transição abrupta, embora fosse observada uma redução desta. No período inicial da adaptação gradual à dieta com elevada proporção de concentrado, *Streptococcus bovis* dobrou sua população, mas uma diminuição da população foi observada ao final do período (FERNANDO et al., 2010). Os mesmos autores também relatam diminuição da população de *Fibrobacter succinogens* e aumento de *Megasphaera elsdenii* conforme os animais foram adaptados à dieta com elevada proporção de concentrado.

Conforme apresentado, a concentração de lactato ruminal em todos os tratamentos ao longo do período experimental permaneceu abaixo de 3 mM, indicando que o acúmulo deste metabólito não ocorreu neste estudo. Assim, o maior tempo abaixo do pH 5,2 (usado como indicador de acidose clínica) ocorrido no d 10 (227,8 min/dia) foi causa do aumento da maior produção de AGCC.

Conforme discutido, as baixas concentrações de lactato ruminal indicam que o acúmulo de AGCC pode ter sido o principal fator para redução do pH do rúmen. Assim a população de *Streptococcus bovis*, que tem como principal produto final a produção de lactato, teve pouca influência na fermentação ruminal. Concomitantemente, o aumento da população de *M. elsdenii* ao longo do período experimental pode ter contribuído para a competição por glicose e açúcares com *Streptococcus bovis* remanescentes no rúmen (MAROUNE; BARTOS, 1987), o que pode explicar o aumento da concentração de propionato conforme os animais foram adaptados à dieta ao longo do período experimental (Figura 4a).

O gênero *Entodinium* pode representar mais de 90% dos protozoários encontrados no rúmen durante adaptação à dieta com elevada proporção de concentrado (BROWN; PONCE; PULIKANTI, 2006). De fato, o gênero mais abundante encontrado foi o *Entodinium*, correspondente à 81,1% para o tratamento CTR, 75,2% para OF, 92,8% para M30 e 93,8% para M40. O gênero *Entodinium* correspondeu a 91,1% do total de protozoários quando fornecida dieta com 70% de concentrado e monensina (33 mg/kg) para animais confinados (GUAN et al., 2006).

Neste estudo, o fornecimento de monensina, tanto M30 quanto M40, apresentou efeito anti-protozoário mais evidente do que OF. Os óleos funcionais, por sua vez,

diminuíram em 33% a contagem total de protozoários em relação ao CTR. Redução na contagem de Entodiniomorfos, holotrichia e na concentração total de protozoários ciliados foram também encontradas por Ando et al. (2003) e Fandiño et al. (2008), quando menta peperita e óleo de erva-doce foram utilizados, respectivamente. De forma contrária, conforme Newbold et al. (2004), a mistura de óleos essenciais (thymol, guajacol e limonene) não alterou a contagem de protozoários.

Grande variabilidade de resultados correspondente aos efeitos dos óleos funcionais e essenciais na contagem de protozoários pode ser observada na literatura. O mecanismo de ação destes compostos sobre a redução de protozoários ainda não é totalmente compreendido. Porém, a natureza lipofílica destes óleos parece facilitar a entrada na membrana dos protozoários. As particularidades quanto à estrutura química e as propriedades de cada componente dos óleos (PATRA; YU, 2012), associadas à dose utilizada (KHIAOSA-ARD; ZEBELI, 2013), contribuem para as divergências nos resultados entre os estudos científicos.

7. CONCLUSÕES

O aumento da concentração de monensina para 40 mg/kg e a inclusão de óleos funcionais não resultaram em melhoria expressiva no ambiente ruminal diante da situação desafiadora da dieta. Porém, o uso de 30 mg/kg de monensina resultou em maior estabilidade das características ruminais, principalmente na primeira semana de fornecimento da dieta com elevada proporção de concentrado.

Os aditivos alimentares utilizados em dietas com elevada proporção de concentrado fornecidas de forma abrupta agiram de forma distinta na redução da acidose subclínica. Entretanto, esta não foi absolutamente controlada e, dessa forma, a transição abrupta para animais zebuínos não adaptados continua sendo um desafio que precisa ser mais bem entendido.

