

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

THIAGO BRINER NETO

**Avaliação *in situ* do metabolismo ruminal de bovinos Nelore
submetidos a dietas compostas por substâncias húmicas**

Pirassununga

2019

THIAGO BRINER NETO

Avaliação *in situ* do metabolismo ruminal de bovinos Nelore submetidos a dietas compostas por substâncias húmicas

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Gestão e Inovação na Indústria Animal

Orientadora: Prof Dra. Luciane Silva Martello

Coorientadora: Prof Dra. Rosana R. P. S. Corte

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

BB858a Briner Neto, Thiago
Avaliação in situ do metabolismo ruminal de
bovinos Nelore submetidos a dietas compostas com
substâncias húmicas / Thiago Briner Neto ;
orientadora Luciane Silva Martello ; coorientadora
Rosana Ruegger Pereira da Silva Corte. --
Pirassununga, 2019.
44 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
em Mestrado Profissional Gestão e Inovação na
Indústria Animal) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Substâncias húmicas. 2. Leonardita. 3.
Canulados. 4. Gado de corte. I. Silva Martello,
Luciane, orient. II. Ruegger Pereira da Silva
Corte, Rosana, coorient. III. Título.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito de substâncias húmicas na fermentação ruminal de bovinos Nelore", protocolada sob o CEUA nº 9994130217, sob a responsabilidade de **Luciane Silva Martello e equipe; Thiago Bruner Neto** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP (CEUA/FZEA) na reunião de 12/04/2017.

We certify that the proposal "Effect of humic substances of ruminal fermentation of Nelore cattle", utilizing 8 Bovines (8 males), protocol number CEUA 9994130217, under the responsibility of **Luciane Silva Martello and team; Thiago Bruner Neto** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Animal Science and Food Engineering - (São Paulo University) (CEUA/FZEA) in the meeting of 04/12/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **03/2017 a 06/2017** Área: **Engenharia de Biosistemas**

Origem: **Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP)**

Espécie: **Bovinos** sexo: **Machos** idade: **18 a 36 meses** N: **8**
Linhagem: **Nelore** Peso: **330 a 380 kg**

Resumo: O objetivo do trabalho será avaliar o efeito da utilização de diferentes doses de substâncias húmicas na dieta de bovinos Nelore sobre o metabolismo ruminal por meio de avaliações da fermentação ruminal, degradabilidade e parâmetros sanguíneos. A pesquisa será conduzida no Departamento de Zootecnia da FZEA-USP, em Pirassununga, SP. Serão utilizados 8 bovinos com cânulas ruminais Nelore machos. Os animais serão alojados em confinamento experimental distribuído em oito balas. A alimentação será realizada diariamente com uma dieta contendo 50% de concentrado e 50% de volumoso. Os animais serão divididos aleatoriamente e alimentados com uma das seguintes dietas: A) Tratamento controle; B) Tratamento com 0,25% (dieta total) de substâncias húmicas; C) Tratamento com 0,5% (dieta total) de substâncias húmicas; D) Tratamento com 1% (dieta total) de substâncias húmicas; Todo dia as sobras serão retiradas, pesadas e amostradas para determinação da matéria seca. O delineamento experimental será em quadrado latino 4 x 4 duplo. O experimento será dividido em quatro períodos de 21 dias, sendo 14 dias de adaptação às dietas, 4 dias para o ensaio de degradabilidade ruminal e 1 dia para a coleta sanguínea. A alimentação será realizada diariamente e as sobras serão retiradas e pesadas a cada dois dias para determinação da matéria seca. Serão realizadas análises de degradabilidade ruminal, parâmetros sanguíneos e líquido ruminal. As análises serão feitas pelo software SAS 9.1 (2004). Os dados serão analisados como medidas repetidas no tempo sendo um delineamento quadrado latino 4x4 duplo, com quatro tratamentos em quatro períodos. No modelo estatístico serão considerados os efeitos fixos: período e tratamento. As médias serão comparadas pelo teste de Tukey, com nível de significância 5%.

Local do experimento: A pesquisa será conduzida no Departamento de Zootecnia da FZEA-USP, em Pirassununga, SP.

Pirassununga, 17 de outubro de 2017

Prof. Dra. Daniele dos Santos Martins
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Prof. Dra. Cristiane Gonçalves Titto
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

DEDICATÓRIA

Dedico à minha esposa e aos meus pais pelo apoio e suporte neste período de minha vida.

À minha filha e ao meu filho, os quais me inspiram a caminhar em frente e concluir meus objetivos e tarefas da melhor forma possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Professora Orientadora Luciane Silva Martello, pelos ensinamentos, tempo dedicado e paciência nestes anos de muito aprendizado.

A todos que contribuíram para que esse trabalho fosse concluído, em especial ao Professor Paulo Henrique Mazza Rodrigues pela contribuição em todas as etapas do trabalho, à Professora Rosana Ruegger Pereira da Silva Corte pelos ensinamentos, à Annelise Aila Gomes Lobo pelo apoio nas atividades diárias de confinamento e coleta, ao colega Flávio Perna pela dedicação, critério e calma com que expõe, ensina e acompanha as atividades de análise, ao Professor Saulo da Luz e Silva por disponibilizar sua equipe durante os períodos de coleta, assim como os estagiários e graduandos da FZEA que contribuíram e fizeram companhia durante as coletas.

A ajuda de vocês foi essencial para a conclusão deste projeto. Sem vocês, isto não teria ocorrido. Meu sincero OBRIGADO.

RESUMO

BRINER NETO, T. **Avaliação in situ do metabolismo ruminal de bovinos Nelore submetidos a dietas compostas por substâncias húmicas**. 2019. 45f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019

O presente estudo trata da investigação sobre o uso de um produto inovador, classificado como substâncias húmicas, as quais têm sido estudadas como aditivo alternativo na dieta de bovinos de corte. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o uso de substâncias húmicas como aditivo na dieta de bovinos Nelore e sua influência no metabolismo ruminal e na síntese de proteína microbiana. Utilizou-se 8 machos canulados e castrados, alocados em baias individuais, com peso vivo de 549 kg (\pm 45 kg). Os animais foram divididos aleatoriamente em delineamento quadrado latino 4x4 replicado, recebendo tratamentos com níveis crescentes de substâncias húmicas na MS da dieta (0%, 0,45%, 0,9% e 1,35%). Avaliou-se o consumo de matéria seca, pH ruminal, ácidos graxos de cadeia curta, nitrogênio amoniacal, contagem de protozoários, síntese de proteína microbiana e níveis de ureia plasmática no sangue. Não houve efeito ($p > 0,05$) entre os tratamentos para o consumo de matéria seca, pH ruminal, nitrogênio amoniacal, população de protozoários e níveis de ureia plasmática no sangue. Quanto aos ácidos graxos de cadeia curta, ocorreu efeito linear decrescente nas concentrações de isobutírico e valérico e não houve efeito de tratamento para ácido acético, propiônico, butírico e isovalérico. Obteve-se efeito quadrático na excreção urinária de alantoína, purinas microbianas absorvidas e nos compostos nitrogenados microbianos. A adição de substâncias húmicas até o nível de 1,35% na matéria seca não influenciou os parâmetros ruminiais dos animais recebendo uma dieta com 50% de concentrado. Estudos adicionais sobre o uso do produto em maior quantidade na dieta, com maior proporção de concentrados, influência de raças, idade e categoria animal podem contribuir para elucidar os efeitos desse produto como aditivo alimentar.

Palavras-chave: Substâncias húmicas; Leonardita; Canulados; Gado de corte

ABSTRACT

BRINER NETO, T. **Rumen metabolism evaluation of Nelore cattle using Humic substances as feed additive**. 2019. 45f. Dissertation (Master degree) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019

The present study explore the use of an innovative product, classified as humic substance, which has been studied as an alternative additive for beef cattle diet. Therefore, the objective of this study was to evaluate the use of humic substances as an additive in the diet of Nelore cattle and their influence on ruminal metabolism. Eight cannulated and castrated males were used in individual pens with a live weight of 549 kg (\pm 45 kg). The animals were randomly allotted into a replicated 4x4 latin square design, receiving treatments with increasing levels of humic substances in the diet (0%, 0.45%, 0.9% e 1.35%). The dry matter intake, ruminal pH, short chain fatty acids, ammoniacal nitrogen, protozoan count, microbial protein synthesis and blood urea levels were evaluated. There was no effect ($p > 0.05$) between treatments for dry matter intake, ruminal pH, ammoniacal nitrogen, protozoan population and plasma urea levels in the blood. As for short chain fatty acids, there was no treatment effect for acetic, propionic, butyric and isovaleric acid, but it was observed linear decreasing effects on isobutyric and valeric concentrations. There was a quadratic effect on urinary excretion of allantoin, absorbed microbial purines and microbial nitrogen compounds. The addition of humic substances up to the level of 1.35% in DM did not influence the ruminal parameters of the animals receiving diet with 50% of concentrate. Additional studies on the product use considering more challenging ration, with a greater concentrated:forage ratios, animal age and other variations can contribute to clarify the effects of this product as additive.

