

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**MONENSINA SÓDICA OU ANTICORPOS POLICLONAIIS
CONTRA BACTÉRIAS PRECURSORAS DE DISTÚRBIOS
NUTRICIONAIS EM BOVINOS INDUZIDOS À ACIDOSE
RUMINAL**

RODRIGO DIAS LAURITANO PACHECO

Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em
Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do
Título de Doutor em
Zootecnia.

BOTUCATU – SP
DEZEMBRO / 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**MONENSINA SÓDICA OU ANTICORPOS POLICLONAIIS
CONTRA BACTÉRIAS PRECURSORAS DE DISTÚRBIOS
NUTRICIONAIS EM BOVINOS INDUZIDOS À ACIDOSE
RUMINAL**

RODRIGO DIAS LAURITANO PACHECO
Zootecnista

ORIENTADOR: Prof. Dr. MÁRIO DE BENI ARRIGONI
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. PAULO H. M. RODRIGUES

Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em
Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do
Título de Doutor em Zootecnia.

BOTUCATU – SP
DEZEMBRO / 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

P116m Pacheco, Rodrigo Dias Lauritano, 1983-
Monensina sódica ou anticorpos policlonais contra bactérias precursoras de distúrbios nutricionais em bovinos induzidos à acidose ruminal / Rodrigo Dias Lauritano Pacheco.
- Botucatu : [s.n.], 2010
vii, 118 f. : tabs., gráfs., ils. color.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2010
Orientador: Mário De Beni Arrigoni
Co-orientador: Paulo Henrique Mazza Rodrigues
Inclui bibliografia.

1. *Streptococcus bovis*. 2. Imunização passiva. 3. Aditivos alimentares. I. Arrigoni, Mário De Beni. II. Rodrigues, Paulo Henrique Mazza. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. IV. Título.

Dedicatória

Dedico aos meus pais que, desde minha tenra idade, me despertaram para a grande pergunta da vida: por quê? Hoje posso dizer que com os sacrifícios e senso de ética deles, foi forjada em mim a alma de um cientista.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer meu orientador, o Prof. Mário Arrigoni por todos esses anos de companheirismo, amizade e voto de confiança. Hoje entendo a importância de permitir que os alunos desenvolvam a criatividade e senso crítico próprios. Espero poder propagar a maneira com que ele conduz e forma “pessoas”.

Ao meu co-orientador, o Prof. Paulo Mazza por ter disponibilizado seu tempo, instalações, animais e time de trabalho, sem os quais seria impossível desenvolver um trabalho de qualidade. Espero sempre poder aplicar a forma séria e criteriosa de conduzir pesquisa que aprendi com ele.

Também gostaria de agradecer à Carol Marino pela amizade e por todo suporte técnico e psicológico na condução de meu doutorado. Gostaria que esse fosse o primeiro trabalho, conduzido em parceria, de muitos ao longo de minha carreira. Grande parte das idéias e suor na condução deste projeto de pesquisa se deve a ela.

Ao Danilo, companheiro de empreitadas, ao longo de todos esses anos. Juntos, conquistamos muitas realizações que outrora eram apenas sonhos.

À Profa. Cyntia Martins pela amizade e suporte ao longo de meu mestrado e doutorado.

Ao Johnny, primeiramente pela grande amizade, e pela ajuda na condução do experimento.

Aos funcionários da USP de Pirassununga: Gilmar, Gilson, Ari, Simi e Everson, pelos ensinamentos compartilhados, paciência e momentos de descontração.

Ao Tarley pela amizade e por ter ajudado nas análises laboratoriais.

Aos meus amigos de Pirassununga por terem me cedido gentilmente um abrigo e momentos de alegria no decorrer desses meses.

Um agradecimento especial aos animais que cederam incondicionalmente seus corpos e energia vital para a condução dos experimentos. Se fosse possível, eu pediria desculpas pelo desconforto causado com o desafio de concentrados e espaço limitado durante a condução do experimento.

À grande “matilha” formada pelos estudantes orientados pelo Prof. Mário. Sempre foi um grande prazer trabalhar com vocês ao longo desses anos. Grande parte de meus conhecimentos científicos e de vivência pessoal foram adquiridos com vocês.

Aos funcionários da UNESP pelo total suporte durante meus anos vividos como aluno.

À FAPESP pelo apoio financeiro que me permitiu avançar nos estudos e conhecer os mais renomados pesquisadores de minha área.

À CAMAS Incorporated pelo voto de confiança em financiar os projetos com anticorpos policlonais no Brasil.

Ao Prof. Nicolas DiLorenzo e Prof. Alfredo DiCostanzo por sempre nos auxiliarem na condução de pesquisas com anticorpos.

Ao grande amor de minha vida, Daniela. Espero ter uma vida longa ao seu lado, pois tenho certeza que será muito prazerosa.

Ao Kamae e Kami por sempre me mostrarem o momento exato de parar de trabalhar e começar a cuidar da família.

Ao Gustavo e Marco por todo o apoio e amizade.

Ao Sensei Edson e à Flavia por me ensinarem a realmente pensar nas coisas e na vida.

A todos que não estão citados aqui e que contribuíram para minha formação tanto pessoal quanto científica.

LIÇÕES APRENDIDAS POR UM DOUTORANDO

“A ciência termina onde começa o ego”

(Eis meu grande aprendizado de doutorado)

“Um experimento é considerado bom se for possível responder a pergunta proposta e levantar pelo menos outras três”

(Dr. C. Ferrel)

“Não existe pergunta idiota e sempre tratem os outros de forma cavalheresca, mesmo ao criticá-los, na maioria das vezes as pessoas tentam fazer o melhor com o que possuem no momento”

(Dr. F. Owens)

“Reputação é o seu maior valor na comunidade científica”

(Dr. M. Brown)

“Ainda, a melhor tecnologia experimental é aquela ferramenta atrás dos olhos”

(Dr. M. Galyean)

“Compaixão é a resposta para toda a forma de vazio que sentes”

(Um espírito de luz ao meu ouvido)

“A condição básica para se fazer pesquisa é ser honesto”

(Dr. P. Leme)

The ride (Chris Ledoux)

Well I know some day farther down the road
I'll come to the edge of the great unknown
There'll stand a black horse riderless
And I wonder if I'm ready for this

So I'll saddle him up and he'll switch his tail
And I'll tip my hat and bid fairwell
And lift my song into the air
That I learned at that dusty fair

“Sit tall in the saddle, Hold your head up high
Keep your eyes fixed where the trail meets the sky
And live like you ain't afraid to die
And don't be scared, just enjoy your ride”

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	11
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	12
REVISÃO DE LITERATURA	15
<i>Fermentação ruminal</i>	15
<i>Acidose Ruminal</i>	17
<i>Monensina sódica</i>	23
<i>Resistência bacteriana aos ionóforos versus saúde humana</i>	27
<i>Imunização ativa contra bactérias produtoras de lactato</i>	30
<i>O uso potencial de anticorpos aviários como aditivos alimentares</i>	31
<i>Parâmetros ruminais, desempenho e características de carcaça de bovinos tratados com anticorpos policlonais aviários</i>	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
 CAPÍTULO 2	 48
 FERMENTAÇÃO RUMINAL DE BOVINOS INDUZIDOS À ACIDOSE TRATADOS COM MONENSINA SÓDICA OU ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA BACTÉRIAS PRECURSORAS DE DISTÚRBIOS NUTRICIONAIS	 49
RESUMO	49
ABSTRACT	51
INTRODUÇÃO	53
MATERIAL E MÉTODOS	54
RESULTADOS	59
DISCUSSÃO	62
IMPLICAÇÕES	70
LITERATURA CITADA	71

CAPÍTULO 3	90
SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA DE BOVINOS INDUZIDOS À ACIDOSE RUMINAL TRATADOS COM MONENSINA SÓDICA OU ANTICORPOS POLICLONAIS CONTRA BACTÉRIAS PRECURSORAS DE DISTÚRBIOS NUTRICIONAIS	91
RESUMO	91
ABSTRACT	92
INTRODUÇÃO	93
MATERIAL E MÉTODOS	94
RESULTADOS	99
DISCUSSÃO	100
IMPLICAÇÕES.....	101
LITERATURA CITADA	102
CAPÍTULO 4	116
IMPLICAÇÕES	117

CAPÍTULO 1

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Desde a publicação do livro “An essay on the principle of population” redigido por Thomas R. Malthus no ano de 1798, a sociedade moderna pós-revolução industrial despertou para a aflição de que chegará o tempo em que a falta de alimento e espaço físico serão os fatores limitantes para o desenvolvimento humano. Essa teoria é baseada na observação de que, na maioria das vezes, o crescimento populacional de determinado organismo ocorre em ordem geométrica, enquanto os recursos naturais (por exemplo: fontes de alimentos) crescem em progressão linear. Desta forma, em algum período da história a humanidade sofrerá com a fome, doenças e conflitos armados.

Apesar de passados mais de dois séculos, a teoria Maltusiana ainda é aceita na área biológica. O exemplo mais próximo da nutrição de bovinos, tema central de investigação do presente trabalho científico, é o crescimento das bactérias ruminais durante o distúrbio nutricional denominado de acidose, cujo padrão obedece totalmente o descrito por esse cientista. Contudo, ao extrapolar esta teoria para a população humana, Malthus não preveu a capacidade do desenvolvimento tecnológico na produção de alimentos. A revolução verde foi capaz de amenizar ou, pelo menos, postergar o tempo em que tal aflição se concretize.

Em contrapartida, de acordo com o relatório emitido pela FAO (2002), órgão das Nações Unidas responsável pela produção de alimentos e agricultura, foi previsto que ao redor do ano 2030 será necessária a ocorrência de outra revolução verde para a erradicação da fome mundial. Os fatores mais intrigantes presentes neste documento são a constatação de que o crescimento populacional mundial está desacelerando, causado pela globalização do estilo moderno vida, que requer maior poder aquisitivo e menor número de filhos, juntamente com o fato de que as áreas de maiores produções de alimentos sofrem com intensas erosões. Em outras palavras, não desempenham a máxima capacidade produtiva e tão pouco são manejadas de forma sustentável. Portanto, torna-se claro que o caminho a ser seguido é o aumento da eficiência produtiva aliada a sistemas sustentáveis de produção.

A partir da observação dos elos formadores da cadeia produtiva de carne bovina brasileira, tal busca por maior eficiência produtiva é bastante evidente. Dentre todos, o ciclo de engorda é o elo que mais investiu em tecnologias de intensificação do sistema

produtivo. Um exemplo é demonstrado pelo constante aumento dos confinamentos brasileiros. Em 2006, no Brasil foram confinados 933.967 animais somente nos 50 maiores confinamentos (Cavalcanti e Camargo, 2007). A projeção para o ano de 2007 foi de um crescimento de 43,12% no número de animais desses projetos, podendo ter atingido o total de 1.336.700 de animais confinados.

Em um estudo mais recente (Millen et al., 2009), cujo objetivo foi levantar informações sobre o manejo, dieta e tipo de animal alimentado no sistema de confinamento brasileiro, partindo-se de informações geradas por nutricionistas atuantes tanto no campo quanto em instituições de pesquisa, observou-se que esse sistema de produção abriga anualmente cerca de 3.163.750 de animais e correspondeu a 8,70% dos animais abatidos no ano de 2009.

Relacionado ao tamanho das operações, 70% dos confinamentos assistidos por esses nutricionistas alimentam até 5.000 animais por ciclo de engorda, enquanto 25,8% das instalações possuem a capacidade estática entre 5.000 e 10.000 cabeças. Instalações com a capacidade estática acima de 10.000 animais são cada vez mais comuns, a exemplo da região Centro-Oeste do país, onde já existem algumas com potencial de atingir mais 100.000 cabeças engordadas/ano.

A mudança de tamanho na atividade de confinar bovinos de corte leva a manejos nutricionais diferenciados. Maior inclusão de grãos e co-produtos em dietas de terminação torna-se alternativa interessante, pois alta eficiência alimentar é conseguida e, principalmente, reduz a demanda de terra agricultável para a produção de volumosos. A Associação dos Confinadores do Brasil (Assocon, 2007) revela que é corriqueira a administração de dietas com teores de concentrados superiores a 60%. Millen et al. (2009) reportaram que 38,7% dos consultores de confinamento administram dietas contendo entre 56 e 70% de concentrados (grãos juntamente com outros tipos de concentrados, como co-produtos) e também outros 38,7% dos técnicos recomendam dietas entre 71 e 80% de concentrados.

Dietas com o perfil citado acima, de alta proporção de carboidratos rapidamente fermentáveis, favorecem o aparecimento de distúrbios nutricionais, como a acidose (Owens et al., 1998). Na tentativa de prevenir a ocorrência deste distúrbio metabólico, nutricionistas utilizam corriqueiramente aditivos alimentares denominados de ionóforos.

Por conseguinte, o mercado consumidor internacional da carne bovina brasileira está mais exigente e impõe regras mais severas sobre a segurança do alimento, abrangendo desde sanidade, rastreabilidade e, mais recentemente, a menor inclusão de antibióticos na produção animal. A Comunidade Européia, através do Regulamento (EC) N° 1831/2003 (Europa, 2003), determinou a proibição da utilização de antibióticos como aditivos alimentares para bovinos. Alguns princípios farmacêuticos já não se encontram em comercialização e outros, porém, estão sendo retirados de forma gradual. Apesar de não haver comprovação científica, esta medida foi adotada como prevenção à possível relação entre o aumento da incidência de microrganismos resistentes aos antibióticos, observado na medicina humana, e o uso destas substâncias nas rações animais.

Ionóforos são quimicamente classificados como antibióticos poliéteres (Hirohiko et al., 1994). Organizações como a NCBA (National Cattlemen Beef Association) americana fazem esforços para reclassificá-los de outra maneira, baseado no fato que estes não têm função terapêutica quando usados nas dietas de bovinos (exceto quando recomendados como anticoccidostáticos) e tão pouco são usados como agentes terapêuticos em medicina humana. Entretanto, o uso dessas substâncias como promotores de crescimento ainda se encontra proibido nos países da União Européia.

Assim, surge a oportunidade de pesquisa e desenvolvimento de novos aditivos alimentares que desempenhem funções semelhantes aos ionóforos e, que sejam seguros à saúde humana (Newbold, 2007). Neste caso, a imunização passiva de bovinos que recebem dietas contendo alta proporção de concentrado com anticorpos policlonais aviários contra bactérias ruminais precursoras de distúrbios nutricionais como a acidose e abscesso hepático, podem se revelar como uma nova alternativa que preencha o requisito de intensificação ligada ao menor uso de antibióticos.

A forma de ação dos anticorpos não atua diretamente na modificação do DNA ou RNA do patógeno alvo (Kelley e Lewin, 1986). Consequentemente, em teoria, pouco contribuem para o aparecimento de microrganismos resistentes e, caso ocorra resistência, novos anticorpos podem ser criados a partir dos microrganismos resistentes. No entanto, essa tecnologia ainda está em fase inicial de desenvolvimento e ainda são necessários diversos ensaios científicos para a avaliação e posterior recomendação de uso em escala comercial.

A fim de validar o potencial desse tipo de anticorpo como aditivo alimentar em animais desafiados com dietas de alta proporção de carboidratos prontamente fermentescíveis, o presente trabalho científico foi desenvolvido para primeiramente, avaliar o preparado de anticorpos policlonais na forma sólida como aditivo alimentar preventivo à acidose ruminal e substituto aos ionóforos, e também para verificar se ocorre mudanças na síntese de proteína microbiana de bovinos induzidos a esse distúrbio nutricional, tratados com os anticorpos ou com os ionóforos. Dessa forma, a tese é intitulada “Monensina sódica ou anticorpos policlonais contra bactérias precursoras de distúrbios nutricionais em bovinos induzidos à acidose ruminal”. Os pré-requisitos vigentes para a defesa de doutorado nesta instituição exigem a redação de dois artigos científicos. Desta maneira, o trabalho foi dividido em: Capítulo 2- “Fermentação ruminal de bovinos induzidos à acidose tratados com monensina sódica ou anticorpos policlonais contra bactérias precursoras de distúrbios nutricionais”, enquanto o Capítulo 3 recebe o título “Síntese de proteína microbiana de bovinos induzidos à acidose ruminal tratados com monensina sódica ou anticorpos policlonais contra bactérias precursoras de distúrbios nutricionais”. As normas adotadas para a publicação de ambos os capítulos seguem as do periódico *Journal of Animal Science*.