O emprego de óleos funcionais como aditivo alimentar em dietas de confinamento, sob condições menos adversas ao ambiente ruminal, parece promissor e precisa ser mais investigado.

8. REFERÊNCIAS

- ANDO, S. et al. Effect of peppermint feeding on the digestibility, ruminal fermentation and protozoa. **Livestock Production Science**, v. 82, p. 245-248, 2003.
- ALLEN, M. S. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 1447-1462, 1997.
- ALLEN, M.S. Effects of Diet on Short-Term Regulation of Feed Intake by Lactating Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1598-1624, 2000.
- ANUALPEC. 2011. **Anuário da Pecuária Brasileira**. 1ª ed. Instituto FNP e Agra Pesquisas Ltda., São Paulo, Brasil.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15th ed. Arlington: 1990. 1117 p.
- ARRIGONI, M. B. et al. Aditivos para bovinos de corte. In: BITTAR, C.M.M.; SANTOS, F.A.P. (Eds.). **Anais do 9º Simpósio sobre Nutrição de Bovinos**. FEALQ: Piracicaba/SP. 2011. v. 9, p. 461-495.
- ASCHENBACH, J. et al. Ruminant Nutrition Symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. **Journal of Animal Science**, v. 89, p.1092-1107, 2011.
- BEAUCHEMIN, K. A. et al. Salivary secretion during meals in lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**. v.91, p.2077–2081, 2008.
- BENCHAAR, C. et al. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. **Animal Feed Science and Technology**, v.145, p.209-228, 2008.
- BESS, F. et al. The effects of functional oils on broiler diets of varying energy levels. **The Journal of Applied Poultry Research**, v.21, p.567-578, 2012.
- BEVANS, D. et al. Effect of rapid or gradual grain adaptation on subacute acidosis and feed intake by feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v.83, p.1116-1132, 2005.
- BINGHAM, G. et al. Relationship between feeding behaviour and residual feed intake in growing Brangus heifers. **Journal of Animal Science**, v.87, p.2685-2689, 2009.
- BROWN, M. et al. Evaluation of models of acute and subacute acidosis on dry matter intake, ruminal fermentation, blood chemistry, and endocrine profiles of beef steers. **Journal of Animal Science**, v.78, p.3155-3168, 2000.
- BROWN, M.; PONCE, C.; PULIKANTI, R. Adaptation of beef cattle to high-concentrate diets: Performance and ruminal metabolism. **Journal of Animal Science**, v.84, p.E25 - E33, 2006.

BURRIN, D.; BRITTON, R. Response to monensin in cattle during subacute acidosis. **Journal of Animal Science**, v.63, p.888-893, 1986.

BURRIN, D.; STOCK, R.; BRITTON, R. Monensin level during grain adaption and finishing performance in cattle. **Journal of Animal Science**, v.66, p.513-521, 1988.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223-253, 2004.

CALSAMIGLIA, S. et al. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v.90, p. 2580–2595, 2007.

CALSAMIGLIA, S. et al. Is subacute ruminal acidosis a pH related problem? Causes and tolos for its control. **Animal Feed Science and Technology**, v.172, p.42– 50, 2012.

CASTILLEJOS, L. et al. *In vitro* evaluation of effects of ten essential oils at three doses on ruminal fermentation of high concentrate feedlot-type diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p.259-270, 2008.

CARDOZO, P.W. et al. Effects of alfalfa extract, anise, capsicum, and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers fed a high-concentrate diet. **Journal of Animal Science**, v.84, p.2801-2808, 2006.

CHOAT, W.T. et al. Effects of restricted versus conventional dietary adaptation on feedlot performance carcass characteristics, site and extent of digestion, digesta kinetics, and ruminal metabolism. **Journal of Animal Science**, v.80, p.2726-2739, 2002.