Key words: Humic substances; Leonardite; Cannulated; Beef cattle

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Proporções de ingredientes e composição bromatológica estimada da dieta experimental expressa em porcentagem da matéria seca (%MS).....21
- Tabela 2. Porcentagem de ácido húmico e fúlvico do produto utilizado no presente estudo, como aditivo, de acordo com as metodologias de análises CDFA (California Department of Food and Agriculture), Lamar et al., ISO/CD 19822 (*International Organization for Standardization*) e V&B (Verploegh e Brandvold).....22
- Tabela 3: Efeito do uso de diferentes doses de substâncias húmicas sobre o consumo da dieta (kg/animal).dia⁻¹ e a relação entre a ingestão de matéria seca e peso vivo do animal.....29
- Tabela 4: Efeito do uso de diferentes doses de substâncias húmicas sobre a média do pH e sobre os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) observados no fluido ruminal de bovinos confinados.....30
- Tabela 5. Contagem total e diferencial de protozoários ciliados ruminais de bovinos Nelore, alimentados com diferentes níveis de substâncias húmicas.....33
- Tabela 6: Excreção urinária de derivados de purina e síntese de nitrogênio microbiano de Nelore confinados, alimentados com diferentes níveis de substâncias húmicas.....34
- Tabela 7: Efeito de diferentes níveis de substâncias húmicas sobre a concentração de ureia plasmática em dietas de bovinos Nelore.....35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Animais com cânulas ruminais recebendo as diferentes dietas.....	20
Figura 2. Representação esquemática dos períodos e dias de coleta.....	23
Figura 3. Probe com dois pesos de 900 g acoplados com o objetivo de mantê-la no saco ventral do rúmen.....	24
Figura 4: Coleta de líquido ruminal.....	25
Figura 5. Efeito do uso de diferentes doses de substâncias húmicas (0%; 0,45%; 0,90% e 1,35%) sobre a concentração do nitrogênio amoniacal ruminal em relação ao tempo.....	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 HIPÓTESE.....	13
1.2 OBJETIVO	13
1.3 SITUAÇÃO ATUAL DO CONFINAMENTO BOVINO PARA PRODUÇÃO DE CARNE.....	13
1.4 ADITIVOS ALIMENTARES PARA RUMINANTES.....	14
1.4.1 ANTIBIÓTICOS IONÓFOROS	15
1.4.2. ANTIBIÓTICOS NÃO IONÓFOROS.....	15
1.4.3. PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS, LEVEDURAS E ÁCIDOS ORGÂNICOS	16
1.4.4 SUBSTÂNCIAS HÚMICAS	17
2. MATERIAL E MÉTODOS	20
2.1. ANIMAIS E INSTALAÇÕES.....	20
2.2. TRATAMENTOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	21
2.2.1 CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS.....	22
2.3 CARACTERÍSTICAS AVALIADAS.....	23
2.3.1 CONSUMO DE MATÉRIA SECA	23
2.3.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO	24
2.3.3 CONTAGEM DE PROTOZOÁRIOS RUMINAIS.....	26
2.3.4 SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA	26
2.3.5 NÍVEIS DE UREIA PLASMÁTICA NO SANGUE.....	27
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
3.1 CONSUMO DE MATÉRIA SECA	29
3.2 PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO RUMINAL.....	29

3.2.1 MENSURAÇÃO DE pH E ÁCIDO GRAXO DE CADEIA CURTA.....	29
3.2.2 NITROGÊNIO AMONÍACAL (N – NH ₃)	31
3.3 CONTAGEM DE PROTOZOÁRIOS.....	32
3.4 SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA.....	33
3.5 NÍVEIS DE UREIA PLASMÁTICA NO SANGUE	34
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES.....	36
5. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	37
6. REFERÊNCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de proteína animal, com grande representatividade na produção de frangos, bovinos e suínos, posicionando-se como terceiro maior produtor mundial de rações para alimentação animal, atrás da China e Estados Unidos (BANCO NACIONAL DO DESENVOLVIMENTO, 2018).

Aumentar a produtividade tem sido uma das principais preocupações dos criadores de animais do mundo inteiro. Esta busca tem seguido várias rotas, entre elas aumentar a quantidade e qualidade do produto final, diminuir a velocidade de abate e minimizar o impacto ambiental da produção. Um dos métodos utilizados para atingir estes objetivos é a utilização de aditivos alimentares, que aumentam a eficiência de uso dos alimentos por parte dos animais (MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR, 2015).

No Brasil, o maior consumo de rações e aditivos é gerado pela produção de frangos e suínos (SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 2015), mas destaca-se também o consumo de aditivos em diversos outros setores de produção de proteína animal da economia brasileira, incluindo a bovinocultura (BANCO NACIONAL DO DESENVOLVIMENTO, 2018).

No Brasil, os aditivos alimentares são regulamentados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, sendo descrito na Instrução Normativa número 44, do ano de 2015, como substância, microrganismo ou produto formulado, adicionado intencionalmente aos produtos, que não é utilizada normalmente como ingrediente, tenha ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal ou dos produtos animais, melhore o desempenho dos animais sadios ou atenda às necessidades nutricionais.

Na alimentação animal, um aditivo que demanda mais estudos são as substâncias húmicas, pois existe pouca informação na literatura, limitando o conhecimento sobre o uso desta substância como aditivo alimentar para o crescimento de animais. Além disso, grande parte da literatura é originada de empresas privadas, interessadas na comercialização do produto. Somado a isso, características inerentes à formação do produto acarretam dificuldades para comparar os efeitos entre as substâncias húmicas, uma vez que são oriundas de diferentes fontes e origens, além da possibilidade de resultados divergentes devido à variabilidade ambiental sobre os animais nas diferentes regiões do mundo. Portanto, o efeito das substâncias húmicas no desempenho e saúde

animal é muito dependente das suas especificações e características do material de origem (ISLAM; SCHUHMACHER; GROPP; 2005).

1.1 HIPÓTESE

A utilização de substâncias húmicas como aditivo na alimentação de bovinos Nelore em confinamento melhoram o desempenho do metabolismo ruminal, possibilitando ganhos de produtividade.

1.2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da utilização de níveis crescentes de substâncias húmicas na dieta de bovinos Nelore sobre o metabolismo ruminal, parâmetros sanguíneos e proteína microbiana.

1.3 SITUAÇÃO ATUAL DO CONFINAMENTO BOVINO PARA PRODUÇÃO DE CARNE

Em 2017, o agronegócio representou 22% do PIB do Brasil, sendo que a pecuária correspondeu a 31% do PIB do agronegócio. O país possui aproximadamente 221 milhões de animais bovinos (15,3% do rebanho mundial) e o número de abates em 2017 foi de 39,2 milhões de cabeças (ABIEC, 2018).

Atualmente o confinamento contribui com aproximadamente 13% do abate total do país (ABIEC, 2018) e é uma estratégia crescente na cadeia produtiva da carne bovina, principalmente na entressafra, possibilitando maiores taxas de ganho de peso, incrementos na produtividade, além da melhor qualidade de carne (MENEZES et al., 2010).

Como a produção intensiva de carne exige o abate precoce dos animais, são necessárias melhorias genéticas no rebanho, acompanhadas do fornecimento com alto teor de concentrado. Neste caso, as dietas possuem alta proporção de carboidratos rapidamente fermentescíveis (grãos), o que acarreta mudanças no rúmen animal. Tais mudanças estão relacionadas com o estímulo no crescimento de diversas bactérias, redução de pH, aumento da disponibilidade de glicose livre e aumento da produção de AGCC e ácido láctico, o que resulta em alterações dos processos fisiológicos, podendo ocasionar desordens metabólicas como acidose ruminal, laminites e timpanismo (MILLEN et al., 2009), afetando a produtividade dos animais e acarretando em perdas econômicas aos produtores. Pode-se observar a importância da acidose ruminal através das

entrevistas feitas com confinadores por Oliveira e Millen (2014), na qual aponta-se que a mesma é a segunda principal dificuldade enfrentada pelos confinadores (34,4% dos entrevistados), sendo superada somente pelos problemas respiratórios (40,6%).

Dessa forma, a manipulação de dietas com aditivos alimentares é uma alternativa para mitigar esses possíveis problemas encontrados nos bovinos confinados e, em um cenário mundial cada vez mais competitivo, com a busca constante por maior produtividade, a nutrição mais eficiente é um fator importante. Ressalta-se, porém, que o custo da alimentação se torna mais impactante quanto maior o nível de tecnologia na cadeia produtiva da carne, representando o maior custo do total da produção em confinamentos de alta tecnologia (adaptado de ABIEC, 2018).

1.4 ADITIVOS ALIMENTARES PARA RUMINANTES

Aditivo é todo e qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos com o objetivo de modificar as suas características, ao desempenhar funções como: melhorar o valor nutricional, garantir a segurança microbiológica, aumentar a vida útil do alimento, melhorar as qualidades organolépticas (como cor, sabor e textura), além de outros benefícios (ARAÚJO, 2007).

Diversos aditivos são utilizados na alimentação de ruminantes e, conforme Gomes (2009), entre os principais encontram-se antibióticos ionóforos e não-ionóforos, probióticos, prebióticos, leveduras e ácidos orgânicos, porém, alguns aditivos sofrem restrições preventivas em razão da possibilidade do aumento de incidência de microrganismos resistentes. Um exemplo de tal restrição é o Regulamento nº 1831/2003 da União Européia, a qual proibiu o uso de alguns aditivos específicos em animais (MARINO et al., 2008).

O comportamento ingestivo de bovinos em confinamento tem sido amplamente estudado, geralmente avaliado com diferentes dietas e grupos genéticos, além de uma diversidade de aditivos alimentares, resultando em diferentes respostas no metabolismo animal, na ingestão de matéria seca, na conversão alimentar e no ganho de peso.

O principal efeito dos aditivos é manipular a fermentação ruminal, aumentando a eficiência de utilização dos alimentos pelos ruminantes, promovendo melhoria no desempenho produtivo, possivelmente em razão de seus efeitos nos processos digestivos, na degradação da

parede celular, na estabilidade do pH ruminal e na manutenção de níveis adequados de amônia (DOREAU et al., 2010).

1.4.1 ANTIBIÓTICOS IONÓFOROS

São substâncias químicas de baixo peso molecular produzidas por bactérias do gênero *Streptomyces*. Apresentam a propriedade de inibir microrganismos gram-positivos e com pouco ou nenhum efeito contra a atividade de microrganismos gram-negativos. Isso deve-se a presença de uma camada lipídica externa nos microrganismos gram-negativos que impedem a passagem dos ionóforos pela membrana celular, diferentemente dos microrganismos gram-positivos que não possuem esta camada externa e possibilitam a entrada dos ionóforos (NAGARAJA et al., 1997). Assim, através do excesso de trocas iônicas nas bactérias gram-positivas, os ionóforos suprimem a energia e conseqüentemente o desenvolvimento das mesmas, favorecendo, portanto, o desenvolvimento das gram-negativas. Isso resulta em aumento do ácido propiônico, redução da relação entre acetato e propionato, melhor aproveitamento dos aminoácidos que, possivelmente seriam fermentados no rúmen. Além disso, contribuem com a diminuição de metano e ácido láctico, atenuando a queda de pH e a incidência de distúrbios digestivos como acidose láctica (MCGUFFEY et al., 2001; GOES, 2004).