O Capítulo 4 denominado de “Implicações” reúne as reflexões geradas pela experiência da condução do experimento, aliadas às recomendações de futuros ensaios científicos e linhas de pesquisas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fermentação ruminal

A fermentação ruminal é o resultado das atividades físicas e microbiológicas pelas quais os componentes da dieta são convertidos em produtos úteis (ácidos graxos de cadeia curta, proteína microbiana e vitaminas do complexo B), inúteis (CH_4 e CO_2) e até prejudiciais, dependendo das concentrações (amônia e nitrato), para o animal hospedeiro. Animais ruminantes cultivam populações microbianas no rúmen pelo fornecimento regular de alimento mastigado, adição de substâncias tamponantes e remoção dos ácidos produzidos pela fermentação, remoção dos produtos microbianos

junto aos resíduos indigestíveis de alimentos e manutenção das condições do ambiente ruminal (pH, temperatura e umidade) adequadas para o crescimento microbiano (Owens e Goetsch, 1988).

No interior do rúmen, polímeros como os carboidratos, proteínas e lipídios advindos do alimento necessitam ser reduzidos a compostos químicos menores, até a formação de monômeros para a fermentação microbiana ou absorção. Os produtos finais da fermentação ruminal incluem os ácidos graxos de cadeia curta, CH₄, CO₂, N-amoniaco e organismos microbianos (**Tabela 1**).

Tabela 1-Resumo da formação dos produtos da fermentação ruminal

Componente alimentar aproximado	Constituinte químico (polímero)	Componente químico (monômero)	Produto da fermentação Ruminal
Extrativo não nitrogenado	Carboidratos (hexosanos)	Glicose e outras hexoses	Acetato, propionato e butirato
Fibra detergente neutro	Pentosanos	Pentoses	Acetato, propionato e butirato
Proteína bruta	Proteína verdadeira N-não protéico	Aminoácidos	Como acima, isobutirato, isovalerato e amônia
Extrato etéreo	Triglicerídios e galactoses	Glicerol e ácidos graxos	Propionato e ácidos graxos saturados
Cinzas	Minerais	Elementos	Elementos reduzidos + células microbianas + CO ₂ e CH ₄

Fonte: Adaptado de Owens e Goetsch (1988).

Os produtos finais da fermentação ruminal diferem de acordo com o tipo de dieta fornecida ao animal, principalmente, devido à preferência e afinidade microbiana aos carboidratos específicos. Dietas baseadas em forragem são ricas em celulose, intermediárias em açúcares solúveis e com baixas quantidades de amido (Kaufmann et al, 1980). Assim, bactérias celulolíticas e sacarolíticas serão as mais ativas e, conseqüentemente, a digestão da celulose e fermentação dos açúcares solúveis por essas comunidades microbianas resultarão na grande produção de acetato (Owens e Goetsch,

1988). Contrariamente, em dietas compostas por amido, bactérias amilolíticas compõem a maior parte da população microbiana e competem pelos substratos (carboidratos solúveis, produtos da fermentação do amido e hemicelulose) em condições de pH normalmente mais baixas que as encontradas em dietas de forragem e produzem mais propionato (Kaufmann et al, 1980; **Figura 1**).

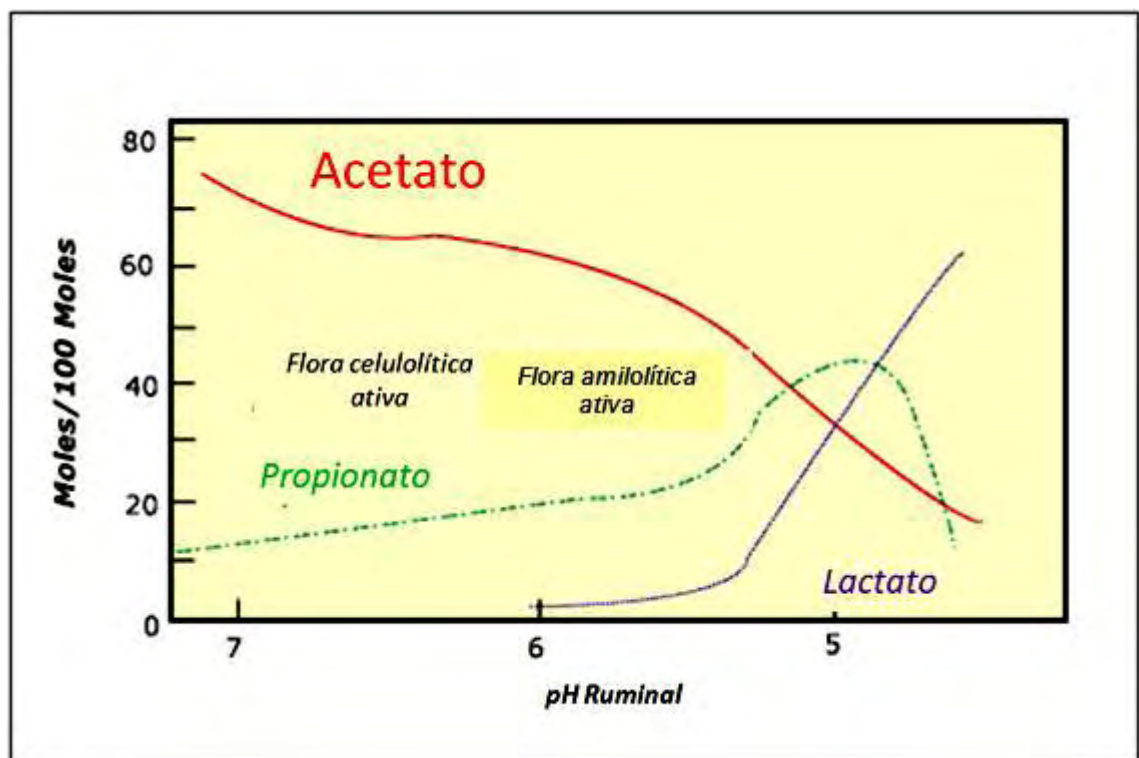


Figura 1. Relação do pH ruminal com as proporções de acetato, propionato e lactato. Adaptado de Kaufmann et al. (1980).

Portanto, para que ocorra a fermentação ruminal estável, a microbiota ruminal deve estar adaptada ao respectivo substrato dietário. Dessa forma, com mudanças bruscas de dietas, principalmente passando-se de dietas compostas por alta proporção de fibra, para alto concentrado ou amido, a quebra no equilíbrio da relação de mutualismo entre a população microbiana ruminal e o animal hospedeiro, é esperada. Este é o começo do distúrbio nutricional mais estudado em ruminantes: a acidose ruminal.

2.2. Acidose ruminal

O sucesso dos ruminantes ao longo de sua evolução pode ser explicado pela grande habilidade de digerir componentes fibrosos de plantas e obter energia, a partir da fermentação desse substrato. O fato de abrigarem microrganismos fornecedores de enzimas que degradam fibra garante vantagem competitiva de produção quando comparado aos outros animais (Russell e Rychlik, 2001).

No entanto, a partir do momento em que os animais são abruptamente expostos à mudança de dieta, passando de forragens para concentrados ou recebem grandes proporções de carboidratos prontamente fermentáveis, uma série de processos podem ser ativados, os quais desencadeiam o distúrbio metabólico conhecido por acidose (DiLorenzo, 2004).

A acidose pode ser definida como o decréscimo do conteúdo das bases alcalinas presente nos fluidos corporais pelo aumento relativo de ácido (íons de hidrogênio) nesses fluidos (Owens et al., 1998). Esse processo se inicia quando o animal não adaptado ingere grandes quantidades de carboidratos prontamente fermentescíveis, sendo na maioria das vezes o amido. A hidrólise deste carboidrato leva ao aumento das concentrações de glicose ruminal, a qual é normalmente baixa, ao ponto de ultrapassar as concentrações sanguíneas (Galyean e Rivera, 2003). A glicose livre presente no líquido ruminal gera o ambiente propício para a rápida reprodução de microrganismos produtores de ácido láctico, principalmente o *Streptococcus bovis* (Dawson et al., 1997), juntamente com o incremento da osmolaridade, os quais dificultam a absorção dos ácidos graxos de cadeia curta. O resultado é o acúmulo destes no rúmen, com consequente grande diminuição do pH (Galyean e Rivera, 2003).

O acúmulo de lactato, ácido dez vezes mais forte que os ácidos graxos de cadeia curta (Schwatzkopf-Geinswein et al., 2003), é decorrente da proliferação de microrganismos que fermentam a glicose em ácido láctico e, por conseguinte, são insensíveis ao baixo pH. Complementariamente, este ácido faz parte do metabolismo intermediário do propionato e é encontrado em baixíssimas concentrações no rúmen de animais sadios. Em contraste, as bactérias que utilizam o lactato como substrato são sensíveis ao pH mais ácido (Owens et al., 1998). Ainda, é conhecido que o pH ruminal de 5.5 é considerado ótimo para o desenvolvimento de bactérias produtoras de lactato

(Slyter, 1976; Nagaraja, 2003), como as do gênero *Streptococcus* e *Lactobacillus*. Caso atinja-se essa condição ruminal (normalmente causada pela alta concentração ruminal de ácidos graxos de cadeia curta), o crescimento de bactérias que utilizam lactato como substrato é prejudicado e, portanto independente da fonte de carboidrato da dieta, o acúmulo de ácido láctico é esperado nessa faixa de pH (DiLorenzo, 2004).

Quando o animal é gradualmente adaptado, tal acúmulo pode ser evitado, ou pelo menos amenizado. No entanto, dietas cujas proporções de concentrados são relativamente menores que as dietas de terminação ou possuem poucas inclusões de amido, também podem desencadear a acidose. Nestes casos, a produção dos ácidos graxos de cadeia curta pode ser maior que a capacidade de absorção do rúmen (Nagaraja, 2003).

As bactérias do gênero *Streptococcus bovis* são anaeróbias facultativas encontradas no rúmen, ceco e cólon de ruminantes. Em animais alimentados com forragem, o número dessas bactérias presentes no fluido ruminal varia de 10^4 a 10^7 /g, podendo atingir 10^{11} /g de fluido ruminal quando existe excesso de carboidratos prontamente fermentescíveis (Nagaraja, 2007). Mesmo que outras bactérias ruminais sejam mais eficientes na utilização de amido, a *Streptococcus bovis* possui rápida taxa de crescimento (dobra a população a cada 12 minutos) e de degradação desse composto (McCallister et al., 1990), o que explica o grande crescimento dessa espécie no estágio inicial da acidose. Normalmente esse microrganismo produz acetato, formato e etanol a partir de glicose, mas quando o pH atinge 5,6 ocorre mudança de produto de fermentação, que favorece somente a produção de lactato, na forma de isômero L (Russel e Hino, 1985; Finlayson, 1986).

A razão dessa mudança se deve ao tipo de enzimas utilizadas pela *Streptococcus bovis* para a conversão do piruvato em outros compostos metabólicos. Nessa bactéria, o piruvato é transformado em lactato pela lactato desidrogenase ou convertido em acetil CoA pela piruvato formato liase e, posteriormente, a acetil CoA é convertida em acetato ou etanol. O aumento da produção de lactato ocorre porque o microrganismo permite que o pH intracelular atinja 5,5, que é o ótimo para a máxima ativação da enzima lactato desidrogenase (Russel e Hino, 1985).

Portanto, uma estratégia a se considerar para a prevenção de acidose láctica é conter o rápido crescimento de *Streptococcus bovis*. Entretanto, nota-se que o aumento

populacional desse microrganismo, em resposta ao fornecimento de carboidratos prontamente fermentescíveis, acontece somente quando a adaptação gradativa não é realizada. Surpreendentemente, a concentração dessa bactéria no fluido ruminal de animais já adaptados a dietas à base de grãos pode ser o mesmo que o encontrado em animais alimentados com alta proporção de forragens (Wells, 1997).

Existem dois tipos de acidose, a clínica (aguda) e a subclínica (subaguda). Na acidose clínica, o pH é drasticamente reduzido e a concentração de ácido láctico é elevada. Considera-se que o pH ruminal de 5,2 seja o limiar entre acidose clínica e subclínica (Owens et al., 1998). Ainda, a partir da concentração ruminal de 40 mM de ácido láctico (tanto na forma isomérica D quanto na L) sugere-se que seja o início da acidose aguda (Owens et al., 1998; Galyean e Rivera, 2003).

Nos animais que apresentam tal distúrbio nutricional, a diferença de osmolaridade entre o fluido ruminal e o sangue causa migração de ácido no sentido rúmen-circulação, a tal ponto de ultrapassar a capacidade tampão do sangue, formadas a partir de bases compostas principalmente por bicarbonato (Galyean e Rivera, 2003). A mudança de osmolaridade sanguínea causa inchaço nas pernas do animal e laminites (Nocek, 1997). Nos casos mais graves da acidose clínica, o animal pode morrer se a homeostase sanguínea não for restabelecida.

Em relação à acidose subclínica ou subaguda, os sinais externos são dificilmente encontrados e os indicativos estão relacionados com quedas de ingestão de matéria seca e desempenho (DiLorenzo, 2004). O pH médio de 5,6 é considerado o limiar entre a acidose subclínica e o rúmen sadio (Owens et al., 1998; Galyean e Rivera, 2003). Outra forma mais precisa de se detectar e comparar a intensidade deste tipo de acidose no âmbito da pesquisa, é descobrir o pH ruminal mínimo atingindo com a dieta avaliada e verificar por quanto tempo permanece baixo. A razão desta abordagem está baseada na observação de que o pH ruminal varia ao longo do dia, sendo mais baixo algumas horas após o fornecimento da dieta. Assim, o simples valor do pH médio diário pode ocultar a ocorrência de acidose subaguda.

A comparação entre as duas formas de desenvolvimento da acidose pode ser melhor entendida pela reunião das observações de mudanças ocorridas na fermentação ruminal e as respectivas consequências ao animal, construída na revisão de literatura

realizada por Nagaraja e Titgemeyer (2007) e apresentada de maneira resumida na **Tabela 2**.

Tabela 2. Comparação entre a acidose aguda e subaguda em bovinos de corte.

Item	Aguda	Subaguda
Sinais clínicos	Presente	Ausente
Mortalidade	Sim	Não
Mudanças ruminais		
pH ruminal	<5,0	5,0 a 5,5
Ácidos orgânicos totais	Aumentados	Aumentados
Ácido láctico	Aumentado (50 a 120 mM)	Normal (0 a 5 mM)
Ác. gra. cadeia curta	Abaixo do normal (100mM)	Alto (150 a 225 mM)
Micróbios		
Bact. gram-negativas	Decréscimo	Inalteradas
Bact. gram-positivas	Incremento	Inalteradas
<i>Streptococcus bovis</i>	Aumento inicial	Inalterada
<i>Lactobacillus spp.</i>	Aumento	Aumento
Produtoras de lactato	Aumento	Aumento
Utilizadoras de lactato	Decréscimo	Aumento
Mudanças sanguíneas		
pH	Descréscimo (<7,350)	Inalterado, baixo decréscimo
Lactato	Aumento, isômero D	Normal
Bicarbonato	Alta redução (< 20 mEq/L)	Normal, redução transiente
Sequelas		
Ruminites	Sim	Sim
Laminites	Sim	Sim
Poliencefalomalácia	Sim	Sim
Abscessos de fígado	Sim	Sim

Adaptado de Nagaraja e Titgemeyer (2007).

De acordo com Stock e Britton (1996), quase todos os animais passam por acidose subaguda em algum período da terminação comercial nos Estados Unidos. Pesquisadores da Universidade do Nebraska calculam que as perdas sejam da ordem de U\$ 13,00 cabeça/ano advindas do menor consumo de matéria seca e conseqüentemente, menor desempenho do animal de corte. Esse dado passa a ser relevante às condições brasileiras, a partir do momento em que se aumenta o número de confinamentos a cada ano, juntamente com as proporções de concentrado na dieta.

Neste sentido, Marino et al. (2007) forneceram à vacas mestiças leiteiras dietas que continham a relação concentrado:volumoso de 70:30. Os ingredientes energéticos utilizados foram: silagem de grãos úmidos de milho, milho seco moído ou polpa cítrica. O pH crítico ocorreu 4 horas após a alimentação e foi encontrada diferença significativa entre o tratamento de silagem de grãos úmidos de milho e milho seco moído em relação à polpa cítrica. Nesse horário, o pH ruminal dos animais alimentados com milho seco ou úmido foi ao redor de 5,71, enquanto nos animais alimentados com polpa cítrica foi de 6,10. Em relação ao tempo ao longo do dia que o pH ruminal ficou abaixo de 6,0, foi observado maior tempo para o grupo alimentado com milho seco (61,5% em 12 h de mensuração) comparado ao grupo alimentado com polpa cítrica (20,1%), sem diferença dos dois grupos para o alimentado com silagem de grãos úmidos de milho (33,0%).