COE, M.L. et al. Effect of virginiamycin on ruminal fermentation in cattle during adaptation to a high concentrate diet and during an induced acidosis. **Journal of Animal Science**, v.77, p.2259-2268, 1999.

COMMUN, L. et al. Behavioural adaptations of sheep to repeated acidosis challenges and effect of yeast supplementation. **Animal**, v.6, p.2011-2022, 2012.

CONEGLIAN, S.M. **Uso de óleos essenciais de mamona e caju em dietas de bovinos**. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009. 100p.

COOPER, R.J. et al. Effects of imposed feed intake variation on acidosis and performance of finishing steers. **Journal of Animal Science**, v.77, p.1093-1099, 1999.

COOPRIDER, K. et al. Feedlot efficiency implications on greenhouse gas emissions and sustainability. **Journal of Animal Science**, v.89, p.2643-2656, 2011.

COTTEE, G. et al. The effects of subacute ruminal acidosis on sodium bicarbonate-supplemented water intake for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.2248-2253, 2004.

COUNOTTE, G.; PRINS, R.; JANSSEN, R. Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of DL-[2-13C] lactate in the rumen of dairy cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v.42, p.649-655, 1981.

DEHORITY, B. A. **Rumen microbiology**. Nottingham University Press Nottingham, UK, 2003.

DEVANT, M.; ANGLAD, A.; BACH, A. Effects of plant extract supplementation on rumen fermentation and metabolism in young Holstein bulls consuming high levels of concentrate. **Animal Feed Science and Technology**, v.137, p.46–57, 2007.

DORMAN, H.; DEANS, S. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.308-316, 2000.

DUFFIELD, T.F., MERRILL, J.K., BAGG, R.N. Meta-analysis of the effects of monensin in beef cattle on feed efficiency, body weight gain, and dry matter intake. **Journal of Animal Science**, v.90, p.4583-4592, 2012.

DUFFIELD, T.; RABIEE, A.R.; LEAN, I.J. Meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 1. Metabolic effects. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.1334-1346, 2008.

ELLIS, J. L. et al. Quantifying the effect of monensin dose on the rumen volatile fatty acid profile in high-grain-fed beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.90, p.2717-2726, 2012.

ERICKSON, G.E. et al. Interaction between bunk management and monensin concentration on finishing performance, feeding behavior, and ruminal metabolism during an acidosis challenge with feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v.81, p.2869-2879, 2003.

FALEIRO, A.G. et al. Performance, ruminal changes, behaviour and welfare of growing heifers fed a concentrate diet with or without barley straw. **Animal**, v.5, p.294–303, 2011.

FAO. Food and Agricultural Organization. **How to Feed the World in 2050**. Disponível em: http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf. 2009. Acesso em: 19 jun. 2013.

FANDIÑO, I. et al. Anise and capsicum as alternatives to monensin to modify rumen fermentation in beef heifers fed a high concentrate diet. **Animal Feed Science and Technology**, v.145, p.409-417, 2008.

FERNANDO, S. et al. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p.7482-7490, 2010.

GALYEAN, M.; ENG, K. Application of research findings and summary of research needs: Bud Britton Memorial Symposium on Metabolic Disorders of Feedlot Cattle. **Journal of Animal Science**, v.76, p.323-327, 1998.

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

GERACI, J.I. et al. Plant extracts containing cinnamaldehyde, eugenol and capsicum oleoresin added to feedlot cattle diets: Ruminal environment, short term intake pattern and animal performance. **Animal Feed Science and Technology**, v.176, p.123-130, 2012.

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

GONZÁLEZ, L. A. et al. Intake, water consumption, ruminal fermentation, and stress response of beef heifers fed after different lengths of delays in the daily feed delivery time. **Journal of Animal Science**, v.87, p.2709-2718, 2009.

GONZÁLEZ, L.A. et al. Ruminal acidosis in feedlot cattle: Interplay between feed ingredients, rumen function and feeding behavior (a review). **Animal Feed Science and Technology**, v.72, p.66-79, 2012.