1.4.2. ANTIBIÓTICOS NÃO IONÓFOROS

Os antibióticos não ionóforos, como exemplo da virginiamicina, estão relacionados com as alterações na população ou atividades metabólicas das bactérias que residem no trato gastrointestinal (especificamente as bactérias gram-positivas). Este aditivo apresenta efeito positivo no desenvolvimento e eficiência alimentar de bovinos, assim como também redução da incidência de abscessos hepáticos (SITTÁ, 2011). A virginiamicina possui dois componentes químicos distintos: fator M e fator S, que possuem efeito potencializados contra bactérias quando são combinados sinergicamente na razão 4:1. O aditivo penetra na parede celular das bactérias gram positivas e inibem a formação da ligação peptídica durante a síntese proteica bacteriana, suprimindo processos metabólicos na célula e cessando o desenvolvimento da bactéria. (SITTÁ, 2011).

O maior número de bactérias gram-negativas eleva a produção de propionato no rúmen, fazendo com que maior quantidade de hidrogênio seja retirado do meio ruminal, possibilitando redução de metano e, portanto, melhorando a eficiência energética da dieta (MACIEL et al., 2015).

1.4.3. PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS, LEVEDURAS E ÁCIDOS ORGÂNICOS

Em decorrência da importância à redução do uso de antibióticos como promotores de crescimento, ocorreu um aumento do interesse pela utilização de aditivos microbianos na alimentação animal. O FDA (*U. S. Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos descreve o termo DFM (*direct-fed microbials*) como “fonte natural de microrganismos (viáveis)”. Por solicitação do FDA, os fabricantes de tais aditivos passaram a utilizar a denominação DFM em substituição ao termo probiótico, sendo que bactérias, fungos e leveduras se enquadram na categoria de DFMs (SITTÁ, 2011). A adição de DFMs pode beneficiar os animais em momentos de estresse, como por exemplo, facilitando a adaptação na transição para uma dieta de confinamento. Outra hipótese é propiciar uma melhor eficiência alimentar, através de um rúmen mais equilibrado. (ELAM, 2003; KREHBIEL et al., 2003).

As leveduras têm sido utilizadas na alimentação animal há várias décadas, obtendo importância como probiótico através dos benefícios sobre a digestão (ORTOLAN, 2010). A levedura possui uma demanda de oxigênio muito superior à quantidade presente no rúmen, assim, removem o oxigênio e favorecem as bactérias anaeróbicas que melhoram a degradação das fibras. Essa melhor degradação de fibra pode favorecer a ingestão de matéria seca (MARTIN; NISBET, 1992; WALLACE; NEWBOND, 1992). A presença de leveduras na dieta beneficia o metabolismo do nitrogênio no rúmen, diminuindo a concentração de amônia e aumentando o fluxo de N bacteriano para o intestino delgado (ERASMUS et al., 1992).

Quanto aos prebióticos, estes abrangem diferentes compostos de produtos e muitos podem ser classificados como tal: carboidratos, peptídeos, lipídeos, fibras e álcoois, sendo os oligossacarídeos de cadeia curta, como os mananoligossacarídeos, os frutoligossacarídeos e os glucoligossacarídeos os mais pesquisados (ROSTAGNO et al., 2000). São compostos não metabolizáveis por enzimas, sais e ácidos produzidos pelo organismo animal, devendo servir de substrato para as bactérias intestinais benéficas, as quais serão estimuladas a desenvolver-se, assim alteram a microbiota intestinal de forma benéfica ao hospedeiro (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

Já os ácidos orgânicos, como os ácidos dicarboxílicos aspartato, fumarato e malato estimulam a utilização do lactato pela bactéria predominante no rúmen, *Selenomonas ruminantium* (NICODEMA, 2001). Martin (1998) indica efeitos benéficos quanto a adição de ácidos orgânicos para animais confinados com dietas ricas em concentrados. Nessas dietas, devido à concentração

de carboidratos prontamente fermentáveis, o lactato pode se acumular e diminuir o pH ruminal, decrescendo o número de bactérias celulolíticas e, conseqüentemente, a digestão da fibra e taxa de passagem. A adição de malato, por exemplo, poderia reduzir a incidência de acidose subclínica, mas o autor ressalta que existe pouca informação a respeito do efeito de ácidos orgânicos no desempenho de ruminantes.

1.4.4 SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

As substâncias húmicas são divididas em três categorias: ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e humina. A definição da mesma não é simples e reflete bem a complexidade do material orgânico. Essas moléculas são encontradas em depósitos da superfície da terra e originam-se da oxidação e subsequente polimerização da matéria orgânica, apresentando-se como moléculas de elevada massa e com diversos grupos funcionais, resultante de reações de síntese secundárias, bióticas e abióticas. Sua composição elementar apresenta um conteúdo médio de C em 55,1%, de O em 35,6%, de H em 5,0% e de N em 3,5% (STEVENSON, 1994).

Sua utilização é comum na agricultura, favorecendo o desenvolvimento vegetal, tanto da parte aérea quanto do sistema radicular (RODDA et al, 2006). Alguns autores ressaltam que as substâncias húmicas promovem o crescimento da planta melhorando a biodisponibilidade de certos nutrientes no solo (CHEN; CLAPP; MAGEN, 2004) enquanto outros apontam uma ação estimulante, em geral atribuída ao efeito direto de hormônios vegetais (MORA et al., 2010); TREVISAN et al., 2011).

As substâncias húmicas destacam-se como agente obstipante, analgésico, imuno estimulante e antimicrobiano para cavalos, ruminantes, suínos e aves (EMEA, 1999). Pesquisas realizadas já demonstraram que a suplementação de substâncias húmicas mitigaram os efeitos adversos de aflatoxinas, uma vez que este aditivo possui a propriedade de complexá-las no trato gastrointestinal, impedindo a sua absorção e mitigando a toxidez em aves (VAN RENSBURG; VAN RENSBURG; VAN RYSSSEN; CASEY; ROTTINGHAUS, 2006). McMurphy (2007), menciona que as substâncias húmicas podem se tornar um suplemento ou potencial aditivo em regiões nas quais pecuaristas se deparam com certas restrições ambientais e sociais.

Na nutrição animal, observa-se maior número de trabalhos científicos deste aditivo em alimentos para aves, no entanto o mecanismo como as substâncias húmicas afetam a performance

destes animais ainda é desconhecido (YORUK; GUL; HAYIRLI; MACIT, 2004). Yoruk et al. (2004), observaram que o produto não interfere na quantidade de alimento ingerido pelas aves, sugerindo que o ganho de peso está relacionado ao aumento e melhora dos processos metabólicos da digestão e a eficiência na utilização de nutrientes. Neste mesmo trabalho não foi observado diferenças na qualidade dos ovos, mas identificou-se aumento na produção de forma linear, conforme incremento da quantidade de substâncias húmicas como aditivo na ração. Observações diferentes foram feitas por Karaoglu et al. (2004), os quais relataram aumento na quantidade de alimento ingerida e da taxa de conversão alimentar nas concentrações de 0,5% de substâncias húmicas por kg de ração. Estes autores também observaram que o produto não influenciou o peso final em aves, mas, constataram decréscimo na taxa de mortalidade.

Os resultados apontados por Karaoglu et al. (2004), foram também observados por Hayirli et al. (2005), que realizaram estudos utilizando substâncias húmicas na dieta alimentar de aves nas doses de 0; 0,15%; 0,30%, incrementando linearmente a produção de ovos, além de aumentar a glicose sérica, proteína total, albumina, globulina, creatina e cálcio. Neste estudo também é apontado a maior densidade populacional das aves, indicando que os benefícios das substâncias húmicas estão mais aparentes em animais mantidos em condições mais estressantes (maior densidade populacional). Já Hakan, Gultekin e Ozge (2012) apresentaram resultados contrastantes ao publicado por Karaoglu et al. (2004), observando diminuição na conversão alimentar de aves poedeiras.

Em cabras, Degirmencioglu (2012) não verificou mudanças na composição do leite, mas observou maior produtividade nos animais tratados com substâncias húmicas, onde o controle produziu 2,11 kg de leite por dia, enquanto os animais tratados com diferentes doses de substâncias húmicas tiveram produtividade em 2,37 e 2,45 kg de leite por dia. O autor concluiu que o produto é uma alternativa em sistemas de produção orgânico, pois também não afeta a saúde dos animais.

Cusak (2008), estudando bovinos de corte em terminação, verificou que dietas com substâncias húmicas aumentam a ingestão de matéria seca e ganho de peso diário. Já Silva et al. (2011) não observaram efeito da inclusão de substâncias húmicas (produto avaliado de nome comercial NutriHume, Nutron Alimentos Ltda) no concentrado inicial de bezerros com o rúmen em desenvolvimento, seja no desempenho ou na saúde dos animais. McMurphy et al. (2011), avaliando as substâncias húmicas nas doses de 0%; 0,5%; 1,0% e 1,5% de MS, concluíram que

este aditivo não afeta significativamente alguns aspectos da fermentação do rúmen, mas a inclusão do mesmo pode alterar o consumo de matéria seca enquanto reduz a concentração de amônia ruminal, mas ressaltam que as substâncias húmicas são diferentes dependendo do ambiente que elas são extraídas.

Divergências de resultados podem ocorrer em razão de diferentes composições das substâncias húmicas utilizadas, com diferentes aditivos e concentrações, sendo, portanto, muito relevante caracterizar e identificar o produto nas publicações, uma vez que em grande parte da literatura investigada lacunas de identificação foram evidenciadas (HAKAN; GULTEKIN; OZGE, 2012).

Em razão da maior exigência do consumidor e da restrição de produtos como promotores de crescimento e antibióticos pela União Europeia, observa-se uma busca de aditivos alternativos que acarretem benefícios similares ou superiores em relação a maiores taxas de crescimento, aumento da conversão alimentar, diminuição da incidência de doenças e redução do custo de produção. Neste contexto, enquadram-se as substâncias húmicas como aditivo alternativo, contudo, esse produto necessita de mais estudos na alimentação animal, sobretudo em ruminantes, os quais possuem dados de pesquisa restritos (SILVA et al., 2011). A substância húmica é um produto natural, originada de diferentes fontes, com diversas formas de processamento e conforme já mencionado, a falta de caracterização na maioria dos trabalhos publicados, torna difícil a comparação dos efeitos entre elas (ISLAM; SCHUHMACHER; GROPP, 2005). Portanto, o presente estudo busca avaliar o efeito e possível eficiência das substâncias húmicas como aditivo em bovinos confinados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ANIMAIS E INSTALAÇÕES

A pesquisa foi conduzida na Faculdade Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA), da Universidade de São Paulo (USP), Campus Fernando Costa em Pirassununga, São Paulo. O estudo foi realizado seguindo as normas da comissão de ética da USP (CEUA nº 9994130217).