O resultado discutido acima provavelmente reflete o perfil de acidose que ocorre em confinamentos de gado de corte, por avaliar uma proporção de concentrado próxima da utilizada em operações comerciais, como o constatado por Millen et al., (2009), e também por conter subproduto, como a polpa, em um dos tratamentos. Pode-se inferir que a acidose subaguda é a que ocorre com maior frequência, pelo pH crítico não ter atingido 5,2 (que caracteriza a acidose aguda) e também pelo fato da concentração de lactato ter sido baixa em todos os tratamentos, indicando redução de pH por acúmulo de ácidos graxos de cadeia curta.

Assim sendo, a estratégia de manejo e planejamento nutricional se revela de grande importância, como, por exemplo, o tipo de adaptação adotada. Sabe-se que são necessários de 10 a 14 dias no mínimo para se realizar a transição de dietas de alta proporção de forragem para alta de concentrados (Schwatzkopf-Geinswein et al., 2003).

Além do tempo e número de dietas usadas na adaptação, técnicas como a restrição da quantidade do alimento oferecido ao animal podem se tornar interessantes para evitar distúrbios metabólicos. O objetivo da restrição da ingestão de dieta é evitar o consumo excessivo e, por consequência, a acidose. No entanto, a restrição pode exercer efeito contrário ao esperado, o de estimular a acidose subaguda, pelo fato do animal realizar menor número de refeições diárias e ingerir maior quantidade de ração por vez em que se alimenta (Zinn, 1995).

Deve-se ressaltar que é possível ocorrer competição por alimento em baias onde esse manejo é adotado, o que pode vir a ser o fator limitante do uso dessa tecnologia em grandes confinamentos comerciais, onde o espaço disponível de cocho muitas vezes é insuficiente. Além disso, os animais normalmente provêm de pastos de baixa qualidade no período da seca e apresentam baixa condição corporal. Dessa maneira, a restrição também poderia apresentar efeito negativo sobre o crescimento compensatório que esses animais teriam o potencial de desempenhar.

Por fim, até o presente momento sabe-se muito pouco sobre a incidência desse distúrbio nos confinamentos brasileiros. A constatação de que grande parte dos confinamentos comerciais adota o manejo de bica corrida (ou seja, a mensuração da ingestão de matéria seca em cada baia não é acompanhada, Millen et al., 2009), confirma a negligência dos brasileiros em relação à essa desordem nutricional. Percebe-se também a necessidade de informações mais detalhadas sobre até que ponto os subprodutos podem ser considerados como estratégia de redução da acidose e, principalmente, quais são as diferenças existentes entre animais taurinos e zebuínos quanto ao metabolismo e microbiota ruminais, já que observações de campo inferem que animais *Bos indicus* são mais suscetíveis à acidose ruminal (Millen et al., 2009).

2.3.Monensina sódica

Desde a aprovação do uso deste princípio ativo em dietas de bovinos de corte, em meados da década de 70, a monensina sódica conquistou grande aceitação pela indústria de alimentação animal. A partir de então, muitos estudos foram conduzidos para avaliar o efeito desse ionóforo sobre o desempenho de bovinos de corte confinados. A

monensina se mostrou capaz de aumentar a eficiência alimentar em diferentes condições de dietas, ambientes e de animais (Goodrich, 1984).

De acordo com o pesquisador citado acima, em um estudo que resumiu 228 experimentos e 11.274 animais, suplementados com monensina ou não, foi possível observar que os animais tratados com esse aditivo tiveram ganho de peso 1,6% maior, ingestão de matéria seca 6,4% menor, resultando em melhora de conversão em 7,5%. Essa resposta pode ser bastante variável, de acordo com o tipo de animal suplementado. Observou-se que bovinos considerados ineficientes em converter alimento em ganho de peso respondem melhor à adição de monensina na dieta que animais que apresentam maiores eficiências alimentares. Já para animais não confinados, a resposta ao uso de monensina em pasto pode alcançar aumentos de 15% no ganho de peso diário (Goodrich et al., 1984).

Ionóforos, como a monensina, são poliéteres altamente lipolíticos que se acumulam na membrana celular e catalisam rápido movimento de íons (Pressman, 1985). Esse tipo de antibiótico atua como “antiporter” de prótons e íons de metal (preferencialmente sódio e potássio) e só se desligam após se conectarem a outras moléculas semelhantes. Com isso, são capazes de transportar esses compostos livremente através da membrana celular. Este processo de ionização é pH dependente e os ionóforos, como a monensina e lasalocida são mais eficazes quando o pH está baixo (Russell e Houlihan, 2003).

Quando culturas de bactérias *Streptococcus bovis* foram tratadas com monensina (Russell, 1987; Russel e Strubel, 1989), houve o rápido fluxo de potássio para fora da membrana celular e influxo de sódio e outros prótons. Assim, a célula ativou mecanismos de transporte ativo, nos quais é necessário o uso de ATP, resultando no gasto excessivo de energia. As bactérias sensíveis à monensina, na grande maioria gram-positivas, param de crescer ou morrem por consequência desse gasto energético.

A quantidade a ser administrada de monensina afeta diretamente a ingestão de matéria seca. Goodrich et al. (1976) reuniu 29 experimentos incluindo dosagens de 11 a 33 mg/kg de monensina adicionadas à ração. Foi relatado que a dose de 33 mg/kg proporcionou taxa de ganho de peso mais lenta que as outras dosagens, sendo esta similar ao controle. A ingestão de matéria seca diária foi reduzida conforme se aumentou a dose, passando de 7.89 kg de matéria seca no controle, para 7,23 kg com a

dose de 33 mg/kg. No entanto, as dosagens de 22 a 33 mg/kg resultaram em similares quantidades de alimento ingerido/100 kg de carcaça.

A razão pela qual a monensina reduz o consumo ainda não está clara. Possivelmente pode ocorrer redução das exigências energéticas do animal e melhora dos valores energéticos da dieta. Goodrich e Thompson (1980) encontraram melhora de 1,2% na digestibilidade aparente da matéria seca, enquanto observou-se aumento de 6,5% da digestibilidade aparente de proteína com o uso deste princípio ativo.

A proporção de propionato ruminal é favorecida ao utilizar esse ionóforo, da mesma forma que a proporção de acetato e produção de metano são reduzidas (Joyner et al., 1979; Thornton e Owens, 1981). Com isso, nota-se aumento da metabolizabilidade da dieta, a qual pode advir do aumento da digestibilidade aparente da matéria seca ou da fermentação ruminal mais eficiente pela maior retenção de íons de hidrogênio, através da maior produção de propionato.

A habilidade dos ionóforos em reduzir a produção de metano e mudar as proporções dos ácidos graxos voláteis apenas explica um terço do aumento potencial da eficiência alimentar (Russel e Strubel, 1989). Esses aditivos são capazes de reduzir em 30% a produção de metano. No entanto, a perda de energia sob a forma de gases nunca afeta mais que 12% da energia presente na dieta (Blaxter, 1962).

Byers (1980) ao comparar animais controles e suplementados com monensina, que recebiam dietas isoenergéticas (mesma quantidade de energia metabolizável), observou pequeno aumento da energia líquida para ganho e incremento de 10% da energia líquida de manutenção. O pesquisador sugeriu que o maior efeito da monensina é de aumentar a energia líquida de manutenção para o animal e reduzir as exigências de ingestão de matéria seca para a manutenção.

Potter et al. (1976) propuseram uma série de experimentos para determinar se a melhor eficiência alimentar obtida com o uso da monensina estava relacionada às mudanças na composição da carcaça e determinar a retenção de proteína e energia da dieta também na carcaça. Somente com a dose de 79 g/t, menor rendimento de carcaça foi encontrado. Os animais suplementados com esse princípio ativo consumiram menor quantidade de energia digestível durante todo o período experimental, sendo a mais baixa para o tratamento de 33g/t. Nenhuma diferença entre as características de carcaça foi encontrada. Houve aumento na retenção de energia na carcaça de 7 a 14%, enquanto

a de nitrogênio foi de 9 a 19%, a mais que o controle. O pesquisador sugere que a melhora da eficiência alimentar obtida com a monensina está relacionada ao melhor uso da energia da dieta para ganho em carcaça.

Goodrich et al. (1984) sugeriram que o uso de monensina afeta pouco as características de carcaça, tornando-as ligeiramente mais magras, comparada à de animais controles. Apenas a área de olho de lombo apresenta efeito positivo, ou seja, de aumento (+0,61%). O rendimento de carcaça, escore de marmoreio, deposição de gordura subcutânea, “quality grade” e “yield grade” são afetados negativamente pelo uso de monensina (-0,38, -0,39, -0,24, -0,69 e -0,31%, respectivamente).

Além de promover melhor eficiência, a monensina também comprovou ser eficaz na prevenção de distúrbios metabólicos. Como mencionado anteriormente, a acidose aguda é causada pelo rápido crescimento da população de *Streptococcus bovis*, o que leva ao acúmulo do lactato no rúmen. Experimentos *in vitro* demonstraram a inibição do crescimento dessa bactéria, a partir da adição deste ionóforo. Contudo, ao se avaliar *in vivo* a contenção do crescimento populacional deste microrganismo, observou-se que não é tão evidente ao desafiar animais com grandes quantidades de glicose e amido (Nagaraja, 1982). Dennis et al. (1981), também observaram a inibição de bactérias produtoras de ácido lático (*Streptococcus bovis* e *Lactobacillus*) *in vitro* em culturas tratadas com esse aditivo e verificaram que a monensina não inibe o crescimento da maioria dos microrganismos que usam o lactato como fonte de energia.

A discrepância encontrada entre os dois tipos de avaliações experimentais pode estar correlacionada às diferentes massas de bactéria e a capacidade do ionóforo de se ligar com outros materiais. Os ionóforos se acumulam nas membranas celulares e na massa bacteriana *in vitro*, sendo este acúmulo 10 vezes menor *in vivo*. Estudos foram conduzidos com ^{14}C e mostraram que a monensina se adere às partículas de alimento, protozoários e em ambos os tipos de bactérias, sensíveis ou resistentes (Chow et al., 1994).

Apesar de existir essa diferença entre os métodos *in vitro* e *in vivo*, a monensina é capaz de evitar a acidose láctica em bovinos induzidos à acidose. Nagaraja et al. (1981) constataram que os animais tratados via intraruminal com 1,3 mg/kg de peso vivo não apresentaram os sinais clínicos deste distúrbio nutricional, enquanto o grupo controle

apresentou decréscimo do pH sanguíneo, diarreia, inapetência, aumento de lactato ruminal, hiperventilação e desidratação.

Erickson et al. (2003) reportaram que a monensina tende a fazer com que o animal reduza a taxa de ingestão e a quantidade de alimento ingerido por refeição, aumentando o número de refeições diárias. Esse é um fato relevante, pois como foi discutido anteriormente, talvez a acidose que ocorre nos confinamentos brasileiros seja do tipo subaguda. Assim, a redução do pH acontece apenas pelo acúmulo de ácidos graxos de cadeia curta, portanto a ingestão menor e mais espaçada evitaria tal acúmulo.

Ao analisar o uso de monensina sódica a partir de um enfoque nutricional, não são encontrados argumentos consistentes para propor a eliminação desse aditivo alimentar nos sistemas de produção intensiva de carne. Por outro lado, é crescente o número de grupos que propõem o menor uso de antibióticos na produção animal com o intuito de diminuir o número de bactérias resistentes às drogas usadas na saúde humana.

2.4. Resistência bacteriana aos ionóforos *versus* saúde humana

Ao longo da história, o homem sempre demonstrou aflição de infecções bacterianas que causaram miséria, baixa expectativa de vida e periódicos declínios populacionais humanos. Com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em 1928, seguido pelo desenvolvimento das técnicas de produção de antibióticos em escala industrial, parecia que o homem aperfeiçoara a tecnologia que poderia transformar seu destino. Entretanto, na década de 50, cientistas começaram a detectar bactérias resistentes aos antibióticos, resistência essa que podia ser transmitida de uma bactéria a outra através da estrutura extracelular chamada de plasmídeo. Na década de 80, bactérias resistentes às diversas drogas já eram comuns, deixando explícito que a batalha entre homem e microrganismos não seria mais previsível (Levy, 2002).

Os antibióticos foram primeiramente utilizados como promotores de crescimento na avicultura. Depois, eventualmente, começou-se a utilizá-los na suinocultura, pecuária de corte e, por último, na leiteira (Visek, 1978). O uso de antibióticos na produção leiteira foi suspenso a partir do momento em que se detectou contaminação do leite. O leite contaminado com antibióticos não pode ser usado na fabricação de queijos.

Adicionalmente, os humanos podem apresentar reações alérgicas (Russel e Houlihan, 2003).

Recentemente, o intenso debate sobre as possíveis razões da evolução da resistência bacteriana e que atitudes devem ser tomadas para detê-la tem sido travado (Lewis et al., 2002). Dois grupos opostos encabeçam essa discussão: o primeiro deles é formado por médicos e veterinários que usam antibióticos em nível terapêutico, enquanto o segundo é composto por pecuaristas que fornecem antibióticos como promotores aos animais de produção. Os profissionais da área de saúde argumentam que o uso rotineiro de antibióticos na alimentação animal cria a pressão de seleção para resistência, a qual pode eventualmente se espalhar para as bactérias que acometem o homem. Em contrapartida, produtores indicam que a resistência é mais provável de acontecer quando médicos e veterinários diagnosticam erroneamente infecções e administram imprópriamente antibióticos. Quando isso ocorre, a dosagem recomendada é maior e o ambiente já possui grande população de bactérias resistentes, como os hospitais (Russel e Houlihan, 2003).

Durante algum tempo, a avopracina foi utilizada com promotor de crescimento em suínos, aves e bovinos (Owens e Gill, 1981). Esse princípio ativo é análogo à vancomicina, um importante medicamento usado no tratamento de infecções contra bactérias gram-positivas, principalmente em pacientes portadores da AIDS (Russel e Houlihan, 2003). Klare et al. (1995) e Aarestrup et al. (1995) isolaram enterococcus resistentes à vancomicina em suínos e poedeiras suplementados com avopracina, indicando possível resistência cruzada. Bager et al. (1997) posteriormente confirmaram a correlação entre a resistência de vancomicina com a suplementação de avopracina. Com isso a União Européia banuiu o uso desse princípio ativo como aditivo alimentar no ano de 1997.

A mesma analogia está sendo considerada ao analisar o uso de ionóforos como promotores de crescimento na produção, mas essa extrapolação não é bem suportada cientificamente. Apenas algumas espécies de animais podem ser suplementadas com esse aditivo, sendo que essa classe de antibiótico não é utilizada como antimicrobiano para humanos (Russel e Houlihan, 2003). Os efeitos dos ionóforos em humanos não foram ainda determinados experimentalmente. Pressman (1985) observou que as pessoas expostas à monensina durante a fabricação poderiam apresentar sintomas como

dor de cabeça, náusea, sangramento de nariz e rachadura de pele. Também se observou que produtores que suplementavam o gado poderiam apresentar dor de cabeça e mal estar.

Mercados consumidores, como a União Européia, estão cada vez mais resistentes à compra de carne de animais suplementados com esse tipo de antibiótico. Ionóforos são usados extensivamente em vários países, como Austrália, Nova Zelândia e também na América Latina, mas o uso em bovinos pela Europa é pequeno (Aditivos alimentares restrup, 2000). Talvez isso se deva pela tendência de grande parte dos produtores europeus possuírem rebanhos de dupla aptidão (carne e leite). Na Nova Zelândia, a monensina é usada para aumentar a produção de leite e prevenir o timpanismo, mas necessita de prescrição veterinária para o monitoramento e permissão de uso (Russel e Houlihan, 2003). Como a aprovação do uso de monensina pelo FDA (Food and drugs administration, órgão americano que inspeciona o uso de drogas na produção de alimentos) em rebanhos leiteiros é recente nos Estados Unidos, esse é um dos fatores que corroboram para a formação da opinião de proibir sua utilização como promotor de crescimento para bovinos.