GOZHO, G. et al. Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.1399-1403, 2005.

GRUBB, J.A.; DEHORITY, B. A. Effects of an abrupt change in ration from all roughage to high concentrate upon rumen microbial numbers in sheep. **Applied microbiology**, v.30, p.404-412, 1975.

GUAN, H. et al. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. **Journal of Animal Science**, v.84, p.1896-1906, 2006.

HENNING, P. H. et al. The potential of *Megasphaera elsdenii* isolates to control ruminal acidosis. **Animal Feed Science and Technology**, v.157, p.13-19, 2010.

HIMEJIMA, M.; KUBO, I. Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale* (*Anacardiaceae*) nut shell oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, p.418-421, 1991.

HRISTOV, A. et al. Fermentation characteristics and ruminal ciliate protozoal populations in cattle fed medium-or high-concentrate barley-based diets. **Journal of Animal Science**, v.79, p.515-524, 2001.

IBGE. 2010. *Censo Agropecuário*. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/>. Acesso em: 19 jul 2012.

KHAFIPOUR, E.; KRAUSE, D.; PLAIZIER, J. A grain-based subacute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.1060-1070, 2009.

KHIAOSA-ARD, R; ZEBELI, Q. Meta-analysis of the effects of essential oils and their bioactive compounds on rumen fermentation characteristics and feed efficiency in ruminants. **Journal of Animal Science**, v.91, p.1819–1830, 2013.

KLIEVE, A.V. et al. Establishing populations of *Megasphaera elsdenii* YE 34 and *Butyrivibrio fibrisolvens* YE 44 in the rumen of cattle fed high grain diets. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.621-630, 2003.

KOIKE, S.; KOBAYASHI, Y. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. **FEMS Microbiology Letters**. v.204, p.361-366, 2001.

KRAUSE, K. M.; COMBS, D. K.; BEAUCHEMIN, K. A. Effects of forage particle size and grain fermentability in midlactation cows. II. Ruminal pH and chewing activity. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.1947-1957, 2002.

KREHBIEL, C. R. et al. The effects of ruminal acidosis on volatile fatty acid absorption and plasma activities of pancreatic enzymes in lambs. **Journal of animal science**, v.73, p.3111-3121, 1995.

LI, S. et al. Evaluation of diagnostic measures for subacute ruminal acidosis in dairy cows. **Canadian Journal of Animal Science**, v.92, p.353-364, 2012.

LIVAK, K.J.; T.D. SCHMITTGEN. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 (Delta C method). **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

LOYOLA, V.R; PAILE, B.J.A. Utilização de aditivos em rações de bovinos: Aspectos regulatórios e de segurança alimentar. In: BITTAR, C.M.M. et al. (ed.). **Anais 8º Simpósio sobre nutrição de bovinos - Minerais e aditivos para bovinos**. FEALQ: Piracicaba/SP. 2006, p.213-224.

MAEDA, H. et al. Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *tetQ* gene and total bacteria. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v.39, p.81-86, 2003.

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

MAROUNEK, M.; PETR, O.; SIMUNEK, J. Monensin has no effect on growth and metabolism of *Megasphaera elsdenii*. **Folia Microbiologica**, v.38, p.383-386, 1993.

McALLISTER, T.A. et al. Digestion of barley, maize, and wheat by selected species of ruminal bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.3146-3153, 1990.

MCINTOSH, F.M. et al. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.5011–5014, 2003.

MEYER, N. F. et al. Effect of essential oils, tylosin, and monensin on finishing steer performance, carcass characteristics, liver abscesses, ruminal fermentation, and digestibility. **Journal of Animal Science**, v.87, p.2346-2354, 2009.

MILLEN, D. D. et al. A snapshot of management practices and nutritional recommendations used by feedlot nutritionists in Brazil. **Journal of Animal Science**, v.87, p.3427, 2009.