Foram utilizados 8 bovinos machos da raça Nelore (Figura 1), com idade de 24 meses e com cânulas ruminais. Os animais (peso médio $549 \text{ kg} \pm 45 \text{ kg}$) foram alojados em confinamento experimental distribuídos em oito baias com piso cimentado, bebedouros automáticos e cochos de alvenaria. O experimento foi realizado no primeiro semestre do ano de 2017

Figura 1. Animais com cânulas ruminais recebendo as diferentes dietas.



Fonte: Própria autoria

2.2. TRATAMENTOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A alimentação foi realizada diariamente com uma dieta contendo 50% de concentrados e 50% de volumosos (Tabela 1). Os tratamentos foram preparados previamente ao experimento, diferindo através da inclusão dos diferentes níveis de substâncias húmicas (0; 0,45; 0,9; 1,35%) e com adição de caulim à medida que o nível do aditivo diminuiu, mantendo assim a alimentação homogênea em todos os tratamentos. A dieta basal foi formulada no programa Spartan Dairy Ration Evaluator/Balanacer, avaliando segundo o NRC (2001), de modo a atender as exigências.

Os animais foram divididos aleatoriamente conforme tratamentos abaixo:

1. 0%: Dieta controle;
2. 0,45%: Dieta com 0,45% de substâncias húmicas na MS total;
3. 0,9%: Dieta com 0,9% de substâncias húmicas na MS total;
4. 1,35%: Dieta com 1,35% de substâncias húmicas na MS total;

Tabela 1. Proporções de ingredientes e composição bromatológica estimada da dieta experimental expressa em porcentagem da matéria seca (% MS).

Ingredientes	(% MS)
Silagem de milho	50
Milho grão seco	33,5
Farelo de soja 45%	14
Núcleo mineral ¹	0,85
Ureia	0,8
Calcário	0,8
Cloreto de potássio	0,05
Composição bromatológica	
Matéria seca (%)	65,70
PB (%MS)	15,71
FDN (%MS)	31,34
FDA (%MS)	17,70
MM (%MS)	5,28
EE (%MS)	3,18
ENN (%MS)	57,06
CNF (%MS) ²	31,93
NDT (%MS) ³	74,57

1. Suplemento vitamínico mineral - níveis de garantia por kg: cálcio 79 g/kg, fósforo 65 g/kg, enxofre 4,6 g/kg, sódio 145 g/kg, cobalto 44,5 mg/kg, cobre 1200 mg/kg, ferro 1500 mg/kg, iodo 60 mg/kg, manganês 1050 mg/kg, selênio 10 mg/kg, zinco 2880 mg/kg. ²CNF: Carboidratos não fibrosos (100-(MM+PB+FDN+EE)). ³NDT estimado segundo Kears (1982).

2.2.1 CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

Neste trabalho, as substâncias húmicas utilizadas foram extraídas de uma mina de leonardita. A leonardita é um mineralóide, material de origem geológica, similar aos minerais, mas que não possui composição química homogênea e uniforme para serem considerados um mineral específico (NEVES, 2008). É um material orgânico, rico em substâncias húmicas, sendo que esta é dividida em três frações principais chamadas de ácido húmico, ácido fúlvico e humina, variando sua classificação conforme características de solubilidade. Quimicamente estas três frações são similares, mas diferem em peso molecular e nas concentrações de Carbono (C), Hidrogênio (H), Oxigênio (O) e Nitrogênio (N) (STEVENSON, 1994).

Após extraída, a leonardita é reagida com hidróxido de potássio, o que proporciona uma concentração de 15% de óxido de potássio (K_2O) no aditivo, produto comercial utilizado neste trabalho. Também é observado a reação com outros tipos de materiais, como o hidróxido de sódio.

Devido às substâncias húmicas possuírem uma estrutura química complexa e não claramente definida, não existe uma técnica analítica para quantificá-las precisamente (LAMAR; TALBOT, 2009). Dessa forma, está apresentada na Tabela 2 a concentração de substâncias húmicas do produto utilizado no presente estudo como aditivo, conforme diferentes metodologias de análise: CDFA (California Department of Food and Agriculture), Lamar et al., ISO/CD 19822 (*International Organization for Standardization*) e V&B (Verploegh e Brandvold).

Neste trabalho adotou-se a metodologia CDFA para cálculo da concentração de substâncias húmicas. As doses de 0,45%; 0,9% e 1,35% representam o valor em substâncias húmicas e não do produto final.

Tabela 2. Porcentagem de ácido húmico e fúlvico do produto utilizado no presente estudo, como aditivo, de acordo com as metodologias de análises CDFA (California Department of Food and Agriculture), Lamar et al., ISO/CD 19822 (*International Organization for Standardization*) e V&B (Verploegh e Brandvold).

Substâncias	CDFA	Lamar et al.	ISO/CD 19822	V&B
Ácido húmico (%)	63,21	63,55	64,41	66,00
Ácido fúlvico (%)	*	1,26	1,28	32,06

* A metodologia CDFA (California Department of Food and Agriculture) expressa somente substância húmica

2.3.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO

2.3.2.1 MENSURAÇÃO DE pH

Foi utilizado um data logger pH (Modelo: T7-1 Lethbridge Research Centre pH - LRCpH, Dascor, Escondido, CA, USA) (PENNER; BEAUCHEMIN; MUTSVANGWA, 2006) para mensuração de pH ruminal no penúltimo dia de coleta (18º dia de cada período). Este material é abrigado em uma cápsula de PVC resistente a água (Figura 3). O eletrodo de pH (modelo S655CDHT, Dascor, Escondido, CA) é coberto por uma proteção de 38 mm de diâmetro com quatro furos de 25 mm, que foram desenvolvidos para permitir a passagem de partículas e líquido enquanto protege o eletrodo de entrar em contato com o epitélio ruminal. A mensuração foi feita a cada 10 minutos e durante 24 horas, transferindo os dados para um computador no final de cada período experimental. O equipamento foi deixado no rúmen, via fistula, acoplado a dois pesos de 900 gramas para ser mantido no saco ventral. Os equipamentos foram calibrados em soluções de pH 7,0 e 4,0 antes e após a colocação nos 8 animais para ajuste dos dados mensurados. Esta mensuração permitiu o acompanhamento do pH ruminal. O pH abaixo de 5,8 é um indicativo de acidose subclínica (PENNER; BEAUCHEMIN; MUTSVANGWA, 2007) e o pH entre 6,0 e 6,2 são indicativos de condições ruminiais saudáveis (PENNER; BEAUCHEMIN, 2010).

Figura 3. Probe com dois pesos de 900 g acoplados com o objetivo de mantê-la no saco ventral do rúmen.



Fonte: Própria autoria

2.3.2.2 ÁCIDO GRAXO DE CADEIA CURTA

No 18º dia de cada período experimental foram colhidas amostras do líquido ruminal nos tempos 0, 3, 6, 9 e 12 horas. A coleta foi realizada em três pontos diferentes correspondentes ao antro e sacos ventrais anterior e posterior. Em seguida, cada amostra filtrada com gazes foi centrifugada por 15 minutos para a determinação de ácidos graxos de cadeia curta e nitrogênio amoniacal.

Figura 4: Coleta de líquido ruminal.



Fonte: Própria autoria

Para determinação das concentrações de ácido graxo de cadeia curta, foi coletado uma amostra de 2 mL do sobrenadante resultante da centrifugação do líquido ruminal e armazenados em tubos de ensaios contendo 0,4 mL de ácido fórmico PA para posterior armazenagem a -20°C até o momento da análise. A concentração dos AGCC foi determinada por cromatografia gasosa, segundo Erwin et al. (1961).

2.3.2.3 NITROGÊNIO AMONIACAL (N – NH₃)

Para determinação da concentração de N-NH₃, foi coletado uma amostra de 2 mL do sobrenadante resultante da centrifugação do líquido ruminal e armazenados em tubos de ensaios contendo 1 mL de solução de ácido sulfúrico 1N, guardadas a -20°C até a realização das análises por colorimetria, segundo método descrito por Kusalek (1972) e adaptado por Foldager (1977).

2.3.3 CONTAGEM DE PROTOZOÁRIOS RUMINAIS

Para a contagem dos protozoários do rúmen, o conteúdo ruminal foi coletado manualmente às 11 horas do 18º dia de cada período. O volume de 10 mL deste material foi armazenado em frasco contendo 20 mL de formaldeído 18,5% (v/v). Em 1 mL da mistura diluída com formol a 50% foi adicionado 2 gotas de verde brilhante a 2%, deixando repousar por 4 horas. Posteriormente, foi adicionado 9 mL de glicerol a 30% e a amostra foi homogeneizada, tornando a alíquota diluída 30 vezes. Com a utilização de uma pipeta, a câmara de contagem foi preenchida com a amostra diluída, que, acoplada ao microscópio, 100 campos óticos foram contados através do retículo, com aumento de 100 vezes. As contagens diferenciais dos protozoários foram determinadas utilizando-se um retículo de 0,5 mm x 0,5 mm de área, com subdivisões de 25 quadrículos, acoplado na ocular de um microscópio em uma câmara de contagem de “Sedgwick-Rafter” com medidas internas de 50 mm x 20 mm x 1 mm (capacidade 1 mL), conforme Dehority (1993). Identificou-se as espécies de protozoários, assim como suas proporções em porcentagem (%). Os protozoários foram diferenciados em três gêneros: *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium* e também a subfamília Diplodiniinae (a qual inclui *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, *Ostracodinium*, *Metadinium* e *Polysplatron*).

2.3.4 SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA

A síntese de proteína microbiana foi estimada por derivados de purina na urina, a qual foi colhida por micção espontânea às 6, 12, 18 e 24 horas do penúltimo dia de cada período. Após cada uma das coletas, foi feita uma mistura de 10 mL de urina diluída em 40 mL de ácido sulfúrico a 0,036 N com o objetivo de evitar a lise bacteriana dos derivados de purina e precipitação do ácido úrico. No final de cada período as amostras foram homogeneizadas e congeladas para posterior análise de ureia, alantoína, ácido úrico e creatinina.