Quanto aos resíduos deste princípio ativo nos alimentos, constatou-se que os ruminantes possuem enzimas hepáticas capazes de inativar ou degradar os compostos dos ionóforos e a habilidade da circulação entero-hepática de reciclá-los de volta para o trato gastrointestinal via bile (Donoho, 1984). Talvez esse seja um dos motivos pelos quais a monensina não é detectada na carcaça. Por outro lado, a constatação observada acima contribui para a idéia de que possa haver grande contaminação ambiental por esse antibiótico e com conseqüências imprevisíveis para animais, plantas e microrganismos.

Do ponto de vista microbiológico, experimentos *in vivo* e *in vitro* indicam que apenas algumas bactérias ruminais são sensíveis aos ionóforos. Bergen e Bates (1984) notaram que as bactérias resistentes à monensina apresentavam a ação da enzima fumarato redutase na membrana celular, a qual poderia contrabalancear o fluxo de íons causado pelos ionóforos para o interior do citoplasma. Bactérias gram-negativas são, na maioria das vezes, as mais resistentes aos ionóforos, mas mesmo assim, necessitam de período de adaptação para isso. Cepas de *Prevotella bryantii* foram selecionadas para resistir à monensina em doses até 16 vezes maiores que as suportadas por linhagens sensíveis. Ao se misturar os dois tipos de cepas e suspender a adição de monensina ao

meio de cultura, observou-se que a população resistente foi substituída pela sensível (Callaway e Russel 1999; Callaway e Russel, 2000).

A idéia de que a resistência bacteriana aos ionóforos é de ordem fenotípica (adaptação fisiológica) e não genética é baseada na mensuração do fluxo dos íons de potássio causado pela monensina. Quando a mistura de bactérias ruminais foi obtida de um animal alimentado com forragem, a quantidade de monensina para catalisar a depleção do fluxo de íons de potássio ao máximo era de 0,2 μM . Entretanto esse fluxo teve que aumentar 8 vezes para que ocorresse a depleção, a partir do momento que administrou-se ao animal doses diárias de 350 mg de monensina. A depleção do fluxo de potássio retornou ao normal ao cessar a suplementação com monensina. Lana e Russel (1996) concluem que a resistência à monensina era prevalente antes do tratamento e o aumento da resistência ocorre muito rápido, não persistindo após a suspensão do uso deste ionóforo.

Pelo fato de os modelos experimentais utilizados em pesquisas com antibióticos usarem grupos pequenos de animais e curtos períodos de tempo, ou seja, a pequena simulação de um vasto universo de possibilidades, torna-se sensato ressaltar que o real impacto do uso de ionóforos como aditivo alimentar ainda é em parte desconhecido quando se questiona os possíveis efeitos maléficos ao longo de décadas.

Mesmo com a comprovação científica de não haver indícios de cooperarem com a resistência de microrganismos nocivos à saúde humana, será a opinião do consumidor que determinará o maior ou menor uso na produção animal. Tecnologias alternativas que promovam efeitos semelhantes de desempenho podem contribuir para a busca de um mercado diferenciado capaz de agregar maior valor pago à carne ou leite.

2.5. Imunização ativa contra bactérias produtoras de lactato

O uso de anticorpos na produção animal é antigo, como, por exemplo, a administração de vacinas. Entretanto a abordagem de usá-los com a finalidade de manipular a fermentação ruminal para melhorar o desempenho de animais de produção é recente (Newbold et al., 2001; Hardy, 2002; Berghman et al., 2004).

A aplicação de anticorpos como aditivos alimentares já foi proposta por vários autores como alternativa para evitar o aparecimento de bactérias resistentes aos

antibióticos usados como promotores de crescimento, comumente utilizados na produção animal (Shu et al., 1999; Gill et al., 2000; Shu et al., 2000a; Newbold et al., 2001; Hardy, 2002; Berghman et al., 2004).

Vacinas intramusculares produzidas a partir de suspensões de bactérias vivas dos gêneros *Streptococcus bovis* (cepa Sb-5) e *Lactobacillus* (cepa LB-27) com a adição de coadjuvante foram testadas em novilhos confinados com o intuito de prevenir a acidose láctica causada por dietas constituídas por grandes quantidades de amido (Shu et al., 1999). As imunizações foram reforçadas 30, 44 e 59 dias após a primeira dose ser aplicada. Os novilhos receberam dieta composta basicamente de forragem até o dia 91 após a primeira injeção, quando então, foram desafiados com uma dieta que continha 90% de grãos de trigo, para a indução da acidose. As concentrações de imunoglobulina G (IgG) aumentaram nos animais após a primeira imunização. O grupo tratado obteve maior ingestão de matéria seca (IMS) e menor concentração de ácido láctico 24h após o desafio. As concentrações de *Streptococcus bovis* foram maiores nos animais controle até o dia 90, mas não houve diferença no dia após o desafio (dia 92). Em contrapartida, não houve diferenças significativas nas concentrações de *Lactobacillus* até o dia 90, mas diferiu significativamente no dia 92, sendo em maior número nos animais não vacinados. Os autores concluíram que a vacinação intramuscular pode reduzir o risco de acidose causada por *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus*.

Apesar de as vacinas serem eficientes no controle da acidose, a imunização ativa é de difícil manipulação justamente pela rota que o anticorpo atinge o rúmen, ou seja, através da saliva. Sendo assim, não é possível interferir diretamente na quantidade de anticorpos que irão agir no rúmen. Dessa forma, a imunização passiva, a partir da ingestão dos anticorpos, aparenta ser uma nova forma de se fornecer esse tipo de aditivo alimentar, que ainda se encontra em fase de desenvolvimento.

2.6. O uso potencial de anticorpos aviários como aditivos alimentares

O sistema imune das aves difere dos mamíferos. A imunização passiva ocorre principalmente pelo colostro, no caso dos mamíferos. Já as aves, transferem os anticorpos junto à deposição de líquidos durante a formação do ovo. Enquanto o ovo

ainda se encontra no ovário, a ave é capaz de secretar imunoglobulina Y (IgY) e incorporá-la à gema. Assim que o ovo percorre o oviduto, IgM e IgA são adicionadas junto à albumina (Schade et al., 2001).

As IgG séricas presentes em galinhas imunizadas são eficientemente transportadas e acumuladas na gema do ovo (Shimizu et al., 1988). Altos níveis de atividade de anticorpos podem ser mantidos nas gemas se os animais forem periodicamente imunizados, fazendo com que a produção de IgY seja economicamente viável (Shimizu et al., 1988; Lee et al., 2002).

O uso de anticorpos aviários como aditivo alimentar foi testado por Shimizu et al. (1988). A estabilidade da IgY anti-*Escherichia coli* foi desafiada sob várias condições de temperatura, pH e proteólise. A atividade da IgY foi obtida através da aglutinação de culturas vivas da bactéria alvo, no caso *Escherichia coli*. Observou-se que a IgY é estável à temperatura, sendo a atividade mantida à 70° C por 15 minutos. A IgY foi ativa até o pH 4, ponto que começou a ocorrer quebras dos peptídeos. As enzimas pepsina e tripsina em baixas concentrações são capazes de alterar esse anticorpo, mas, mesmo assim, a atividade foi observada. A digestão por quimiotripsina não produziu nenhuma quebra da imunoglobulina. A IgY demonstrou ser estável às condições adversas que o sistema digestivo pode vir a representar, o que indica a grande capacidade para ser utilizado como aditivo alimentar específico contra microrganismos patogênicos.

Ikemori et al. (1997) avaliaram a imunização passiva de bezerros neonatos contra diarreia causada por coronavírus. As fontes de anticorpos foram a gema de ovo seca de galinhas imunizadas e o colostro em pó de vacas, também imunizadas. A mortalidade foi reduzida no grupo imunizado com gema, quando comparado ao outro tratamento e o controle. O escore de fezes foi melhor para o grupo que recebia o anticorpo aviário, que o controle. Com o colostro foram necessárias duas vezes a quantidade de anticorpo para atingir o mesmo escore de fezes que os animais que recebiam a gema. O tratamento com gema resultou em melhor ganho de peso diário que o grupo sem tratamento. A necessidade de maior quantidade de anticorpos oriundos do colostro para se equiparar ao tratamento com anticorpos aviários reforça a teoria de que a IgY é resistente à proteólise causada pelo suco gástrico. Os autores concluíram que a

gema seca advinda de galinhas imunizadas é eficiente no controle de diarréias causadas por coronavírus, especialmente pelos melhores resultados quando comparados ao colostro em pó de vacas imunizadas.

2.7. Parâmetros ruminais, desempenho e características de carcaça de bovinos tratados com anticorpos policlonais aviários

Os estudos com o preparado de anticorpos policlonais, como modificadores da fermentação ruminal, foram iniciados na metade da primeira década deste século pelo grupo de pesquisadores da Universidade de Minnesota, sob liderança do professor Alfredo DiCostanzo. Logo após os primeiros ensaios científicos americanos, no ano de 2006, a linha de pesquisa foi introduzida no Brasil e faculdades como a Unesp de Botucatu e Usp de Pirassunuga também iniciaram projetos de pesquisa nessa linha. Ainda, experimentos também foram conduzidos pela Universidade Autônoma de Barcelona. Abaixo segue a compilação da maioria dos resultados obtidos pelos trabalhos conduzidos por essas instituições de pesquisa.

DiLorenzo et al. (2006) propuseram avaliar o efeito do preparado de anticorpos policlonais em novilhos confinados que recebiam dietas densamente energéticas composta basicamente por milho. Foram testados anticorpos específicos contra *Streptococcus bovis* ou *Fusobacterium necrophorum* e suas interações com aditivos alimentares (300 mg monensina/dia mais 100 mg tilosina/dia). O intuito era reduzir a população dessas bactérias e conseqüentemente a incidência de acidose e abscesso hepático. Encontrou-se resposta cúbica na redução de *Streptococcus bovis* presente no fluído ruminal quando se aumentou a dosagem de preparado de anticorpos contra *Streptococcus bovis* de 2,5 mL/dia para 7,5 mL/dia. A inclusão de aditivos alimentares não surtiu efeito na contagem de *Streptococcus bovis* presente no rúmen. Entretanto, observou-se efeito de sinergismo no tratamento que recebia preparado de anticorpos contra *Streptococcus bovis* e aditivos alimentares juntos, o qual reduziu com maior eficácia a contagem deste microrganismo. A contagem de *Streptococcus bovis* não foi alterada pela administração de preparado de anticorpos contra *Fusobacterium necrophorum*, o que demonstra a alta especificidade destes anticorpos, suportada

também pelo fato de que a contagem total de bactérias anaeróbias não sofreu efeito em nenhum dos tratamentos com os anticorpos.

Houve aumento do pH com a administração de preparado de anticorpos contra *Streptococcus bovis*, o qual não diferiu do tratamento com aditivos alimentares ou com anticorpos mais aditivos alimentares. Esse dado confirma os resultados encontrados por Shimizu et al. (1988), que defendiam a estabilidade e ação da IgY em ambientes desafiadores às proteínas como o trato gastrintestinal.

A contagem de *Fusobacterium necrophorum* presente no fluído ruminal foi reduzida no tratamento que recebia preparado de anticorpos contra *Fusobacterium necrophorum* e também no tratamento com aditivos alimentares. Maior redução de *Fusobacterium necrophorum* ocorreu no tratamento de aditivos alimentares quando comparado com o tratamento que recebia aditivos alimentares e preparado de anticorpos contra *Fusobacterium necrophorum* juntos. No entanto, não foi esclarecida a razão pela qual ocorreu esse efeito antagônico. O pH não foi alterado ao administrar preparado de anticorpos contra *Fusobacterium necrophorum*, sendo similar ao do grupo controle. Os autores concluíram que os anticorpos foram eficientes na diminuição dessas duas espécies de bactérias presentes no rúmen, apresentam alta especificidade e podem ser eficientes para a redução de condições que predisponham os animais à acidose e abscesso hepático. Complementariamente, a hipótese de reduzir a incidência de abscesso hepático foi confirmada posteriormente pelo mesmo autor (DiLorenzo et al., 2008).

Marino et al. (2007) avaliaram a ação dos anticorpos policlonais contra *Streptococcus bovis* e bactérias hiperfermentadoras de amônia, em vacas canuladas recebendo dieta de alta proporção de concentrados e encontraram que o pH ruminal de animais tratados com anticorpos não diferiu do grupo tratado com monensina, sendo ambos maiores que o controle. Observou-se nesse estudo que a monensina diminuiu a relação acetato: propionato, enquanto os animais suplementados com anticorpos mantiveram a proporção de acetato alta. Essa característica de não alterar o padrão de fermentação ao se usar anticorpos, pode se revelar uma desvantagem ao compará-lo com a monensina, pois desta maneira, a vantagem maior de se administrar anticorpos seria somente o melhor controle do pH ruminal, enquanto a monensina também

promove fermentação mais eficiente por aumentar a proporção de propionato e diminuir a produção de metano.

Por outro lado, Otero et al. (2007) observaram o aumento da degradabilidade potencial da FDN e da população de protozoários *Isotricha* quando o mesmo preparado utilizado por Marino et al. (2007) foi avaliado. Os resultados citados acima são relevantes pela razão de que a dieta utilizada pelos confinamentos comerciais brasileiros utilizarem em média, 28% de volumoso (Millen et al., 2009). Dessa forma, a melhoria de desempenho ainda pode ser conseguida com esse tipo de dieta se ocorrer o aumento da degradabilidade da fibra.

DiLorenzo (2004) também realizou outro estudo de anticorpos policlonais com objetivo de observar o desempenho e características de carcaça de novilhos castrados e confinados que recebiam preparado de anticorpos policlonais. Durante dois anos consecutivos, 226 e 192 novilhos angus e cruzados foram alimentados com dietas de alta inclusão de grãos que continham preparado de anticorpos contra *Streptococcus bovis*, preparado de anticorpos contra *Fusobacterium necrophorum* ou os dois anticorpos juntos. Os animais tratados com o preparado de anticorpos policlonais obtiveram peso vivo final maior que o controle e o grupo que recebia os dois tratamentos. Esse resultado foi explicado pelo maior ganho de peso médio diário dos grupos que recebiam apenas um tipo de anticorpo. O grupo que recebeu preparado de anticorpos contra *Streptococcus bovis* demonstrou melhor eficiência alimentar que o controle, enquanto que o tratamento com preparado de anticorpos contra *Fusobacterium necrophorum* não diferiu de preparado de anticorpos contra *Streptococcus bovis* e o controle.

A deposição de gordura na carcaça foi maior no tratamento de preparado de anticorpos contra *Streptococcus bovis* que no controle. Entretanto, nenhuma diferença foi observada quando a deposição de gordura foi ajustada ao peso de carcaça quente. Os animais dos tratamentos de preparado de anticorpos contra *Streptococcus bovis* e preparado de anticorpos contra *Fusobacterium necrophorum* apresentaram espessura de gordura subcutânea semelhantes. A área de olho de lombo, a gordura visceral e a marmorização não sofreram influência dos anticorpos. O autor inferiu que os anticorpos aumentaram o desempenho sem impactos negativos na carcaça de novilhos castrados alimentados com dietas de alta porcentagem de grãos.

Contudo, DiLorenzo et al. (2008) e Pacheco et al. (2008) encontraram menores rendimentos de carcaça para novilhos que recebiam o tratamento com anticorpos. A razão de tal constatação ainda é desconhecida e nenhuma teoria explica satisfatoriamente esses dados até o momento.

Resultados de desempenho obtidos com o uso de anticorpos policlonais comparados com a monensina sódica em animais jovens com diferentes proporções de genótipo zebuino e recebendo dietas com grande proporção de grãos foram avaliados por Millen et al. (2007). Segundo os autores não houve interação entre grupo genético e aditivo alimentar. Animais suplementados com anticorpo apresentaram ganho de peso, ingestão de matéria seca em quilos, conversão alimentar e custo para ganhar um quilo de peso vivo similares aos suplementados com monensina. A ingestão de matéria seca em porcentagem do peso vivo foi maior para animais suplementados com anticorpos, talvez pelo fato de a monensina apresentar o efeito de limitador da ingestão de matéria seca, enquanto os anticorpos mantiveram a ingestão normal e evitaram a acidose ruminal.