MILLEN, D. D. et al. Current outlook and future perspectives of beef production in Brazil. **Animal Frontiers**, v.1, p.46-52, 2011.

MILLER, K.; VAN BIBBER, C.; DROUILLARD, J. Accelerated step-up regimes for feedlot heifers following oral dosing with Lactipro (*Megasphaera elsdenii* strain NCIMB 41125). **K-State Research Exchange**, Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service, 2012.

MITSUMORI, M. et al. Effect of cashew nut shell liquid on metabolic hydrogen flow on bovine rumen fermentation. **Animal Science Journal**, v.85, p.225-232, 2014.

MORAIS, J. A; BERCHIELLI, T.T; REIS, R.A. Aditivos. In: Telma T. Berchielli; Alexandre Vaz Pires; Simone Gisele de Oliveira. (Org.). **Nutrição de Ruminantes**. 2 ed. Jaboticabal - SP: FUNEP, 2011, v.1, p.565-591.

MORGANTE, M. et al. Blood gas analyses, ruminal and blood pH, urine and faecal pH in dairy cows during subacute ruminal acidosis. **Comparative Clinical Pathology**, v.18, p.229-232, 2009.

NAGARAJA, T.G et al. Effect of lasalocid, monensin and thiopeptin on lactate production from in vitro rumen fermentation of starch. **Canadian Journal of Animal Science**, v.66, p.129-139, 1986.

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

NAGARAJA, T.G; TITGEMEYER, E. Ruminal Acidosis in Beef Cattle: The Current Microbiological and Nutritional Outlook1 and 2. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.E17-E38, 2007.

NAGARAJA, T. G. Microbiologist's View on Improving Nutrient Utilization in Ruminants. In: **23^o Florida Ruminant Nutrition Symposium**, Florida, EUA, 2012.

NEWBOLD, C. J.; CHAMBERLAIN, D. G.; WILLIAMS, A. G. The effects of defaunation on the metabolism of lactic acid in the rumen. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.37, p.1083-1090, 1986.

NEWBOLD, C. J. et al. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v.114, p.105-112, 2004.

NOCEK, J. E. Bovine acidosis: implications on laminitis. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.1005-1028, 1997.

NOCEK, J.E.; ALLMAN, J.G.; KAUTZ, W.P. Evaluation of an Indwelling Ruminal Probe Methodology and Effect of Grain Level on Diurnal pH Variation in Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.422-428, 2002.

OUWERKERK, D.; KLIEVE, A. V.; FORSTER, R. J. Enumeration of *Megasphaera elsdenii* in rumen contents by real-time Taq nuclease assay. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p.753-758, 2002.

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

OWENS, F. Adaptação de gado confinado a dietas ricas em grãos: distúrbios metabólicos e desempenho. In: SANTOS, F.A.P.; MOURA, J.C.; FARIA, V.P. (Eds). **Anais do 6º Simpósio sobre bovinocultura de corte**. FEALQ: Piracicaba/SP, 2007. p.221-235

PATRA, A.K.; YU; Z. Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of, rumen microbial populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, p.4271-4280, 2012.

PENNER, G. B., K. A. BEAUCHEMIN, e T. MUTSVANGWA. An evaluation of the accuracy and precision of a stand-alone submersible continuous ruminal pH measurement system. **Journal of Dairy Science**. v.89, p.2132–2140, 2006.

PETRI, R. M. et al. Characterization of rumen bacterial diversity and fermentation parameters in concentrate fed cattle with and without forage. **Journal of Applied Microbiology**, v.112, p.1152-1162, 2012.

PETRI, R.M. et al. Characterization of the Core Rumen Microbiome in Cattle during Transition from Forage to Concentrate as Well as during and after an Acidotic Challenge. **PloS One**, v. 8, p.e83424, 2013.

PLAIZIER, J. et al. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. **The Veterinary Journal**, v.176, p.21-31, 2008.

PLAIZIER, J.C. et al. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. **The Veterinary Journal**, v.176, p.21–31, 2009.