A ureia e a creatinina na urina foram determinadas utilizando-se kits comerciais, determinados, respectivamente, através da reação enzimática colorimétrica e da reação com picrato alcalino em uma solução tamponada (Bioclin Ref K047 e Ref K067 respectivamente). A alantoína foi determinada por método colorimétrico, respectivamente proposto por Chen e Gomes (1992). O ácido úrico foi determinado por reação enzimática colorimétrica com uricase e peroxidase através do kit comercial (Bioclin Ref K139).

A concentração do nitrogênio (N) ureico na urina foi obtido através da concentração de ureia multiplicado por 0,466, sendo este a concentração de N da ureia.

A excreção urinária diária de creatinina (EC) foi estimada a partir da equação proposta por Chizzotti et al. (2004), a qual considera o peso vivo (PV) em kg conforme abaixo:

$$EC \text{ (mg/kg PV)/d} = 32,27 - 0,01093 * PV \text{ (R}^2=0,70)$$

O volume urinário diário foi estimado dividindo-se as excreções urinárias diárias de creatinina pelos valores observados de concentração de creatinina na urina (mg/dL) das amostras coletadas. Este volume foi utilizado para estimar as excreções diárias de ureia, alantoína e ácido úrico de cada animal.

A excreção de derivados de purina (DP) foi calculada multiplicando-se o volume de urina pela concentração de DP na amostra. As purinas microbianas absorvidas (Pabs, mmol/dia) foram calculadas a partir da equação proposta por Verbic, Chen e Macleod (1990), mencionada logo abaixo. Nesta equação utilizou-se os valores de excreção de derivados de purinas na urina (DP – mmol/dia). Na equação considera-se que 0,85 é a recuperação de purinas absorvidas como derivados urinários de purinas e que $0,385 * PV^{0,75}$ é a excreção de purinas de origem endógena por kg de peso metabólico por dia.

$$DP = 0,85 * Pabs + 0,385 * PV^{0,75}$$

O fluxo intestinal de compostos nitrogenados (Nmic, g de N/dia) foi calculado através da equação descrita por Chen e Gomes (1992), sendo que Pabs são as purinas microbianas absorvidas (mmol/dia), 70 é o conteúdo de N nas purinas (mg N/mmol), 0,83 é a digestibilidade das proteínas microbianas e 0,116 é a relação N purina e N total dos microrganismos ruminais.

$$Nmic = (70 * Pabs) / (0,83 * 0,116 * 1000)$$

2.3.5 NÍVEIS DE UREIA PLASMÁTICA NO SANGUE

O sangue foi colhido nos tempos 0 e 3 horas após a alimentação durante 18º dia de cada período. As amostras foram colhidas da veia coccígea utilizando-se tubos de vácuo (Vacuntainer) e conservadas em gelo até a chegada no laboratório. As amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 15 minutos. O plasma retirado foi armazenado em temperatura a -20°C. A mensuração da ureia foi obtida empregando-se reagente comercial da empresa Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil. A concentração de ureia no sangue é empregada como indicador do metabolismo proteico. A ureia é sintetizada no fígado proporcionalmente às concentrações de amônia produzida no rúmen e sua concentração sanguínea é diretamente relacionada com os níveis proteicos da alimentação e da relação energia/proteína (WITTNER et al. 1993).

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas das variáveis foram realizadas pelo software SAS - Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2010) utilizando o procedimento MIXED, sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias comparada pelo teste de Levene. Os dados foram submetidos à análise de variância, que contemplou como causas de variação o efeito de nível, como fator fixo, efeito de período, efeito de animal dentro de quadrado e efeito de quadrado, como efeitos aleatórios. As médias foram comparadas por regressão, com nível de significância 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Informações sobre o uso de substâncias húmicas como aditivo em ruminantes são escassos, assim, os resultados deste estudo nem sempre possuem referências para comparação direta, ocorrendo a necessidade de buscar pesquisas similares, como por exemplo a utilização de substâncias húmicas em outro tipo de animal ou pesquisas *in vitro*.

3.1 CONSUMO DE MATÉRIA SECA

A avaliação do CMS foi realizada com o objetivo de verificar se o uso de substâncias húmicas acarretariam em algum efeito, positivo ou negativo, sobre a ingestão de MS. Observou-se que a adição de substâncias húmicas em até 1,35% na dieta não interferiu no consumo de matéria seca dos animais e nem na relação entre a ingestão e o peso vivo do animal (Tabela 3).

Tabela 3: Efeito do uso de diferentes doses de substâncias húmicas sobre o consumo da dieta (kg/animal).dia⁻¹ e a relação entre a ingestão de matéria seca e peso vivo do animal.

Item*	Níveis de Substâncias Húmicas				EPM	P TRAT
	0	0,45	0,9	1,35		
CMS (kg/animal).dia ⁻¹	11,63	11,62	12,02	11,6	0,42	0,670
CPV (%PV)	1,77	1,78	1,84	1,78	0,05	0,663

CMS: Consumo de matéria seca (kg/animal/dia)

CPV: Relação entre a ingestão de matéria seca e o peso vivo do animal (kg de MS/100 kg PV)

EPM: Erro-padrão da média

P: Efeito de tratamento

Resultado similar foi descrito por Silva et al. (2011) que avaliaram bezerros em desaleitamento precoce, os quais receberam as substâncias húmicas em mistura no concentrado inicial desde o 15º dia após o nascimento até a oitava semana de vida. Terry et al. (2018) também não observaram diferenças no consumo avaliando bovinos Angus x Hereford com peso corporal inicial de 758 ± 40,7 kg e alimentados com uma dieta de 60% de silagem e 40% de concentrado.

3.2 PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO RUMINAL

3.2.1 MENSURAÇÃO DE pH E ÁCIDO GRAXO DE CADEIA CURTA

As alterações de pH têm grande influência no aproveitamento de alimentos e, para que ocorra uma fermentação ruminal adequada, um dos fatores é a manutenção do pH entre 5,5 e 7,2 (MARINO et al., 2009). Dietas exclusivamente de forragens apresentam pH com baixa variação,

entre 6,6 e 6,9, mas ocorre diminuição deste com o fornecimento de concentrado (VAN KESSEL; RUSSEL, 1996). No presente estudo, as médias de pH foram entre 6,2 e 6,4 (Tabela 4), não ocorrendo diferença entre os tratamentos, que resultaram em valores considerados adequados para o bom funcionamento ruminal, evitando assim distúrbios metabólicos (SENE, 2017). Terry et al. (2018) utilizando bovinos e variando os tratamentos entre 100 e 300 mg de substâncias húmicas por kg de peso vivo observaram resultados similares, obtendo médias de pH entre 6,21 e 6,30.

A dieta utilizada no presente estudo não continha em sua composição elevados níveis de concentrado e é conhecido que dietas com elevado teor de concentrado e com alto teor de amido, por exemplo, é uma das principais causas da ocorrência da queda no pH ruminal em razão do acúmulo de ácido láctico. Portanto, o pH ruminal é estreitamente relacionado com a composição da dieta, sendo importante estudos adicionais sobre o efeito de substâncias húmicas em dietas com elevado teor de concentrado.

Tabela 4: Efeito do uso de diferentes doses de substâncias húmicas sobre o pH e sobre os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) observados no fluido ruminal de bovinos confinados.

Variável	Níveis de Substâncias húmicas				EPM	P	TRAT	
	0	0,45	0,9	1,35			TRAT	Linear
pH	6,4	6,3	6,4	6,2	0,126	0,299		
Acético (mM)	78,77	75,31	80,69	77,16	1,94	0,626	0,9663	0,9923
Propiônico (mM)	23,24	21,75	21,73	21,21	0,54	0,427	0,1495	0,5965
Butírico (mM)	14,63	13,99	14,64	13,9	0,32	0,779	0,6111	0,9403
Isobutírico (mM)	1.49a	1.40ab	1.27bc	1.18c	0,03	0,0041	0,0004	0,9961
Isovalérico (mM)	2,59	2,29	2,44	2,27	0,05	0,445	0,2495	0,6826
Valérico (mM)	1.62a	1.45b	1.45b	1.37b	0,04	0,07	0,0192	0,508
Ace/Prop	3,44	3,52	3,71	3,63	0,04	0,208	0,0903	0,3828

Ace/Prop: Relação acético/propiónico

EPM: Erro-padrão da média

P: Efeito de tratamento

Médias seguidas de letras diferentes, na linha, são estatisticamente diferentes.

Cerca de 50% dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) produzidos no ruminoretículos são absorvidos nesse compartimento e outros 50% passam com fase fluida para o omaso e são absorvidos antes do duodeno (PRATTI DANIEL et al., 2006). Se a taxa de produção excede a de remoção, existe acúmulo de AGCC no rúmen, podendo desencadear distúrbios metabólicos (BAKER et al., 1999) com efeitos negativos sobre o desempenho e a saúde dos animais.

Segundo Van Soest (1994), os AGCCs produzidos pelos microrganismos do rúmen através das suas vias metabólicas, suprem até 85% das exigências de energia dos ruminantes e os AGCCs predominantes no fluido ruminal são os ácidos acético, propiônico e butírico.