Barducci et al. (2009) estudaram a inclusão ou não de monensina sódica ou preparado de anticorpos policlonais contra as bactérias *Streptococcus bovis*, *Fusobacterium necrophorum*, *Lactobacillus spp.*, *E. coli* e endotoxinas sob a forma sólida, em dietas com altos teores de concentrado para bovinos jovens Brangus em confinamento. Os animais suplementados com monensina apresentaram melhor eficiência alimentar, maior ganho de peso diário e maior peso de carcaça quente que aqueles que não receberam monensina. Ainda, os grupos tratados com esse ionóforo apresentaram melhor eficiência alimentar, maior ganho de peso diário e maior peso de carcaça quente que aqueles que não receberam esse princípio ativo. Em contrapartida, a adição do preparado na dieta não melhorou o desempenho dos bovinos confinados e nem afetou negativamente a ingestão de matéria seca ou rendimento de carcaça.

Contrariamente, Millen (2010) observou desempenhos semelhantes entre a monensina e o preparado na forma sólida contra *Streptococcus bovis*, *Fusobacterium necrophorum*, bactérias ruminais hiperfermentadoras de amônia e endotoxinas em bovinos jovens com diferentes graus de sangue zebu confinados e alimentados com alta proporção de concentrados. Adicionalmente, a monensina reduziu a ingestão de matéria seca em porcentagem do peso vivo e a deposição de tecido muscular foi mais

prolongada nos animais que recebiam o preparado. O autor inferiu que possivelmente os anticorpos contra as bactérias hiperfermentadoras de amônia diminuíram a proteólise (e provavelmente a deaminação) ruminal, o que aumentou o fluxo de proteína passante (“by pass”) para o intestino, efeito benéfico neste caso, pois eram animais em crescimento. Complementariamente, o preparado não interfere na qualidade de carne, isto é, maciez e perfil de ácidos graxos (Pacheco et al., 2008 e Fossa et al., 2008).

A melhoria de desempenho obtida nos estudos com animais suplementados com o preparado pode ser em parte explicada pela melhoria de fermentação ruminal através do controle do pH. No experimento de Millen et al. (2007) foi constatado menor incidência de rumenites para os animais tratados com anticorpos (*Streptococcus bovis*, *Fusobacterium necrophorum*, hiperfermentadoras de amônia e endotoxina) em relação à monensina. Contudo, Sarti et al. (2009) não observaram o mesmo resultado ao avaliarem um preparado, sob a forma sólida, com composição semelhante ao experimento citado acima, com excessão da substituição dos anticorpos contra as bactérias hiperfermentadoras de amônia pelo de *Lactobacillus ssp*. Ainda, os animais tratados com monensina neste estudo, apresentaram maior área de absorção por cm² de parede ruminal que os animais que não receberam este princípio ativo. Esse resultado infere o possível efeito indireto da monensina em controlar o pH pelo aumento do desaparecimento ruminal de ácidos orgânicos.

A partir da interpretação advinda da reunião dos resultados de todos os estudos conduzidos até o momento com o preparado, torna-se necessária a exposição dos seguintes pontos críticos da geração de dados científicos nos trabalhos nacionais citados nesta seção: 1-Existe grande variação na composição dos preparados entre os estudos, causada pelas diferentes formulações e tipos de bactérias alvos. Por consequência, aumenta-se a variabilidade das respostas entre as pesquisas. 2-Os resultados indicam que a falta de resultado ocorreu, na maioria das vezes, em experimentos com o produto sólido. Assim, levanta-se a dúvida se o processo de secagem diminui a atividade deste aditivo em potencial. 3-No caso dos experimentos nacionais, não foi realizada ainda a contagem ruminal e constatação da diminuição dos microrganismos alvos. Neste aspecto, o investimento de pesquisa com RT-PCR (PCR em tempo real) poderia esclarecer essa carência de informação. 4-Partindo-se da suposição de que a acidose ruminal subaguda (ocasionada pelo acúmulo de ácidos graxos de cadeia curta) seja a

que ocorra em maior frequência em operações comerciais de alimentação de bovinos e constatando-se que as bactérias alvos relacionadas à essa desordem nutricional presentes nos preparados são produtoras de lactato, logo, seu efeito benéfico estaria mais relacionado com a acidose aguda. Portanto, a indagação se esse aditivo alimentar apresenta o perfil indicado para o controle da acidose subaguda torna-se pertinente. Adicionalmente, os trabalhos nacionais foram conduzidos com animais já adaptados à dieta de alta proporção de concentrados, fato este que não põem à prova a real eficácia do preparado em controlar a acidose.

2.8. REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M. Occurrence of glycopeptide resistance among *Enterococcus faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, v. 1, p. 255-257, 1995.

AARESTRUP, F. M. Occurrence, selection, and spread of resistance to antimicrobial agents used for growth promotion for food animals in Denmark. **APMIS Supplement**, Copenhagen, v. 101, p. 1-48, 2000.

BARDUCCI, R. S. et al. Feedlot performance of Brangus cattle fed monensin or polyclonal antibody preparation against lactate-producing rumen bacteria. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, p. 283- 284, 2009. Supplement 2.

BARGER, F. et al. Avoparcin, used as growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistance of *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pigs farms. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 31, p. 95-112, 1997.

BERGEN, W.G., BATES, D.B. Ionophers: Their effect on production efficiency and mode of action. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 58, p. 1465-1483, 1984.

BERGHMAN, L. R.; WAGHELA, S. D. Antibodies: an alternative for antibiotics? **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, p. 82, 2004. Supplement 1. Abstract.

BLAXTER, K. L. **Energy metabolism of ruminants**. Springfield: Charles C. Thomas, 1962. 329 p.

BYERS, F.M. Effects of limestone, monensin, and feed level on corn silage net energy values and composition of growth in cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 53, p. 873, 1980.

CALLAWAY, T. R.; RUSSEL, J. B. Selection of a highly monensin-resistant *Prevotella bryantii* sub-population with altered membrane characteristics. **Applied of the Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 65, p. 4753-4759, 1999.

CALLAWAY, T. R.; RUSSEL, J. B. Variations in the ability of ruminal gram-negative *Prevotella* species to resist monensin. **Current Microbiology**, New York, v. 40, p. 185-195, 2000.

CAVALCANTI, M. R.; CAMARGO, A. **Pesquisa top 50 confinamentos**. Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br/?actA=7eareaID=15esecaoID=129enoticialID=37652.2007>>. Acesso em: 23 dez. 2008.

CHOW, J. M.; VAN KESSEL, J. A. S.; RUSSEL, J. B. Binding of radiolabelled monensin and lasalocid to ruminal microorganisms and feed. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, p. 1630-1635, 1994.

DAWSON, K. A.; RASMUSSEN, M. A.; ALLISON, M. J. Digestive disorders and nutritional toxicity. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Eds.). **The rumen microbial ecosystem**. New York: Blackie Academic and Professional, 1997. p. 633-660.

DENNIS, S. M.; NAGARAJA, T. G.; BARTLEY, E. E. Effects of lasalocid or monensin on lactate-producing or -using rumen bacteria. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 52, p. 418, 1981.

DIAS, F. **Confinamento brasileiro**. 2007. Palestra apresentada no FEICORTE 2007. Disponível em: <http://www.assocon.com.br/pdf/confinamento_bras_feicorte.pdf>. Acesso em: 22 dez. 2008.

DILORENZO, N. **Effects of feeding polyclonal antibody preparations against rumen starch and lactic-fermenting bacteria on target bacteria populations and steer performance**. 2004. 101 p. Thesis (Master in Animal Science)-Faculty of the Graduate School, University of Minnesota, St. Paul, 2004.

DILORENZO, N. et al. Effects of feeding polyclonal antibody preparations on rumen fermentation patterns, desempenho, and carcass characteristics of feedlot steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, p. 3023-3032, 2008.

DILORENZO, N.; DIEZ-GONZALEZ, F.; DICOSTANZO, A. Effects of feeding polyclonal antibody preparations on ruminal bacterial populations and ruminal pH of steers fed high-grain diets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, p. 2178-2185, 2006.

DONOHO, A. L. Biochemical studies on the fate of monensin action in animals and environment. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 58, p. 1528-1539, 1984.

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

EUROPA. Regulation EC n. 1831/2003, of 22 of september of 2003. On additives for use in animal nutrition. Disponível em: <http://www.eurlex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2003/l_268/l_26820031018en00290043.pdf>. Acesso em: 22 dez. 2008.

FAO. **World agriculture**: towards 2015/30. Rome, 2002. 97 p. Summary report.

FINLAYSON, H. J. The effect of pH on the growth and metabolism of *Streptococcus bovis* in continuous culture. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 61, p. 201-208, 1986.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Melengestrol acetate**. In: _____. **Code of federal regulations**: section 558.342. rev. Washington, DC, 2002. p. 419.

FOSSA, M. V. et al. Fatty acid profile, meat cholesterol and total lipids of *Bos indicus* based types bullocks fed monensin or polyclonal antibodies against lactate-producing rumen bacteria. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, p. 200, 2008. Supplement 2.

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

GILL, H. S. et al. Immunization with *Streptococcus bovis* protects against lactic acidosis in sheep. **Vaccine**, Atlanta, v. 18, p. 2541-2548, 2000.

GOODRICH, R. D. et al. Influence of monensin on the performance of cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 58, p. 1484-1498, 1984.

GOODRICH, R. D.; LINN, J. G.; SCHAFER, J. C. Influence of monensin on feedlot performance- A summary of university trials. **Minnesota Cattle Feeder's Reporter**. St. Paul, v. B, p. 214, 1976.

GOODRICH, R. D.; THOMPSON, W. R. Rumensin in the winter? **Feedlot Manage**, Saint Paul, v. 22, n. 3, p. 24, 1980.

HARDY, B. The issue of antibiotic use in the livestock industry: what have we learned? **Animal Biotechnoly**, London, v. 13, p. 129-147, 2002.

HIROHIKO, A. et al. Improvement of chemical analysis of antibiotics. 21: simultaneous determination of three polyether antibiotics in feeds using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 42, p. 112-117, 1994.

IKEMORI, Y. M. et al. Passive protection of neonatal calves against coronavirus-induced diarrhea by administration of egg yolk or colostrum antibody powder. **Veterinary Microbiology**, Atlanta, v. 58, p. 105-111, 1997.

JOYNER, A. E. Jr. et al. Effect of monensin on growth, feed efficiency and energy metabolism of lambs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 48, p. 1065, 1979.

KAUFMANN, W.; HAGESMEISTER, H.; DIRKSEN, G. Adaptations to changes in dietary composition, level and frequency of feeding. In: RUCKEBUSH, Y.; THIVEND, P. (Eds.) **Digestive physiology and metabolism in ruminants**. Westport: AVI, 1980. p. 587.

KELLY, K. W.; LEWIN, H. A. Monoclonal antibodies: pragmatic application of immunology and cell biology. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 63, p. 288-309, 1986.

- KLARE, I. et al. *vanA*-mediated high level glycopeptides resistance in *Enterococcus faecium* from animal husbandry. **FEMS Microbiology Letter**, Reading, v. 125, p. 166-172, 1995.
- LANA, R. P.; RUSSELL, J. B. Use of potassium depletion to assess adaptation of ruminal bacteria to ionophores. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 62, p. 4499-4503, 1996.
- LEE, E. N. et al. In vitro studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. **Poultry Science**, Champaign, v. 81, p. 632-641, 2002.
- LEVY, S. B. **The antibiotic paradox**. Cambridge: Perseus, 2002. 335 p.
- LEWIS, K. et al. **Bacterial resistance to antimicrobials**. New York: Marcel Dekker, 2002. 495 p.
- MALTHUS, T. R. **An essay on the principle of population**. London: J. Johnson, 1798. 11 p.
- MARINO, C. et al. Avaliação do preparado de anticorpos policlonais (PAP) nos parâmetros de fermentação ruminal em bovinos recebendo dietas de alto concentrado. In: REUNION ASOCIACION LATINOAMERICANA DE PRODUÇÃO ANIMAL, 20., 2007. Cuzco. **Anais...** Cusco: ALPA, 2007. 1 CD-ROM.
- McCALLISTER, T. A. et al. Digestion of barley, maize and wheat by selected species of ruminal bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 56, p. 3146-3153, 1990.
- MILLEN, D. D. **Anticorpos policlonais e monensina sódica na alimentação de bovinos jovens confinados e alimentados com dietas de alto concentrado**. 2010. 171 f. Tese (Doutorado em Zootecnia)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade do Estadual Paulista, Botucatu, 2010.
- MILLEN, D. D. **Desempenho, avaliação ruminal e perfil metabólico sanguíneo de bovinos jovens confinados suplementados com monensina sódica ou anticorpos policlonais**. 2008. 131 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade do Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

MILLEN, D. D. et al. A snapshot of management practices and nutritional recommendations used by feedlot nutritionists in Brazil. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, p. 3427-3439, 2009.

MILLEN, D. D. et al. Feedlot performance and rumen parakeratosis incidence in *Bos indicus* type bullocks fed high grain diets and monensin or polyclonal antibodies preparations against rumen bacteria. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, p. 552, 2007. Supplement 1.

NAGARAJA, T. G. et al. Effect of lasalocid, monensin, of thiopeptin on lactic acidosis in cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 54, p. 649-658, 1982.

NAGARAJA, T. G. et al. Prevention of lactic acidosis in cattle by lasalocid or monensin. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 53, p. 206, 1981.

NAGARAJA, T. G. Response of the gut and microbial populations to feedstuffs: the ruminant story. In: MINNESOTA NUTRITION CONFERENCE, 64., 2003, Saint Paul. **Proceedings...** Saint Paul: Animal Science, 2003. p. 64-77.

NAGARAJA, T. G.; TITGEMEYER, E. C. Ruminal acidosis in beef cattle: The current microbiological and nutritional outlook. **Jornal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, E17-E38, 2007. Supplement.

NEWBOLD, C. J. New products for rumen manipulation. **British Journal Nutrition**, London, v. 98, n. 1, p. 15-16, 2007.

NEWBOLD, C. J.; STEWART, C. S.; WALLACE, R. J. Developments in rumen fermentation: the scientist's view. In: GARNSWORTHY, P. C.; WISEMAN, J. (Eds.). **Recent advances in animal nutrition 2001**. Nottingham: Nottingham University Press, 2001. p. 251-279.

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

OTERO, W. G. et al. Degradabilidade *in situ* da cana- de-açúcar e do farelo de soja sob a influência de preparado de anticorpos policlonais e monensina. In: CONGRESO

INTERNACIONAL DE GANADARIA DE DOBLE PROPÓSITO, 5., 2007, Cuzco. **Anales...** Cuzco: ALPA, 2007. v. 20.

OWENS, F. D.; GOETSCH, A. L. Ruminal fermentation In: CHURCH, D. C. (Ed.). **The ruminant animal: digestive physiology and nutrition**. Long Grove: Waveland, 1988. p. 145-171.

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

OWENS, F. N.; GILL, D. R. Avoparcin, monensin, and implants for growing heifers. In: KANSAS AGRICULTURAL. Experiment Station. **Animal science report MP 108**. Oklahoma, 1981. p. 125-139.

PACHECO, R. D. L. et al. Evaluation of growth, carcass characteristics and meat tenderness of bullocks fed monensin or polyclonal antibodies against lactate-producing rumen bacteria. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, p. 200, 2008. Supplement 2.

POTTER, E. L. et al. Effect of monensin on carcass characteristics, carcass composition and efficiency of converting feed to carcass. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 43, p. 678-683, 1976.

PRESSMAN, B. C. In: SIGEL, H. (Ed.). **Antibiotics and their complexes**. New York: Marcel Dekker, 1985. v. 19, p. 1-18.

RUSSEL, J. B. A proposed model of monensin action in inhibiting rumen bacteria growth: effects on ion flux and protonmotive force. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 64, p. 1519-1525, 1987.

RUSSEL, J. B.; HINO, T. Regulation of lactate producing in *Streptococcus bovis*: A spiraling effect that contributes to rumen acidosis. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 68, p. 1712-1721, 1985.

RUSSEL, J. B.; HOULIHAN, A. J. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. **FEMS Microbiology Review**, Reading, v. 27, p. 65-74, 2003.

RUSSEL, J. B.; STROBEL, H. J. Mini-review: the effect of ionophores on ruminal fermentation. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 55, p. 1-6, 1989.

RUSSELL, J. B.; RYCHLIK, J. L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Science**, New York, v. 292, p. 1119-1122. 2001.

SARTI, L. M. N. et al. Rumen papillae measurements of feedlot cattle fed monensin or polyclonal antibody preparation against lactate-producing rumen bacteria. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 87, p. 284, 2009. Supplement 2.

SCHADE, R. et al. (Eds.). **Chicken egg yolk antibodies, production and application**. Verlag: Springer, 2001. chap. 1.