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

PUREVJAV, T et al. Effects of functional oils and monensin on cattle finishing programs. **Professional Animal Scientist**, v.29, p.426-434, 2013.

RADOSTITS, O.M. et al. **Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 10.ed. Philadelphia: Elsevier, 2007. 2156p.

ROBLES, V. et al. Effects of feeding frequency on intake, ruminal fermentation, and feeding behavior in heifers fed high-concentrate diets. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 2538-2547, 2007.

RUSSELL, J.; HINO, T. Regulation of Lactate Production in *Streptococcus bovis*: A Spiraling Effect That Contributes to Rumen Acidosis. **Journal of Dairy Science**, v.68, p.1712-1721, 1985.

RUSSEL, J. A proposed mechanism of monensin action in inhibiting ruminal bacterial growth: effects on ion flux and proton motive force. **Journal of Animal Science**, v.64, p.1519-1525, 1987.

RUSSELL, J.; STROBEL, H. Mini-Review: The effect of ionophores on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.1-6, 1989.

RUSSEL, J. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. Ithaca, NY, 2002.

SANTOS, J.E.P. Distúrbios metabólicos. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Eds). **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal, SP: Funep, 2011. p.439-520.

SAVY FILHO, A.; BANZATTO, N.V.; BARBOZA, M.Z. Mamoneira. In: CATI (Campinas, SP). **Oleaginosas no Estado de São Paulo: análise e diagnóstico**. Campinas, p.29. 1999.

SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K. et al. Impact of bunk management on feeding behavior, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: A review. **Journal of Animal Science**, v.81, p.E149–E158, 2003.

SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K. et al. Effect of feed delivery fluctuations and feeding time on ruminal acidosis, growth performance, and feeding behavior of feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v.82, p.3357-3365, 2004.

SHOBHA, S.; RAMADOSS, C. S.; RAVINDRANATH, B. Inhibition of soybean lipoxygenase-1 by anacardic acids, cardols, and cardanols. **Journal of Natural Products**, v.57, p.1755-1757, 1994.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **SAS/STAT**. Guide of personal computers. Version 9.0. Inc., Cary, NC

STEELE, M.A. et al. Bovine rumen epithelium undergoes rapid structural adaptations during grain-induced subacute ruminal acidosis. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.300, p.1515-1523, 2011.

STEVENSON, D. M.; WEIMER, P. J. Dominance of Prevotella and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.75, p.165-174, 2007.

TOWNE, G. et al. Dynamics of ruminal ciliated protozoa in feedlot cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.3174-3178, 1990.

USDA. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**. United States Department of Agriculture, 2014.

VAKILI, A. R. et al. The effects of thyme and cinnamon essential oils on performance, rumen fermentation and blood metabolites in Holstein calves consuming high concentrate diet. **The Asian-Australasian Journal Animal Science**, v.26, p.935-944, 2013.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J.; LEWIS, B. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3583-3597, 1991.

WALKER, C.E. et al. Accelerated step-up regimen with 44 mg/kg monensin. **Annual Meeting of Animal Science**, v.88, p.296, 2010.

WANG, L.A.; GOONEWARDENE, Z. The use of MIXED models in the analysis of animal experiments with repeated measures data. **Canadian Journal of Animal Science**, v.84, p.1-11, 2004.

WATANABE, Y. et al. In vitro evaluation of cashew nut shell liquid as a methane-inhibiting and propionate-enhancing agent for ruminants. **Journal Dairy Science**, v.93, p.5258-5267, 2010.

WEIMER, P.J. Effects of dilution rate and pH on the ruminal cellulolytic bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85 in cellulose-fed continuous culture. **Archives of Microbiology**, v.160, p.288-294, 1993.

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

YANG, C.M., RUSSELL, J.B. The effect of monensin supplementation on ruminal ammonia accumulation in vivo and the numbers of amino acid-fermenting bacteria. **Journal of Animal Science**. v.71, p.3470-3476, 1993.