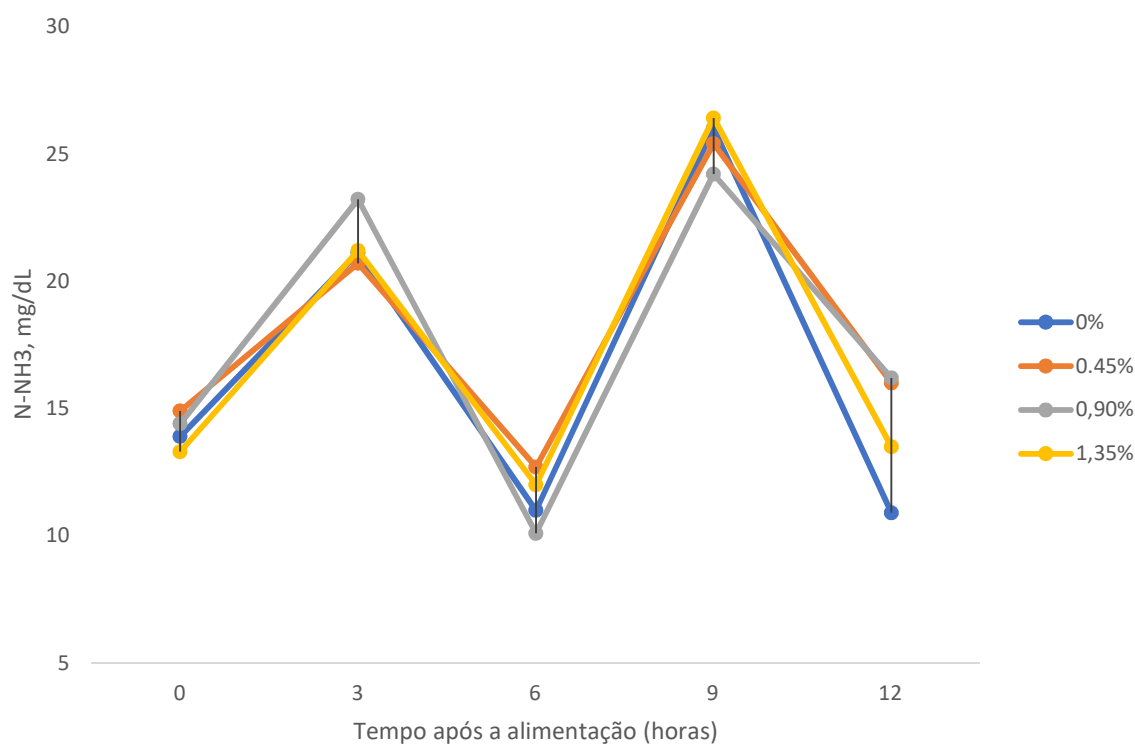
Neste estudo observou-se efeito de tempo ($P < 0,01$) para os ácidos acético, propiônico e butírico, mas não houve efeito de tratamento para essas concentrações molares. Também não foi observada interação tratamento*tempo para essas características. A relação acético/propiônico também não apresentou efeitos de tratamento ($P < 0,0903$) e interação tratamento*tempo ($P < 0,202$).

Observou-se diferença significativa entre os tratamentos nas concentrações de isobutírico e valérico. Para ambos os AGCCs foi detectado efeito linear decrescente, ou seja, a concentração molar diminuiu com o aumento da dose de substâncias húmicas. Isobutírico e valérico utilizam o aminoácido como substrato para sua produção, diferentemente do acético, propionato e butírico que utilizam carboidrato em sua rota metabólica (Van Soest, 1994). Possivelmente, com o aumento da dose de substâncias húmicas, ocorreu menor disponibilidade de aminoácido como substrato no rúmen, acarretando na diminuição da produção do isobutírico e valérico. Estes resultados diferem de Terry et al. (2018) que não observaram diferenças significativas nas concentrações de AGCCs utilizando diferentes doses de substâncias húmicas em bovinos. Resultados de AGCCs com a utilização de substâncias húmicas são limitados, principalmente isobutírico e valérico os quais são presentes em baixa concentração no rúmen (DIJKSTRA, 1993).

3.2.2 NITROGÊNIO AMONIACAL (N – NH₃)

A concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) no rúmen foi similar entre os tratamentos (Figura 5). Resultados contrastantes foram obtidos por Terry et al. (2018) que observaram uma resposta quadrática frente ao aumento das doses de substâncias húmicas (100, 200 e 300 mg por kg de peso vivo) em bovinos. Já Váradoyová et al. (2009) demonstraram *in vitro* que a adição de substâncias húmicas nas doses de 0,5%, 0,75%, 1%, 1,5% e 2% da matéria seca da dieta reduziu a quantidade de nitrogênio amoniacal (N-NH₃). Sheng et al. (2018) avaliaram *in vitro* a adição de substâncias húmicas nas doses de 0; 0,9; 1,8 e 2,7 mg.mL⁻¹ do líquido ruminal incubado e observaram a redução de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) após 12 horas de incubação, porém não obteve efeito após 48 horas.

Figura 5. Efeito do uso de diferentes doses de substâncias húmicas (0%; 0,45%; 0,90% e 1,35%) sobre a concentração do nitrogênio amoniacal ruminal em relação ao tempo. Alimentação fornecida às 8 e às 16 horas de cada dia experimental.



3.3 CONTAGEM DE PROTOZOÁRIOS

No presente estudo não houve efeito das substâncias húmicas sobre a população de protozoários (Tabela 5). Por outro lado, Terry et al. (2018) observaram uma resposta quadrática na população total de protozoários quando utilizaram as substâncias húmicas nas doses de 100, 200 e 300 mg.kg⁻¹ de peso vivo em bovinos. Váradyová (2009), *in vitro*, utilizando dietas de alta forragem e outra de alto concentrado, observou que a utilização de substâncias húmicas incrementou a população de *Enoplosplatron triloricaatum*, *Isotricha* spp. e *Ophryoscolex c. tricornatus*, mas não afetou a população de *Entodinium* spp.

Tabela 5. Contagem total e diferencial de protozoários ciliados ruminais de bovinos Nelore, alimentados com diferentes níveis de substâncias húmicas.

Item*	Níveis de Substâncias Húmicas				EPM	P TRAT
	0	0,45	0,9	1,35		
Protozoário (x10 ³ /mL)						
<i>Entodinium</i>	861,5	867,5	986,7	667,1	125,7	0,722
<i>Isotricha</i>	4,5	3,3	3,8	5,0	2,79	0,922
<i>Diplodiniinae</i>	8,6	11,4	9,2	6,9	3,7	0,982
<i>Dasytricha</i>	0,0	0,0	0,0	0,6	0,23	0,2436
Total	874,5	882,2	999,6	679,5	129,5	0,1526
Protozoário (%)						
<i>Entodinium</i>	98,6	98,5	98,7	98,2	0,51	0,7219
<i>Isotricha</i>	0,4	0,4	0,3	0,6	0,27	0,9218
<i>Diplodiniinae</i>	1,0	1,2	1,0	1,0	0,34	0,9817
<i>Dasytricha</i>	0,0	0,0	0,0	0,2	0,08	0,2436

EPM: Erro-padrão da média
P: Efeito de tratamento

Os protozoários são importantes no processo de fermentação ruminal e são aptos a digerir a maioria dos componentes dos alimentos, principalmente as fibras, sendo responsáveis por até 34% da degradação do material fibroso (KAMRA, 2005).

3.4 SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA

Não houve efeito de tratamento para o volume urinário (L/dia), assim como não ocorreu efeito de tratamento para os compostos urinários: ureia, creatinina e ácido úrico. A Alantoína como porcentagem (%) nos derivados de purina também não obteve efeito de tratamento, mas ocorreu diferença quadrática na avaliação da mesma quando avaliada em mmol/dia (Tabela 6).

Foi verificado efeito quadrático nas purinas microbianas absorvidas quando analisadas nas diferentes unidades: mmol/dia, g de N/dia e g N/kg PM. De acordo com Veth e Kolver (2001), a síntese microbiana é reduzida quando o pH encontra-se abaixo de 6 durante mais de 12 horas. Isso indica que a atividade microbiana pode ser influenciada por este parâmetro, mas neste estudo o pH manteve-se constante entre os tratamentos, inexistindo períodos longos com pH abaixo de 6.

Sheng et al. (2018) avaliaram *in vitro* as doses de 0,9, 1,8, 2,7 e 3,6 mg de substâncias húmicas/mL de líquido ruminal e observaram um incremento linear na produção de proteína microbiana, porém esse estudo avaliou o ambiente ruminal de animais Angus x Hereford. Os

autores concluíram que este resultado se deve às propriedades complexantes dos grupos carboxílicos e fenólicos presentes nas moléculas de substâncias húmicas. Estes grupos formam complexos solúveis e insolúveis com íons metais, assim como uma variedade de outros componentes orgânicos como proteínas, aminoácidos e peptídeos. A formação desses complexos reduz a proteólise de proteínas e a deaminação de aminoácidos para amônia. A amônia ruminal é produzida através do metabolismo de proteínas, peptídeos, aminoácidos, ureia, nitratos e outros compostos não proteicos. A menor degradação destas substâncias pode resultar em menores concentrações de nitrogênio amoniacal.

Tabela 6: Excreção urinária de derivados de purina e síntese de nitrogênio microbiano de Nelore confinados, alimentados com diferentes níveis de substâncias húmicas.

Variável	Níveis de Substâncias Húmicas				EPM	Probabilidade		
	0	0,45	0,9	1,35		TRAT	Efeito	
							Linear	Quadrático
Volume Urinário L/dia	13,21	13,30	12,93	17,11	0,97	0,29	-	-
Ureia Ugl (g/L)	26,11	24,04	27,14	21,22	1,76	0,56	-	-
Creatinina mmol/L	25,16	25,11	25,01	25,21	0,21	0,36	-	-
Alantoína mmol/L	7,65	7,54	7,66	6,42	0,45	0,57	-	-
Ácido úrico mmol/L	1,88	1,62	1,94	1,42	0,12	0,23	-	-
Alantoína mmol/dia	91,02 a	97,33 a	89,74 ab	83,47 b	2,01	0,01	p=0,0110	p=0,0160
Ácido úrico mmol/dia	22,37	20,95	25,26	21,11	1,24	0,67	-	-
AI (% DP)	80,11	82,36	78,33	80,95	0,84	0,40	-	-
PMA (mmol/dia)	75,62 a	80,58 a	76,82 a	60,86 b	2,66	0,02	p=0.0258	p=0.0274
CNM (g de N/kg PM)	0,43 a	0,45 a	0,43 a	0,35 b	0,02	0,05	p=0.0385	p=0.0496

ADP: Alantoína nos derivados de purina

PMA: Purinas microbianas absorvidas

CNM: Compostos nitrogenados microbianos

EPM: Erro-padrão da média

P: Efeito de tratamento

Médias seguidas de letras diferentes, na linha, são estatisticamente diferentes.