SCHWARTZKOPF-GENSWEIN K. S. et al. Effect of bunk management on feeding behavior, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: a review. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, p. E149–E158, 2003. Supplement 2.

SHIMIZU, M.; FITZSIMMONS, R. C.; NAKAI, S. Anti-E. coli immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. **Journal of Food Science**, Atlanta, v. 53, p. 1360-1366, 1988.

SHU, Q. et al. Immunization against lactic acidosis in cattle. **Research Veterinary Science**, Atlanta, v. 67, p. 65-71, 1999.

SHU, Q. et al. Immunization with a *Streptococcus bovis* vaccine administered by different routes against lactic acidosis in sheep. **Veterinary Journal**, Atlanta, v. 159, p. 262-269, 2000.

SLYTER, L. L. Influence of acidosis on rumen function. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 43, p. 910-929, 1976.

STOCK, R. A.; BRITTON, R. A. **Acidosis**. Lincoln: University of Nebraska, 1996. NebGuide. On line. Disponível em: <<http://ianrpubs.unl.edu/animaldisease/g1047.htm>>. Acesso em: 15 mar. 2008.

THORNTON, J. H.; OWENS, F. N. Monensin supplementation and in vivo methane production by steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 52, p. 628, 1981.

WISEK, W. J. The mode of growth promotion by antibiotics. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 46, p. 1447-1469, 1978.

WELLS, J. E. et al. A bacteriocin-mediated antagonism by ruminal lactobacilli against *Streptococcus bovis*. **FEMS Microbiology Ecology**, Champaign, v. 22, p. 237-243, 1997.

ZINN, R. A. Effects of levels and patterns of intake on digestive function in feedlot steers. **Proceedings Symposium Intake by feedlot Cattle**, Stillwater, p. 167-171, 1995.

CAPÍTULO 2

**Fermentação ruminal de bovinos induzidos à acidose tratados com monensina
sódica ou anticorpos policlonais contra bactérias precursoras de distúrbios
nutricionais**

RESUMO: O presente ensaio de pesquisa objetivou avaliar o preparado de anticorpos policlonais contra as bactérias ruminais precursoras de distúrbios nutricionais (*Streptococcus bovis*, *Lactobacillus ssp.* e *Fusobacterium necrophorum*) na forma sólida, como aditivo alimentar preventivo à acidose ruminal em bovinos e substituto à monensina. Nove vacas canuladas no rúmen com 677 ± 98 kg de peso vivo médio foram agrupadas em baias individuais através de delineamento inteiramente casualizado com dois períodos de 20 dias. Separaram-se os animais em três tratamentos: controle (**CTL**), preparado de anticorpos policlonais (**PAP**) e monensina sódica (**MON**). Nos primeiros cinco dias de cada período, os animais receberam apenas cana e úreia como alimento. Em seguida, foi fornecida a dieta desafio com aproximadamente 74% de concentrado por 15 dias, com o intuito de causar acidose ruminal. Houve um tempo de 15 dias entre cada período para a readaptação dos animais à dieta de volumoso. As variáveis experimentais foram: ingestão de matéria seca (em kg, **IMKG**; % do peso vivo, **IMPV**; e metabólico, **IMPM**, respectivamente), flutuação da ingestão de matéria seca (**FIMS**) dos dias subseqüentes ao desafio com a dieta de concentrado e os parâmetros de fermentação ruminal (pH do líquido ruminal, lactato ruminal, concentração de ácidos graxos de cadeia curta, nitrogênio amoniacal e lactato ruminal). Não houve efeito de tratamento ($P > 0.05$) tanto para a ingestão de matéria seca quanto para a flutuação da ingestão de matéria seca. Os animais tratados com monensina apresentaram pH mais alto ($P < 0.0001$) que os demais tratamentos (**MON** = 6.06 vs. **PAP** = 5.89 e **CTL** = 5.91), independente de tempo. A concentração ruminal de lactato permaneceu baixa (0.23 mM), mesmo após o desafio com concentrado. A concentração de N-amoniacal do **CTL** foi menor ($P = 0.0039$), comparado à **MON** e **PAP** (14.74 e 13.64 vs. 11.20 mg/dl, para **MON**, **PAP** e **CTL**, respectivamente), independentemente de tempo. Os tratamentos não influenciaram a proporção molar de acetato ($P = 0.3288$). Entretanto, houve interação dia x tratamento ($P = 0.0079$), para a proporção molar de propionato, na qual a **MON** aumentou a proporção deste ácido nos quatro dias subseqüentes ao desafio. Da mesma forma, a **MON** reduziu ($P = 0.0007$) a relação acetato/propionato

nos três dias seguintes ao desafio. Ambos os tratamentos foram eficazes em diminuir ($P = 0.0001$) a proporção molar de butirato (15.42 e 16.35 vs. 18.43 mol/100 mol; para **MON**, **PAP** e **CTL**, respectivamente). A acidose gerada não foi láctica e, assim, talvez não foram atingidas as condições para o **PAP** agir sobre as bactérias produtoras de lactato. Em contrapartida, a **MON** foi eficaz em controlar o pH e melhorar a fermentação ruminal de animais induzidos à acidose ruminal subaguda.

Palavras-chave: imunização passiva, aditivos alimentares, *Streptococcus bovis*, *Lactobacillus ssp.*

Ruminal fermentation of acidosis induced cows treated with monensin or polyclonal antibodies preparation against several nutritional disturbs precursor ruminal bacteria

ABSTRACT: This study was designed to evaluate the potential of the dry form of a multivalent polyclonal antibody preparation against several nutritional disturbs precursors ruminal bacteria (*Streptococcus bovis*, *Fusobacterium necrophorum* and *Lactobacillus ssp.*), as acidosis preventative feed additive to high concentrate fed cattle and as an alternative to monensin. It was used nine cannulated cows (677±98 kg of BW) allocated in a completely randomized desing with two periods of 20 d. Animals were separated in three treatments: control (**CTL**), multivalent polyclonal antibody preparation (**PAP**) and monensin sodium (**MON**). During the first five days of each period, animals were fed all forage diet. Ruminal acidosis was induced by an abrupt diet switch to a 74% concentrate diet during 15 d. An interval of 15 d was considered as ruminal washout in the meantime of the two periods, when animals were refed all forage diet to reestablish normal ruminal pH conditions and cellulolytic microbial population. Ruminal acidosis evaluation parameters were: dry matter intake (kg/d, % of BW and % of BW^{0.75}; **DMIK**, **DMIB** and **DMIM** respectively), dry matter intake fluctuations (**DMIF**) during the subsequent days after concentrate challenge, ruminal fermentation (pH; SCFAs, lactate and NH₃-N concentrations). There were no treatment main effects ($P > 0.05$) for **DMIK**, **DMIB**, **DMIM** or **DMIF**. Higher pH was measured ($P < 0.0001$) in **MON**, compared to the other two treatments (**MON** = 6.06 vs. **PAP** = 5.89 and **CTL** = 5.91). Ruminal lactate concentration remained low (0.23 mM) throughout the entire experimental period. Ruminal ammoniacal-N concentration of **CTL** was lower ($P = 0.0039$), compared to **MON** and **PAP** (14.74 and 13.64 vs. 11.20 mg/dl, for **MON**, **PAP** and **CTL**, respectively). Molar concentration of acetate was not affected ($P = 0.3288$) by treatments. However, an interaction day x treatment ($P = 0.0079$) for propionate molar concentration was found, where **MON** increased the concentration of this SCFA during four days subsequents challenge. Similarly, **MON** reduced ($P = 0.0007$) acetate:propionate ratio during three days following challenge. Both treatments were effective in reducing ($P = 0.0001$) molar proportion of butirate (15.42 and 16.35 vs. 18.43 mol/100 mol; for **MON**, **PAP** and **CTL**, respectively). The

type of ruminal acidosis generated in the present study was not lactic and possibly did not promote adequate conditions for **PAP** control ruminal lactate-producing bacteria populations. Nevertheless, **MON** was effective in controlling pH and improved ruminal fermentation in animals induced to subacute ruminal acidosis.

Keywords: passive immunization, feed additives, *Streptococcus bovis*, *Lactobacillus ssp.*

INTRODUÇÃO

A acidose ruminal é o distúrbio nutricional de maior importância econômica em sistemas intensivos de produção de bovinos. Os custos diários advindos da acidose subaguda podem chegar a 1.12 dólares por animal em rebanhos leiteiros diagnosticados com esse distúrbio (Stone, 1999). No tocante ao gado de corte, nutricionistas e gerentes de operações comerciais de confinamento americanos e canadenses atribuem à acidose subclínica e ao desempenho reduzido, o custo entre 15-20 dólares por animal, devido à perda de eficiência (Schartzkopf-Genswein et al., 2003). Similarmente, no estudo conduzido com nutricionistas brasileiros que atuam em confinamentos de gado de corte, foi levantado que a acidose é o segundo maior problema de saúde que acomete os bovinos alimentados nesse sistema de engorda, abaixo apenas dos problemas respiratórios (Millen et al., 2009). Dentre as diversas formas de manejos preventivos contra esse distúrbio nutricional, destaca-se a inclusão de antibióticos ionóforos, como a monensina sódica (**MON**), nas dietas de bovinos alimentados com alta proporção de concentrados. A eficácia deste princípio ativo em reduzir tanto a ingestão de matéria seca quanto a produção ruminal de ácido láctico (fatores esses críticos para o controle da acidose ruminal) é comprovada por décadas (Goodrich et al., 1984).

Paralelamente, existe a busca pela produção de alimentos livres de antibióticos, como no exemplo da União Européia que banuiu o uso dessas substâncias desde 2006 (European Community, 2003). Por essa razão, as indústrias de leite e carne desse continente pesquisam ativamente alternativas estratégicas para a redução da acidose (Blanch et al., 2009). A imunização passiva contra bactérias precursoras de distúrbios nutricionais, em teoria, apresenta a possibilidade de aditivo alimentar que preenche a necessidade do menor uso de antibióticos em sistemas intensivos de alimentação de bovinos. Preparados de anticorpos policlonais (**PAP**), na forma de apresentação líquida, demonstraram ser eficazes no controle do pH e das populações de bactérias alvos precursoras de distúrbios nutricionais (*Streptococcus bovis* e *Fusobacterium necrophorum*) em animais alimentados com alta proporção de grãos (DiLorenzo et al., 2006) e também no controle da acidose em animais durante a transição rápida para uma dieta de alta proporção de concentrados (Blanch et al., 2009).

Entretanto, até o presente momento, nenhum estudo de metabolismo ruminal com o **PAP** apresentado na forma sólida foi conduzido sob condição mais extrema de mudança abrupta de dieta, partindo-se de altas proporções de forragens para altas proporções de concentrado. Adicionalmente, a maioria dos experimentos realizados com animais induzidos à acidose, dentre os quais visavam à avaliação de aditivos alimentares, foram delineados para o monitoramento da fermentação ruminal em curtos períodos de tempo (entre 1 e 2 d). Assim, existe a carência de informação sobre a persistência de ação dos aditivos alimentares, juntamente com o tempo de administração necessário para reduzir os efeitos negativos deste distúrbio nutricional sobre fermentação ruminal. Dessa forma, o objetivo do presente estudo é avaliar o potencial do **PAP** na forma sólida como substituto da **MON** na prevenção à acidose ruminal ao longo do período de 15 d.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos, mão-de-obra treinada e instalações experimentais estão de acordo com as normas do comitê de ética (CEEAA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Botucatu.

Animais e Instalação Experimental

O ensaio de pesquisa foi conduzido na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP), Campus de Pirassununga – São Paulo. Foram utilizadas nove fêmeas bovinas holandesas, não gestantes e não lactantes com peso vivo médio de 677 ± 98 kg e portadoras de cânula ruminal com 10 cm de diâmetro e 7,5 cm de espessura. Os animais foram mantidos em galpão coberto, em baias individuais providas com cochos de cimento, bebedouros automáticos individuais e camas de areia para o descanso. O estábulo possuía ventiladores suspensos no teto que eram ligados nas horas mais quentes do dia, para amenizar os efeitos de temperatura ambiente.

Delineamento experimental e Tratamentos

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado divididos em dois períodos experimentais (**Tabela 1**). A escolha por apenas dois períodos experimentais é atribuída à tentativa de evitar a diluição do efeito de desafio às dietas de alto concentrado pelo possível aprendizado adquirido ou memória metabólica de evitar grandes ingestões de concentrado.

Os tratamentos foram em número de três, respectivos aos diferentes modificares ruminais mais o grupo controle:

Tratamento A: Controle

Tratamento B: Monensina

Tratamento C: PAP

O fornecimento dos aditivos foi realizada duas vezes ao dia, entre os dias 0 e 14 de cada período experimental, via fístula ruminal, antes de cada refeição e dentro de envelopes confeccionados em papel absorvente. A monensina foi administrada na dose $300 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$, o que corresponde a $3 \text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$ do produto comercial Rumensin - Elanco[®]. Este produto comercial contém 10% de monensina sódica por quilo de produto. Já o PAP (CAMAS Inc[®]) foi administrado na dose de $3 \text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$ (correspondente a 10 mL do produto líquido).

Período experimental

O experimento teve duração total de 55 d, divididos em dois períodos de 20 d cada (d -5 ao d 14), com intervalo de readaptação à dieta volumosa de 15 d entre os períodos, a fim de reestabelecer as condições normais de pH ruminal, juntamente com a repovoação do rúmen pelos microrganismos celulolíticos. Durante o d -5 ao -1, os animais receberam apenas dieta volumosa, composta de cana-de-açúcar suplementada com uréia (1.4% da MS) e sal mineral, de forma a suprir uma quantidade considerável de proteína bruta aos animais (14.05 % de PB, 43.98% de FDN e 22.18% de FDA, baseado na MS). A partir do d 0, foi oferecida a dieta concentrada (53.6% da MS composta pela silagem de grãos úmidos de milho) até o d 14. Entre o d -5 ao d 14 foram medidas as seguintes variáveis: consumo individual de matéria seca; determinação do pH ruminal; concentração ruminal de lactato total; dosagem de ácidos graxos de cadeia

curta (AGCCs) no conteúdo ruminal; dosagem das concentrações de nitrogênio amoniacal no conteúdo ruminal.

Anteriormente aos dois períodos experimentais, aproximadamente 20 kg de conteúdo ruminal foi extraído de cada animal e feita a mistura dessas porções. Logo após esse procedimento, a mesma quantidade de conteúdo ruminal retirado e já misturado, foi devolvida a cada animal. Tal procedimento visou à homogeneização da população microbiana ruminal anteriormente a aplicação do tratamento experimental.

Manejo nutricional

Independentemente do tipo de dieta fornecida, os alimentos foram oferecidos duas vezes ao dia, às 0800h e 1600 h. A dieta desafio foi administrada na forma de ração completa, com relação volumoso:concentrado de 26:74, na qual a fonte de volumoso utilizada foi a cana-de-açúcar fresca (2.9% de PB, 47.48% de FDN e 25.68% de FDA, baseado na MS) e picada com partícula média de 1,14 cm de acordo com metodologia proposta por Lammers et al. (1996). A porção protéica concentrada da dieta foi composta por farelo de soja (44.12% de PB, 20.57% de FDN e 7.30% de FDA, baseado na MS), enquanto a silagem de grãos úmidos de milho (7.91% de PB, 6.22% de FDN e 3.31% de FDA, baseado na MS) foi usada como fonte energética. As proporções dos diversos ingredientes na dieta e a composição bromatológica da mesma está descrita na **Tabela 2**. As análises bromatológicas e de matéria seca, matéria mineral (MM), PB, extrato etéreo (EE), cálcio e fósforo foram realizadas de acordo com AOAC (1990), enquanto as de FDN corrigidas para cinzas e FDA foram realizadas de acordo com Van Soest et al. (1994). Para a análise de FDN, foi adicionada a α -amilase e uréia. A concentração de amido foi realizada segundo Pereira e Rossi Jr. (1995), fazendo-se a prévia extração de carboidratos segundo Hendrix (1993). A dieta foi formulada segundo o NRC (2001) e avaliada no programa CNCPS versão 5.0.40 (Fox et al., 1992).