3.5 NÍVEIS DE UREIA PLASMÁTICA NO SANGUE

O excesso de amônia é absorvido através da parede ruminal e metabolizado no fígado, onde é convertido em ureia, forma pela qual é excretada pela urina ou reciclada pela parede ruminal e saliva. Entretanto, este processo gasta energia para metabolizar N-NH₃ em ureia, diminuindo a disponibilidade de energia para o animal. Quando absorvida em grande quantidade, a amônia pode exceder a capacidade hepática de detoxicação e acumular-se no sangue, podendo causar intoxicação (AZEVEDO, 2008).

Neste experimento não foi observado efeito das substâncias húmicas sobre os níveis de ureia no plasma sanguíneo (Tabela 7). Resultado similar foi constatado por Terry et al. (2018) que avaliaram amostras sanguíneas retiradas da veia jugular 6 horas após a alimentação de bovinos Angus x Hereford. Da mesma forma, Silva et al. (2011) coletaram sangue de bezerros semanalmente, 2 horas após a alimentação matinal e também não observaram diferenças significativas na concentração de ureia no plasma sanguíneo.

Tabela 7: Efeito de diferentes níveis de substâncias húmicas sobre a concentração de ureia plasmática em dietas de bovinos Nelore.

Item	Níveis de Substâncias Húmicas				EPM	Tempo		EPM	<i>P</i>		
	0	0,45	0,9	1,35		0	3		TRAT	TEMPO	TRAT*TEMPO
Ureia Sangue, mg/dL	42,5	46,7	42,57	39,95	2,73	40,59	45,25	1,79	0,288	<0,0001	0,109

EPM: Erro-padrão da média

P: Efeito de tratamento

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

O presente estudo trata da investigação sobre o uso de um produto inovador, o qual tem sido estudado recentemente como uma alternativa ao uso de antibióticos como aditivo na dieta de bovinos de corte, com o principal objetivo de manter a produtividade e diminuir idade ao abate, preconizando o abate de animais jovens que contribuem para uma carne de melhor qualidade ao consumidor. Contudo, ainda são escassos os trabalhos e pouco se conhece sobre seus reais benefícios nesta espécie animal. Porém, observa-se que as substâncias húmicas apresentam um potencial de uso na alimentação animal, mas demanda estudos com maior profundidade, por exemplo, avaliações sobre o metabolismo e desempenho de animais que recebessem uma dieta nutricionalmente mais desafiadora, com elevados teores de concentrado. Além disso, estudar seus efeitos em relação à influência da raça, idade, categoria animal e, ainda, efeitos comparativos ao uso de aditivos convencionais como ionóforos e antibióticos, ou mesmo associações entre as substâncias húmicas e outro aditivo poderão contribuir com informações importantes sobre o uso desse tipo de aditivo na dieta de bovinos. No entanto, investigações preliminares, como as deste estudo, indicam que o uso de substâncias húmicas como aditivo na dieta de bovinos não foi prejudicial e que ainda existem muitas questões para serem elucidadas sobre o uso deste produto.

Ressalta-se ainda, a importância da padronização quanto à metodologia de análise das substâncias húmicas, além de melhor caracterização da mesma nos estudos, em razão da heterogeneidade dos materiais disponíveis.

Neste estudo, observou-se que a adição de substâncias húmicas até o nível de 1,35 % na MS não influenciou os parâmetros ruminais dos animais que receberam uma dieta com 50% de concentrado.

5. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Comparações com aditivos comercialmente reconhecidos facilitarão a análise comparativa dos dados, relacionando-se os resultados das substâncias húmicas com outros materiais de atividade metabólica com ampla descrição pelo meio acadêmico. Adicionalmente pode-se estudar seus efeitos sobre dietas mais desafiadoras, com elevado teor de concentrado, diferentes formas de administração do produto (na ração, no concentrado, na água) e o formato que o mesmo é fornecido, sendo que é disponibilizado sólido em diferentes tamanhos de partículas e no meio aquoso.

6. REFERÊNCIAS

- ABIEC: Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. **Perfil da Pecuária no Brasil. Relatório Anual.** 2018. Disponível em: <<http://abiec.siteoficial.ws/images/upload/sumario-pt-010217.pdf>>. Acesso em 10 set, 2018.
- AOAC - OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists.** 18th ed. Gaithersburg, Maryland, 2005.
- ARAÚJO, J.C.; SILVA, J. H. V.; AMÂNCIO, A. L. L. et al. **Uso de aditivos na alimentação de aves.** Acta Veterinária Brasileira. V.1, n.3, p. 69-77, 2007.
- AZEVEDO, E. B. Incorporação de ureia encapsulada em suplementos protéicos fornecidos para novilhos alimentados com feno de baixa qualidade. **Ciência Rural**, 38. p. 1381-1387. 2008.
- BAKER, S. K. Rumen methanogens and inhibition of methanogenesis. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 50, p. 1293-1298, 1999.
- BNDES – BANCO NACIONAL DO DESENVOLVIMENTO. **Potencial de diversificação da indústria química brasileira.** Disponível em: <http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/produtos/download/aep_fep/chamada_publica_FEPprospec0311_Quimicos_Relat4_Aditivos_alimenticios_v34.pdf>. Acesso em: 03 set. 2018.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa 44/2015. Disponível em: <agricultura.gov.br> Acesso em: dezembro de 2018.
- CDFA: CALIFORNIA DEPARTMENT OF FOOD AND AGRICULTURE. **Humic Acid labeling aid.** Disponível em: <https://www.cdfa.ca.gov/is/ffldr/pdf/HumicAcid.pdf>. Acesso em: 02 jan. 2019.
- CHEN, X.B.; GOMES, M.J. **Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives – an overview of technical details.** INTERNATIONAL FEED RESEARCH UNIT. Bucksburnd, Aberdeen: Research Institute, p. 21, 1992.
- CHEN, Y.; CLAPP, C.; MAGEN, H. Mechanism of plant growth stimulation by humic substances: The role of organo-iron complexes. **Soil Science Plant Nutrition**, n.50, p.1089–95, 2004.
- CHIZZOTTI, M.L.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D. et al. **Excreção de creatinina em novilhos e novilhas.** In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, p.41, 2004.
- CUSAK, P. M. V. **Effects of a dietary complex of humic and fulvic acids (FeedMAX 15™) on the health and production of feedlot cattle destined for the Australian domestic Market.** Australian Veterinary Journal, v. 86, n. 1-2, p. 46-49, 2008.

- DEGIRMENCIOGLU, T. **Effects of Diets Containing Humic Acid on the Milk Yield, Milk Composition and Blood Metabolites in Saanen Goats.** Research Journal of Animal Sciences. 6.1: 4-7, 2012.
- DIJKSTRA, J. **Production and absorption of volatile fatty acids in the rumen.** Livestock Production Science, n. 39, p. 61-69, 1994.
- DEHORITY, B. A. **Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa.** Florida: CRC Press Inc., 1993. 96 p.
- DOREAU, M., MARTIN, C., MORGAVI, D. P. **Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale.** Animal, Volume 4: pp. 351-365, 2010.
- ELAM, N. A.; GLEGHORN, J. F.; RIVERA, J. D.; GALYEAN, M. L.; DEFOOR, P. J., BRASHEARS, M. M.; YOUNTS-DAHL, S. M. Effects of live cultures of *Lactobacillus acidophilus* (strains NP45 and NP51) and *Propionibacterium freudenreichii* on performance, carcass, and intestinal characteristics, and *Escherichia coli* O157 shedding of finishing beef steers. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 81, p. 2686- 2698, 2003.
- EMEA. THE EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICAL PRODUCTS. Committee for veterinary medicinal products - humic acids and their sodium salts - summary report. 1999. Disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500014416.pdf. Acesso em: 11 set. 2018.
- ERASMUS, L.J.; COERTZEL, R.F.; LEVITON, M.N.; CHEVAUX, E. A meta-analysis of the effect of monensin or live yeast or a combination thereof on performance of beef cattle. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 87, suppl. 2, 2009.
- ERWIN, E. S.; MARCO, G. J.; EMERY, E. M. Volatile fatty acids analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 44, n. 9, p. 1768-1771, 1961.
- FDA. **Guidance for Industry #209:** The judicious use of medically important antimicrobial drugs in food-producing animals. 2012.
- FDA. **Guidance for Industry #213:** new animal drugs and new animal drug combination products administered in or on medicated feed or drinking water of food-producing animals: recommendations for drug sponsors for voluntarily aligning product use conditions with GFI #209. 2013.
- FOLDAGER, J. **Protein requirement and non-protein nitrogen for high producing cow in early lactation.** Tese (Doutorado) – East Lansing – Michigan State University, 1977.
- GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. **Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics.** J. Nutr., Bethesda, v.125, p.1401-1412, 1995.

- GOMES, C. T. **Aditivos (monensina sódica, levedura e probióticos) para bovinos da raça Nelore terminados com rações com concentrado rico em co-produtos.** Dissertação de mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Piracicaba, 2009. 109 p.
- GOES, R. H. T. B.; ALVES, D. D.; VALADARES FILHO, S. C.; MARSON, É. P. Utilização de aditivos alimentares microbianos na alimentação de bovinos de corte e leite: Revisão. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoológicas.** v.8, n. 1, p. 47- 56, 2005.
- HAKAN, K. B.; GULTEKIN, Y.; OZGE, S. **Effects of boric acid and humate supplementation on performance and egg quality parameters of laying hens.** Rev. Bras. Cienc. Avic, vol. 14, n. 4, p. 283-289, 2012.
- HAYIRLI A.; ESENBUGA N.; MACIT M.; LACIN E.; KARAOGLU M.; KARACA H.; YILDIZ L. **Nutrition practice to alleviate the adverse effects of stress on laying performance, metabolic profile, and egg quality in peak producing hens: the humate supplementation.** Asian-australian journal of animal science, vol. 18, p. 1310-1319, 2005.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 19822:2018. Fertilizers and soil conditioners – Determination of humic and hydrophobic fulvic acids concentrations in fertilizer materials. Disponível em: <<https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:19822:ed-1:v1:en>>. Acesso em: 02 jan. 2019.
- ISLAM, K. M. S.; SCHUHMACHER, A.; GROPP, J. M. Humic acid Substances in Animal Agriculture. **Pakistan journal of nutrition**, vol. 4, n. 3, p. 126-134, 2005.
- KAMRA, D.N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, v.89, n.1, p.124-134, 2005.
- KARAOGLU, M.; MACIT, M.; ESENBUGA, N.; DURDAG, H. VE; BILGIN ÖC. **Effect of dietary humate on performance, slaughter, carcass and meat quality parameters of broilers.** **International journal of poultry science.** Vol. 6, p. 406-410, 2004.
- KEARL, L. C. **Nutrient requirements of ruminants in developing countries.** Logan: International Feedstuffs Institute, 1982. 381 p.
- KREHBIEL, C.R.; RUST, S.R.; ZHANG, G.; GILLILAND, S.E. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: performance response and mode of action. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 81, suppl. 2, p. E120-E132, 2003.
- KULASEK, G. A. A micromethod for determination of urea in plasma, whole blood and blood cells using urease and phenol reagent. **Polskie Archiwum Weterynaryjne**, Poland, v. 15, n. 4, p. 801-810, 1972.
- LAMAR, R. T.; TALBOT, K. H. **Critical comparison of humic acid test methods.** **Communications in soil science and plant analysis**, 40: 15, 2309 – 2322. 2009.
- LAMAR, R. T.; OLK, D.C.; MAYHEW, L.; BLOOM, P.R. A new standardized method for quantification of humic and fulvic acids in humic ores and commercial products. **Journal of AOAC International** 97: 721-730. 2014.