Preparado de anticorpos policlonais

Procedimentos similares aos descritos por DiLorenzo et al., (2006) foram utilizados para a geração dos PAP, com a exceção de que um PAP multivalente foi testado, ao invés de preparados específicos como descrito anteriormente. Os anticorpos policlonais foram produzidos pela CAMAS Inc. (Le Center, MN, USA). O produto

comercial contém 39.5% de imunoglobulinas contra *Streptococcus bovis* (ATCC 9809), 17.6 % contra *Lactobacillus ssp.* (ATCC 4356; 14917; 9649 e 7469), 13.20% contra *Fusobacterium necrophorum* (ATCC 27852), 17.6% contra *E. coli* O157:H7 e endotoxinas. *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus ssp.* são as bactérias que mais produzem ácido láctico durante o processo de acidose, *Fusobacterium necrophorum* é o causador de abscessos hepáticos em animais com acidose, enquanto a *E. coli* é um patógeno para humanos que habita o rúmen e as endotoxinas são os lipopolissacarídeos que estão presentes nas paredes de bactérias ruminais gram-negativas, sendo liberadas em situações de morte bacteriana e podem debilitar o sistema imune do animal hospedeiro. O PAP com a forma de apresentação sólida foi obtido pelo processo de SPRAY-DRYER, o qual foi mantido em embalagens hermeticamente fechadas durante o período experimental, protegidas do calor e luz solar.

Colheita de amostras e métodos laboratoriais

Ingestão de matéria seca

Para avaliação da ingestão de matéria seca (em kg = **IMKG**; em % PV = **IMPV** e peso metabólico = **IMPM**), as dietas fornecidas e as sobras foram coletadas e pesadas, iniciando-se no d -4 e finalizando-se no d 15. O manejo de cocho visava à sobra ao redor de 10% da quantidade de alimento oferecida aos animais. Se ocorresse uma sobra <10%, aumentava-se 10% do oferecido no dia anterior. Caso contrário, sobra acima de 10%, retirava-se 10% da quantidade oferecida anteriormente. Adicionalmente, a flutuação de ingestão de matéria seca (**FIMS**) foi calculada para cada animal, como a diferença do consumo de matéria seca entre dias consecutivos. O cálculo foi realizado entre os dias -1 e 3 de cada período experimental, de acordo com metodologia proposta por Bevans et al. (2005).

Parâmetros de fermentação ruminal

Em cada coleta diária, foram retirados em três diferentes pontos do rúmen (através de uma bomba elétrica à vácuo), pelo menos 500 mL de conteúdo ruminal, que foram devolvidos ao rúmen-retículo, após colheita das devidas alíquotas. As coletas

foram realizadas diariamente, desde o d -5, às 11 h, ou seja, três horas após o arraçoamento matinal, efetuado às 0800 h.

pH ruminal. Imediatamente após a coleta, 100 mL de fluido ruminal foram utilizados para a determinação do pH em potenciômetro digital portátil (HANNA instruments HI8424), calibrado com soluções tampão de pH 4.0 e pH 7.0.

Dias em que os animais apresentaram acidose (DEA). De acordo com definições criadas por diversos autores (Britton e Stock, 1989; Owens et al., 1998; Kause e Oetzel, 2006 e Nagaraja e Titgemeyer, 2007), é considerada a ocorrência de acidose subaguda quando o pH for ≤ 5.6 . Desta maneira, contabilizou-se o número de dias cujo pH ruminal de cada animal dentro de determinado tratamento foi constatado $\text{pH} < 5.66$. A adoção da segunda casa decimal deve-se a sensibilidade do aparelho de mensuração de pH. Assim, valores de pH a partir 5.66 foram considerados pH 5.7 e descartados como pH acidótico. Foi contabilizada apenas a fase experimental pós-desafio e os resultados foram expressos em porcentagem desta fase.

Lactato total. Para a determinação da concentração ruminal de lactato total, 2 mL de líquido ruminal foram colocados em tubos de ensaios sem conservantes e mensurados posteriormente pela técnica colorimétrica segundo Pryce (1969).

Ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs). Para a determinação dos ácidos graxos de cadeia curta, uma fração de aproximadamente 100 mL de conteúdo ruminal foi centrifugada a 3500 x g por 15 min; 1 mL do sobrenadante foi colocado em tubo de ensaio arrolhado, sendo acondicionado com 0.2 mL de ácido fórmico e mantido em congelador (-20 °C) até o momento da análise, realizada através de cromatografia gasosa, segundo método descrito por Erwin et al. (1961). Para esta avaliação foi utilizado cromatógrafo a gás (Thermo Scientific[®], modelo Focus GC) com injetor automático de amostras (Thermo Electron Corporation[®], modelo AS-3000) equipado com coluna de vidro de 2 m de comprimento e 1/5" de diâmetro interno empacotada com fase estacionária 80/120 Carbopack[®] B-DA/4% Carbowax[®] 20M (Supelco[®]) e detetor de ionização de chama (FID) mantido à 270°C. O forno do cromatógrafo a gás foi mantido a 190°C durante as análises e a temperatura do injetor foi de 220 °C. O gás de arraste foi o H₂ de alta pureza, mantido em fluxo de 30 mL/min. O número de repetições por amostra foi aquele necessário para que a diferença entre leituras seja inferior a 5%.

Nitrogênio amoniacal. Para determinação da concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃), frações de 2 mL de líquido ruminal foram colocadas em tubos de ensaio contendo 1 mL de solução de ácido sulfúrico 1N e armazenadas sob refrigeração até a realização das análises por colorimetria, segundo método descrito por Kulasek (1972) e adaptado por Foldager (1977).

Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando-se do programa computacional Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2003), sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo Teste de SHAPIRO-WILK (PROC UNIVARIATE) e as variâncias comparadas pelo Teste “F”. Os dados (variável dependente) que não atenderam a estas premissas foram submetidos à transformação logarítmica [Log (X+1)] ou pela raiz quadrada [RQ (X+1/2)]. Os dados originais ou transformados, quando este último procedimento foi necessário, foram submetidos à análise de variância que separou como fontes de variação os efeitos de tratamentos e período, adicionados ainda do fator medidas repetidas no tempo, referentes aos diferentes dias de amostragem (**Tabela 3.**). Tal análise foi realizada utilizando-se o procedimento MIXED do SAS. A análise por tempo somente foi realizada quando as interações entre efeito de tempo e efeito de tratamentos foram significativas. A separação entre as médias foi realizada pelo teste de Tukey. Foi utilizado um nível de significância de 5% para todos os testes realizados.

RESULTADOS

Ingestão de matéria seca

Não foram encontradas interações entre dia e tratamento para IMKG ($P = 1.000$), IMPV ($P = 0.9999$), IMPM ($P = 0.9999$) e FIMS ($P = 0.9411$). A administração dos aditivos alimentares via cânula ruminal não resultou em alterações ($P > 0.1143$) de ingestão de matéria seca (IMKG, IMPV, IMPM e FIMS) para nenhum dos tratamentos, quando comparados ao controle (**Tabelas 4 e 5**). Entretanto, foi encontrado efeito de dia ($P < 0.0001$) para todas as variáveis de ingestão de matéria seca citadas acima. Nota-se

que ocorreu grande pico de ingestão no d 0 (18.29 kg ou 2.60% do PV), dia de início do fornecimento da dieta desafio, seguido de grande declínio no d 1 (3.67 kg ou 0.54 % do PV; **Figuras 1 e 2**). A partir do d 2, a ingestão de matéria seca apresentou o padrão crescente (8.34 kg ou 1.23 % do PV) e se estabilizou ao redor do d 8 (12.96 kg ou 1.86 % do PV). Tal instabilidade de ingestão de matéria seca pode ser observada na **Tabela 5**. A diferença média de ingestão entre a dieta de forragem no d -1 e a dieta desafio no d 0, foi de 10.61 kg a mais para a dieta concentrada. Em contrapartida, os animais ingeriram 14,63 kg de ração a menos no d 1, em relação ao d 0. Adicionalmente, foi observada a diminuição da variação da IMS a partir do d 2 (4,67 kg) e d 3 (1,29 kg), o que corrobora com o padrão crescente encontrado na IMKG e IMPV.

Fermentação ruminal

pH. Não foi encontrada interação entre dia e tratamento ($P = 0.1936$) para a variável pH. A adição intraruminal de monensina resultou em maior pH ($P < 0.0001$) na terceira hora pós-prandial, comparado aos outros tratamentos (MON = 6.06 vs. CTL = 5.91 e PAP = 5.89; **Tabela 6**). Adicionalmente, foi encontrado efeito de dia ($P < 0.0001$) para essa variável, onde é possível observar o início de queda de pH no d 0 e declínio máximo no d 1 (**Figura 3**). Apesar de não encontrada diferença significativa ($P = 0.1410$) para DEA, é válido relatar que desde o d 1, a transição de pH acidótico para o normal, encontrado em dietas de alto concentrado, do tratamento com MON foi mais rápida e perdurou quase todo o período experimental pós-desafio (32.22% do período pós-desafio em DEA), em comparação ao CTL (60.00% em DEA) e ao PAP (58.89% em DEA; **Tabela 6 e Figura 3**).

Lactato. Não foi observada interação entre dia e tratamento ($P = 0.7771$) para a variável lactato. Complementariamente, a concentração molar de lactato permaneceu baixa durante todo o período experimental (0.23 mM), constatação essa permissiva para a classificação da acidose induzida como subaguda.

AGCCs. Para concentração molar dos ácidos graxos de cadeia curta totais (AGCT) não foi observada interação entre dia e tratamento ($P = 0.1972$). Ainda, observou-se efeito de tratamento ($P = 0.0194$). Contudo, o teste de comparação entre médias (Tukey) não detectou diferença estatística ao nível de significância de 5%. Semelhantemente a todas as outras variáveis experimentais, foi detectado efeito de dia

($P < 0.0001$), no qual a AGCT passou de aproximadamente 90 mM no período pré-desafio, para o valor máximo de 135 mM no d 1 e estabilizando ao redor de 129 mM a partir do d 8 (dados não apresentados).

A interação entre dia e tratamento não foi significativa ($P = 0.3755$) para proporção molar de acetato. Adicionalmente, os aditivos alimentares não influenciaram a proporção molar de acetato ($P = 0.3288$; **Tabela 6**). Houve efeito de tempo ($P < 0.0001$) para a proporção molar desse AGCC, o qual pode ser observado na **Figura 4**, onde as proporções molares passaram de aproximadamente 60% para ao redor de 55%, após o fornecimento da dieta desafio.

Relacionado à proporção molar de propionato, houve interação entre dia e tratamento ($P < 0.0079$; **Figura 5**), na qual se observa o aumento da proporção molar desse AGCC nos animais tratados com MON durante os quatro dias subsequentes ao desafio. Assim, também foi observada interação entre dia e tratamento ($P = 0.0007$) para a relação acetato/propionato, na qual a MON reduziu essa proporção nos três dias seguintes ao desafio (**Figura 6**).

Não houve interação entre dia e tratamento ($P = 0.2517$) para a proporção molar de butirato. Os dois tipos de aditivos alimentares foram eficazes ($P < 0.0001$; **Tabela 6**) em diminuir a proporção molar de butirato (MON = 15.42 e PAP = 16.35 vs. CTL = 18.43).

N-NH₃. A interação entre dia e tratamento não foi significativa ($P = 0.8998$) para a concentração de N-NH₃. Contudo, foi encontrado efeito de tratamento ($P = 0.0039$), no qual os animais tratados com os aditivos alimentares apresentaram maiores concentrações que os animais CTL (MON = 14.74 e PAP = 13.64 vs. CTL = 11.20). Ainda, o efeito de dia foi significativo ($P < 0.0001$), onde os animais passaram de concentração ao redor de 19 mg/dL quando alimentados com forragem, para 27 mg/dL no d 0, 3.56 no d 1 e permanecendo ao redor de 12 mg/dL (com grandes variações) até o final do experimento (**Figura 7**).

DISCUSSÃO

Ingestão de matéria seca

O planejamento experimental foi, na maioria dos aspectos, fidedigno à simulação do contexto extremo e possível de acontecer em operações comerciais intensivas de engorda de bovinos. Em tais contextos, os animais passam pela rápida transição de dietas compostas por capim, para as de terminação ricas em concentrados. Para tanto, também optou-se pela administração dos tratamentos experimentais no momento da transição de dietas, partindo-se do fato que 35.5% dos consultores brasileiros não recomendam programas nutricionais de pré-recebimento, anteriormente à alocação dos animais confinamento, enquanto que os restantes não fornecem aditivos alimentares para os animais durante esse manejo (Millen et al., 2009).

Contudo, diferentemente do que ocorre rotineiramente no campo, onde os aditivos alimentares são misturados com suplemento mineral, no presente estudo, os tratamentos foram administrados via cânula ruminal. O procedimento experimental de administração intraruminal garante a dose constante dos tratamentos ao longo do período pós-desafio, o que não pode ser conseguido via suplemento mineral, e adicionalmente, evita a ocorrência de resultado falso negativo para o PAP, haja visto que o óxido de magnésio, presente nas misturas minerais, pode apresentar efeitos deletérios sobre a atividade dos anticorpos (Mitteness, CAMAS Inc., citação pessoal).

Contrariamente ao esperado, a MON não reduziu a IMS a partir do fornecimento da dieta desafio. A redução da IMS e aumento de eficiência alimentar em animais alimentados com dietas de alta proporção de concentrados e tratados com MON, em relação aos não tratados, são bem documentadas pela literatura (Goodrich et al., 1984). Da mesma forma, reduções de ingestão em animais que recebiam MON foram encontradas em estudos de desempenho comparativos com o PAP (Millen et al., 2007; Millen et al., 2009). No entanto, similarmente ao presente estudo, Barducci et al. (2009) não encontraram redução de IMS em animais que recebiam MON, também em comparação ao PAP.

Do ponto de vista metabólico, a avaliação do comportamento ingestivo dos animais alimentados com alto teor de concentrados e tratados com esse ionóforo pode fornecer melhores informações do que a simples quantificação da ingestão total diária,

como no caso de Mariani et al. (2009) e Erickson et al. (2003), os quais observaram que os animais que recebiam MON diminuíram a quantidade de alimento ingerido por refeição, a duração de cada refeição e a variância entre refeições e, conseqüentemente, aumentaram o número de refeições, enquanto não alteraram as quantidades totais de ingestão diária de matéria seca (Erickson et al., 2003). Possivelmente, esse seja o melhor modo de ação para um aditivo alimentar preventivo à acidose subaguda, pois esta é causada pelo acúmulo ruminal de AGCCs (Nagaraja e Titgemeyer, 2007) e, sendo assim, o controle da IMS evita o sobrecarregamento do rúmen com concentrados. Talvez, se tivesse sido realizada a avaliação do comportamento ingestivo dos animais no presente estudo, fosse possível explicar parcialmente a mais rápida recuperação de pH para os padrões saudáveis, nos animais tratados com MON. Portanto, o melhor entendimento do mecanismo e situações pelas quais a MON controla de forma eficiente a IMS, mesmo após três décadas de uso e estudo em bovinos, ainda necessita de maiores esclarecimentos. Portanto, a avaliação do comportamento ingestivo pode se revelar como variável importante para a elucidação desta constatação, se aplicada em estudos de metabolismo e cinética ruminal.

A grande quantidade de alimento ingerido no dia do desafio (d 0), pode ser explicada pelo fato dos ruminantes apresentarem preferência por alimentos que corrijam a deficiência nutricional de determinada dieta (Forbes e Provenza, 2000). Em um estudo conduzido com cordeiros alimentados com palha de trigo misturada com dois tipos de flavorizantes (Villalba e Provenza, 1997), associados ou não com infusão intraruminal de amido, os cordeiros preferiram ingerir a palha que era acompanhada da infusão de amido, independente do flavorizante. A hipótese para tal preferência consiste em que o amido é rapidamente fermentado a ácidos graxos de cadeia curta, predominantemente propionato, no rúmen. A produção de propionato aparentemente é insuficiente para a síntese de glicose em animais alimentados com a palha de trigo (Villalba e Provenza, 1996), situação esta bastante semelhante aos animais do presente estudo durante a fase pré-desafio, quando eram alimentados apenas com cana. Outro fator que contribuiu para o pico de ingestão é o fato dos animais serem de raça que desenvolve grande tamanho corporal (holandesa) e estarem bastante pesados, o que resulta em alta taxa de manutenção corporal. Assim, isso pode ter aumentado a avidez pelo concentrado no momento do desafio e proporcionado o padrão crescente de IMS a partir do d 2.