MACIEL, I.C.F.; SATURNINO, H.M.; BARBOSA, F.A.; FILHO, G.H.B.M.; COSTA, P.M.; MALACCO, V.M.R. **Virginiamicina na alimentação de ruminantes**. Caderno de Ciências Agrárias, v. 7, n. 1, pag.271-285, jan./abr. 2015.

MENEZES, L.F.G.; RESTLE, J.; BRONDANI, I.L.; et al. **Características da carcaça e da carne de novilhos superjovens da raça Devon terminados em diferentes sistemas de alimentação**. Revista Brasileira de Zootecnia, v.39, n.3, p.667-676, 2010.

MARINO, C. T. **Efeito do preparado de anticorpos policlonais sobre o consumo alimentar, fermentação ruminal e digestibilidade in vivo de bovinos suplementados com três fontes energéticas, 2008**. 121 p. Tese de Doutorado em Zootecnia. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, 2008.

MARINO, C. T.; OTERO, W. G.; BASTOS, J. P. S. T.; ARRIGONI, M. D. B.; RODRIGUES, P. H. M. Preparado de anticorpos policlonais como aditivo alimentar para bovinos. **Archivos. Zootecnia**, v. 58, p. 109-119, 2009.

MARTIN, S.A.; NISBET, D.J. Symposium: direct-fed microbials and rumen fermentation. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 75, n. 6, p. 1736-1744, 1992.

MARTIN, S. A. Manipulation of ruminal fermentation with organic acids: a review. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, n. 12, p. 3123-3132, 1998.

MCGUFFEY, R. K.; RICHARDSON, L. F.; WILKINSON, J. I. D. Ionophores for dairy cattle: current status and future outlook. **Journal of Dairy Science**, v. 84, suppl. E, p. 194-203, 2001.

MCMURPHY, C. P et al. **Effects of supplementing humates on rumen fermentation in Holstein steers**. South Africa Journal of Animal Science, 41 (number 2), 2011.

MCMURPHY, C. P. **Effects of Humic/fluvic acid on rumen fermentation in Holstein steers**. Tese de Mestrado no Departamento de Ciência Animal da Universidade do Arizona. 71 p. 2007.

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

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. **Estudo de viabilidade técnica e econômica destinado à implantação do parque produtivo nacional de aditivos da indústria de alimentação de animais de produção**. Disponível em: <http://investimentos.mdic.gov.br/public/arquivo/arq1361372594.pdf>. Acesso em: 10 set. 2018.

MORA, V. et al. Action of humic acid on promotion of cucumber shoot growth involves nitrate-related changes associated with the root-to-shoot distribution of cytokinins, polyamines and mineral nutrients. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, n. 8, p. 633-642, 2010.

NAGARAJA, T.G.; NEWBOLD, C.J.; VAN NEVEL, C.J. Manipulation of ruminal fermentation. In: HOBSON PN, STEWART CS (1997) **The rumen microbial ecosystem**. London: *Blackie Academic and Professional* 523-632, 1997.

- NEVES, P. C. P. **Introdução à mineralogia prática**. Canoas: Ed. ULBRA, 2008. 336 p.
- NICODEMO, M. L. F.; **Uso de aditivos na dieta de bovinos de corte**. Embrapa Gado de Corte. Campo Grande-MS. 54 p. 2001.
- OLIVEIRA, C.A.; MILLEN, D.D. Survey of the nutritional recommendations and management practices adopted by feedlot cattle nutritionists in Brazil. **Animal Feed Science and Technology**, v. 197, p. 64–75, 2014.
- ORTOLAN, J. H. Efeito de aditivos no metabolismo ruminal e parâmetros sanguíneos em bovinos. 2010. 66f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Curso de Pós graduação em Zootecnia e Engenharia de alimentos, Universidade de São Paulo.
- PENNER, G. BEAUCHEMIN, K. A. Variation among cows in their susceptibility to acidosis: challenge or opportunity? **Adv. Dairy technology**. 22, p. 173-187.
- PENNER, G. B.; BEAUCHEMIN, K. A.; MUTSVANGWA, T.; An evaluation of the accuracy and precision of a stand-alone submersible continuous ruminal pH measurement system. **Journal Dairy Science**, 89, p. 2132-2140, 2006.
- PENNER, G. B.; BEAUCHEMIN, K. A.; MUTSVANGWA, T.; Severity of ruminal acidosis in primiparous Holstein cows during the periparturient period. **Journal Dairy Science**, 90, p. 365-375, 2007.
- PRATTI DANIEL, J. L.; RESENDE JUNIOR, J. C.; CRUZ, F. J. Participação do ruminoretículo e omaso na superfície absorptiva total do proventrículo de bovinos. **Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 43, n. 5, p. 688-694, 2006.
- RODDA, M. R. C. et al. Estímulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto. I - Efeito da concentração. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**. v. 30, n. 4, p. 649-656, 2006.
- ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; TOLEDO, R.S. **Enzimas e probióticos em rações para aves**. V SIMPÓSIO ACETAV – ATUALIDADES AVÍCOLAS, 5. Fortaleza. Anais. Fortaleza: ACETAV. 2000.
- SAS Institute Inc. **Statistical Analysis System user's guide**. Ed. Cary: SAS Institute, USA, 2010.
- SENE, G.A. **Aditivos orgânicos para bovinos confinados com dietas de alto concentrado**. 2017. 65f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2017.
- SHENG, P.; RIBEIRO JUNIOR, G. O.; WANG, Y.; McALLIESTER, A.; Humic substances reduces ruminal methane production and increases the efficiency of microbial protein synthesis *in vitro*. **J. Sci. Food agric**. 2018. doi: 10.1002/jsfa.9407.

SILVA, J. T.; BITTAR, C. M. M.; FERREIRA, L. S.; Desempenho e desenvolvimento ruminal em resposta ao fornecimento de substâncias húmicas para bezerros leiteiros em sistema de desaleitamento precoce. **Acta Scientiarum Animal Sciences**. V. 33, n. 4, p. 395-401, 2011.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 2.ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2002. 178 p.

SINDIRAÇÕES – SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DA ALIMENTAÇÃO ANIMAL. **Boletim informativo do setor** – Junho/2015. Disponível em: http://sindiracoes.org.br/wpcontent/uploads/2015/06/boletim_informativo_do_setor_junho_2015_sindiracoes_site.p df. Acesso em: 18 out. 2015.

SITTA, C.; **Aditivos (ionóforos, antibióticos não ionóforos e probióticos) em dietas com altos teores de concentrado para tourinhos da raça Nelore em terminação**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Brasil. 2011.

STEVENSON, F. J. **Humus Chemistry: genesis, composition, reactions**. New York: Wiley & Sons, 1994. 496 p.

TERRY, S. A. et al.; Effect of humic substances on rumen fermentation, nutrient digestibility, methane emissions, and rumen microbiota in beef heifers, **Journal of Animal Science**, Volume 96, p. 3863–3877, 2018.

TREVISAN, S. et al. Humic substances affect Arabidopsis physiology by altering the expression of genes involved in primary metabolism, growth and development. **Environmental and Experimental Botany**, v. 74, n. 1, p. 45-55, 2011.

VAN KESSEL, J.A.S.; RUSSEL, J.B. The effect of pH on ruminal methanogenesis. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 20, p. 205- 210, 1996.

VAN RENSBURG C.J.; VAN RENSBURG C.E.J.; VAN RYSSSEN J.B.J.; CASEY N.H.; ROTTINGHAUS G.E. *In vitro* and *In vivo* assessment of humic acid as an aflatoxin binder in broiler chickens. **Poultry Science**. Vol. 85, p. 1576-1583, 2006.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. Ed. New York: Cornell University Press. 476 p. 1994.

VÁRADYOVÁ, Z.; KISIDAYOVÁ, S; JALC, D. Effect of humic acid on fermentation and ciliate protozoan population in rumen fluid of sheep *in vitro*. **Journal Science Food Agriculture**, 89, 1936-1941. 2009.

VERBIC, J.; CHEN, X.B.; MACLEOD, N.A. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. **Journal of Agricultural Science**, v.114, n.3, p.243-248, 1990.

VETH, M. J.; KOLVER, E. S. Diurnal variation in pH reduces digestion and synthesis of microbial protein when pasture is fermented in continuous culture. **Journal of Dairy Science**. Sep; 84(9):2066-72.

WALLACE, R.J.; NEWBOLD, D.C.J. Probiotics for ruminants. In: FULLER, R. (Ed.) **The Scientific Basis of the Probiotic Concept**. London, Chapman Hall, 1992. 317p.

WITTEWER, F.; REYES, J.M; OPITZ, H. et al. Determinación de úrea em muestras de leche de rebaños bovinos para el diagnóstico de desbalance nutricional. **Arch. Med. Vet.** 25, 165-172. 1993.

YORUK M.A.; GUL M.; HAYIRLI A.; MACIT M. The effects of supplementation of humate and probiotic on egg production and quality parameters during the late laying period in hens. **Poultry Science**. Vol. 83, p.84-88, 2004.