Por outro lado, diversas teorias podem ser aplicadas para a baixa IMS ocorrida no d 1. A primeira delas baseia-se na diminuição da motilidade ruminal, inibida por alguns mecanismos ocorridos na fase de baixo pH, dentro do ambiente rumino-reticular (Kleen, et al., 2003). A alta produção de AGCCs em ruminantes alimentados com dietas de alto teor de concentrados leva à diminuição da motilidade ruminal (Slyter et al., 1976). Coincidentemente, a grande diminuição da IMS observada no presente experimento, deu-se no dia da menor mensuração de pH ruminal (d 1), fato este indicativo do acúmulo de AGCCs durante este dia. Endotoxinas bacterianas (Verheinden et al., 1981; Hoeben, et al., 2000, citados por Kleen et al., 2003) e histaminas (Kania et al., 1994), também ocasionam hipomotilidade ruminal, sendo que essas substâncias podem ser produzidas em quadros de acidose ou em vacas alimentadas com dietas de alto teor de grãos (Nocek, 1997; Andersen, 2003). Outra teoria é proposta por Owens et al. (1998), o qual descreve que o aumento de osmolaridade do conteúdo ruminal como resultado da absorção reduzida e aumento de substâncias que contribuem para tal incremento de osmolaridade, como glicose, AGCCs e lactato, podem levar ao fluxo de fluido para dentro do rúmen e, desta forma, reduzir a IMS.

Relacionado a FIMS, Fulton et al. (1979) observaram quedas de IMS após a ocorrência de acidose e sugerem que padrões cíclicos de IMS podem refletir surtos de acidose ruminal. Complementariamente, aumentos da variação de IMS foram identificados como indicador de acidose subaguda (Britton e Stock, 1987; Bauer et al., 1995; Stock et al., 1995). No presente estudo, as maiores variações de IMS, ocorreram entre o d -1 e d 1, sendo que no d 1, foi observado o menor pH médio diário (5.43), e assim, também corrobora com o sugerido pelos autores citados acima. Contudo, a variação diminuiu com o passar dos dias e ao invés de padrões cíclicos, como o esperado em animais que passam por acidose ruminal, observou-se padrão crescente de IMS a partir do d 2, como comentado anteriormente.

Forbes e Provenza (2000), hipotetizaram que sinais de várias famílias de receptores viscerais (incluindo sinais gerados por numerosos metabólitos interagindo no fígado e outros órgãos sensíveis ao fluxo metabólico), juntamente com sinais do tecido adiposo, estímulo social e fatores ambientais, são integrados pelo sistema nervoso central de maneira aditiva para a geração do sinal total de “desconforto”. O animal, então, ajusta a ingestão ou escolha de alimento na direção contínua de redução deste

desconforto. Baseado na constatação de que a estabilização da IMS ocorreu ao redor do d 8, pode-se presumir que também o sinal de desconforto foi reduzido neste período.

A partir do fato que a dieta desafio ser próxima das dietas de terminação recomendadas pelos nutricionistas de confinamento brasileiros (Millen, et al., 2009), a investigação de protocolos de adaptação mais rápida (entre 7 e 14 dias) à dietas de terminação, em comparação à clássica (21 a 28 dias; Brown et al., 2006; Vasconcelos e Galyean, 2007), torna-se bastante interessante, principalmente pela razão de que o período médio de dias em alimentação dos confinamentos brasileiros ser menor que os americanos (Vasconcelos e Galyean, 2007; Millen et al., 2009).

Fermentação ruminal

pH. Reunindo-se as variáveis de pH e lactato, é possível classificar a acidose gerada pelo desafio como subaguda (Nagaraja e Titgemeyer, 2007). O desafio com a dieta de alto teor de concentrados atendeu à expectativa de provocar alguns sinais clínicos indicadores de acidose subaguda. Todos os animais apresentaram diarreia no d 1. A alteração das fezes pode ter ocorrido devido ao grande fluxo de carboidratos prontamente fermentescíveis do rúmen para o intestino. Logo ocasionou demasiada fermentação neste órgão (Oetzel, 2000). Também, a grande osmolaridade da ingesta, descrita em animais acometidos por acidose subaguda, possui a capacidade de reter líquido no lúmen e mudar a consistência fecal (Garry, 2002).

Adicionalmente, um animal apresentou ao final do primeiro período experimental, o conteúdo ruminal sem a segregação entre a fase líquida e sólida, normalmente encontrada em rúmens de animais saudáveis, além de aspecto espumoso. O mesmo animal desenvolveu timpanismo espumoso nos dois últimos dias do segundo período experimental.

Assertivamente, a MON controlou o pH ruminal, em comparação ao PAP e ao CTL. Ainda, outra observação a respeito da avaliação desta variável experimental é válida. Os dados médios de pH presentes na **Tabela 6** visam a avaliação de todas as fases do delineamento experimental. Dessa maneira, a fase de alimentação com forragem é incluída na média. Se realizada a média do pH apenas no período de alimentação com a dieta de concentrado (cálculo permitido pelo fato de os tratamentos terem sido administrados no d 0), é observado que a MON controlou a acidose ruminal

(pH 5.84), enquanto os dois outros tratamentos apresentaram a média de pH acidótica (pH 5.63).

Os efeitos da MON como controladora de populações das bactérias produtoras de lactato em situações *in vivo* e *in vitro* propensas à acidose aguda (Owens et al., 1998) são bem relatados na literatura. Entretanto, não é o caso do presente estudo, pois as concentrações de lactato permaneceram próximas de zero. As alterações microbiológicas em situações de acidose aguda e láctica são bem documentadas pela literatura (Dirksen, 1970; Dunlop, 1972; Slyter, 1976; citados por Nagaraja e Titgemeyer, 2007), mas muito pouco é conhecido sobre as alterações ocorridas na acidose subaguda (Goad et al., 1998). Possivelmente, pelo fato da MON ser um antibiótico de largo espectro, tenha reduzido a taxa de fermentação ruminal, como é possível observar pelo efeito de tratamento sobre os AGCT.

Complementariamente, a falta de efeito do PAP em controlar o pH ruminal foi possivelmente devido à alta especificidade destes anticorpos. As bactérias alvos deste preparado são, em grande maioria, as produtoras de lactato. Como a acidose imposta pelo desafio foi causada pelo acúmulo de AGCCs, as condições propícias para a real avaliação deste aditivo não foram atingidas. Portanto, novos experimentos que induzam a condição de acidose láctica ruminal com o PAP ainda são necessários. Contudo, a observação da falta de resultados em estudos conduzidos com o PAP na forma sólida (Barducci et al., 2009 e Bastos, 2009) é no mínimo intrigante e levanta a dúvida se ocorre a perda de atividade dos anticorpos durante a transformação da fase líquida para sólida. Aconselham-se estudos de comparação entre as duas formas de apresentação do produto, bem como novas técnicas de secagem.

Com relação aos DEA, a falta de significância da diferença entre médias pode ter ocorrido devido ao alto EPM (6.93). Talvez se houvessem mais repetições experimentais, fosse possível detectar diferença significativa. Por outro lado, o alto EPM reflete a grande variabilidade da susceptibilidade à acidose entre os animais, ainda que alocados no mesmo tratamento. Tal variabilidade é bem reportada pela revisão de Nagaraja e Titgemeyer (2007) e pelos experimentos de Brown et al. (2000) e Bevans et al. (2005). Entretanto, as causas dessas diferentes susceptibilidades ainda são, em grande parte, desconhecidas e apresentam-se como o limiar da barreira do conhecimento sobre a etiologia da acidose ruminal. Possivelmente, as ferramentas desenvolvidas pela

nutrigenômica e biologia molecular possam elucidar as diferenças entre animais e proporcionar melhores desenhos experimentais com o número reduzido de animais.

No presente estudo foi assumido que ao redor da terceira hora pós-prandial fosse possível detectar os baixos valores de pH diurnos. Entretanto, a definição mais detalhada de acidose considera o pH de 5.6 por 12 h de duração em determinado dia ou o pH de 5.2 por 6 h de duração (Owens et al., 1998). Assim, pode ter ocorrido tanto a subestimação quanto a superestimação do real desafio imposto aos animais. A mensuração da variação diária de pH por longos períodos de dias, como no caso deste ensaio experimental, torna-se difícil e tecnologias de mensuração de pH mais refinadas, a exemplo das probes que armazenam ou transferem o dados em tempo real, são necessárias. Contudo, ao aliar-se os dados de pH ruminal e IMS ao longo de muitos dias experimentais, possibilitou a recomendação de investigação de protocolos de adaptação a dietas de terminação usadas nos confinamentos brasileiros.

AGCCS. Os efeitos da monensina em alterar a fermentação ruminal são decorrentes das mudanças na ecologia microbiana do rúmen (Chen e Wolin, 1979; Wallace et al., 1982, citados por Barger e Bates, 1984). O aumento da proporção molar de propionato, diminuição da relação acetato/propionato e diminuição das proporções molares de butirato nos animais tratados com MON podem ser explicados pela inibição do crescimento da população de bactérias gram-positivas, as quais são sensíveis aos ionóforos e produzem principalmente acetato, butirato, H₂ e formato (Barger e Bates, 1984). Contudo, com a constatação das alterações citadas acima, esperaria-se a diminuição da proporção molar de acetato, efeito esse sustentado pelo grande número de experimentos (Challupa, 1977; Barger e Bates, 1984). Provavelmente, a diminuição das proporções molares de acetato ocorra em situações experimentais nas quais a fermentação ruminal já esteja estabilizada, contrariamente ao presente estudo. Assim, com a mudança abrupta de dieta e início da administração dos tratamentos no momento do desafio, levou-se certo tempo para a alteração do perfil populacional ruminal, antes composto por bactérias fermentadoras de carboidratos estruturais e produtoras de acetato, para o aumento das bactérias fermentadoras de carboidrato não-estrutural, bem como a inibição do crescimento das populações de bactérias gram-positivas nos animais tratados com monensina. Complementariamente, baixas relações de acetato/propionato são desejáveis até certo ponto em animais de corte, em função de manter o ganho de

peso diário necessário (Kleen et al., 2003). Contudo, podem levar à diminuição da IMS e GPD em situações instáveis (Stock, 2000). Em animais leiteiros, relações estreitas entre esses dois ácidos, possuem a capacidade de desencadear a queda da gordura do leite e aumentar o escore corporal desses animais (Dirksen, 1985).

Similarmente à MON, o PAP reduziu as concentrações de butirato, efeito este benéfico em situações propícias à acidose subaguda. Infusões de butirato em bezerros alimentados com dieta líquida resultaram em maiores pesos da parte aglandular do estômago (Costa et al., 2008a). No entanto, o butirato juntamente com o lactato foram os maiores indutores de alterações patológicas (lesões histológicas) nas papilas ruminais (Costa et al., 2008b). O aumento do tamanho das papilas ruminais pode estar relacionado com o maior fluxo sanguíneo nessas estruturas e pela ligeira resposta inflamatória causada pelo acúmulo deste ácido no epitélio (Lyford Jr., 1993), já que o butirato é comumente retido neste tecido em grandes proporções. Ainda, este AGCC está relacionado aos distúrbios de torções de abomaso (Van Winden et al., 2003). Portanto, as altas concentrações de butirato parecem exercer processos deletérios sobre as estruturas absorptivas de AGCCs no rúmen, o que pode ser prejudicial em situações de desafio com dietas de alto concentrado justamente por contribuir para o acúmulo ruminal desses ácidos.

Paralelamente, é conhecido que o propionato promove o desenvolvimento papilar e aumenta a área de absorção ruminal de AGCCs pela mucosa (Dirksen et al., 1984). Assim, é possível inferir a contribuição indireta da MON em controlar o pH ruminal ao longo do dias experimentais pela constatação de que esse aditivo alimentar aumentou a proporção deste AGCC no dias subsequentes ao desafio. Sarti et al. (2009) observaram maior superfície de absorção/cm² de parede ruminal e maior área papilar (% da superfície de absorção) em animais que recebiam MON, o que corrobora com a teoria de que MON aumentar o desaparecimento dos AGCCs, por aumentar a absorção ruminal destes ácidos e, por conseguinte, diminuir a chance do desenvolvimento de acidose.

N-NH₃. Contrariamente ao esperado, os animais tratados tanto com MON quanto PAP apresentaram maiores concentrações de N-NH₃ ruminal. Ambos os aditivos alimentares têm como forma de ação o controle da população de *Streptococcus bovis*, bactéria ruminal gram-positiva altamente proteolítica (Russel et al., 1981) e, dessa

forma, pode atuar de forma indireta na produção de amônia. Adicionalmente, a MON possui a capacidade de particionar o metabolismo de proteína, pela diminuição da produção ruminal de N-NH₃ (Chalupa, 1980) e aumento do escape da degradação ruminal da proteína dietária (incremento da proteína passante de 22 a 55%; Owens et al., 1980 e Poos et al., 1979, respectivamente).

Contudo, apesar do grande uso deste ionóforo ao longo de décadas, o efeito de partição protéica nunca foi explicado de forma satisfatória (Chen e Russell, 1988), principalmente pela observação de que a maior parte das bactérias ruminais produtoras de amônia isoladas ser gram-negativa (Bladen et al., 1961). Chen e Russel (1988; 1989) foram capazes de obter três isolados de bactérias gram-positivas (*Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii* e *Clostridium aminophilum*) com atividades altamente específicas para a produção de amônia, além de serem sensíveis à MON em estudos *in vitro*.

Por outro lado, Krause e Russell (1996) com o intuito de examinar a influência da MON sobre a persistência e abundância de bactérias fermentadoras obrigatórias de aminoácidos, aliaram as técnicas de amostragem *in vivo* com culturas contínuas *in vitro* inoculadas com PRB (bactérias ruminais predominantes) e observaram que a *C. aminophilum* foi persistente e relativamente abundante tanto *in vivo* quanto *in vitro*, na presença de MON. A conclusão dos autores citados acima é bastante válida para o presente estudo: a MON não possui grande impacto na cinética de produção ruminal de amônia devido à persistência da bactéria *C. aminophilum*. Ainda, necessita-se de maiores investigações para explicar o aumento das concentrações ruminais de N-NH₃ nos animais tratados com PAP.

A amônia é a base predominante no rúmen (Owens et al., 1998) e dessa maneira, a queda acentuada da concentração deste composto químico observada no d 1, pode ter ocorrido pelo baixo pH ruminal, juntamente com o grande decréscimo da IMS neste dia. Ainda, grande parte do N-NH₃ pode ter sido incorporado pelas bactérias, as quais possivelmente apresentavam grande taxa multiplicativa durante este período experimental.

Reunindo-se os dados de fermentação ruminal do presente estudo, notadamente foi observado que os resultados significativos para a MON ocorreram entre o dias d 1 e d 4, com exceção dos valores de N-NH₃. Sobretudo, a partir de tal constatação, a

recomendação de novos estudos que visem a MON como aditivo alimentar preventivo à acidose subaguda em manejos de rápidas transições de dietas poderia focar o uso deste ionóforo somente na fase de adaptação ou pelo curto período de uma semana. Caso comprove-se o mesmo benefício para a saúde ruminal e desempenho, pela otimização da administração desse aditivo, atenderia-se parcialmente o requisito de produção intensiva de carne e leite com menor uso de antibióticos.

IMPLICAÇÕES

A monensina foi efetiva em controlar a acidose subaguda de bovinos desafiados com a transição abrupta para a dieta de alto teor de concentrado e melhorou a fermentação ruminal pela alteração das proporções molares dos AGCCs. Partindo-se dos resultados de fermentação ruminal deste estudo, encoraja-se a condução de projetos de pesquisas que avaliem o efeito da administração otimizada deste ionóforo por períodos mais curtos de tempo.

Conquanto à falta de resultados para o controle da acidose nos animais tratados com o PAP, isto pode ter ocorrido pelo fato de este produto visar o controle de bactérias produtoras de lactato. No entanto, a acidose gerada pelo desafio ocorreu pelo acúmulo de AGCCs. Portanto, as reais condições de avaliação deste aditivo alimentar não foram conseguidas neste experimento, o que abre a possibilidade de novos estudos para a avaliação deste preparado sob condições de acidose láctica. Adicionalmente, talvez o método de Spray-Dryer tenha afetado a atividade destes anticorpos. Assim, a investigação de outros processos de secagem, bem como a comparação do produto sólido versus o líquido, são necessárias.

LITERATURA CITADA

- Andersen, P. H. 2003. Bovine endotoxycosis: Some aspects of relevance to production diseases. *Acta Vet. Scand.* 98(Suppl.):141–155.
- AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis*. 15th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA.
- Barducci, R. S., L. M. N. Sarti, M. D. B. Arrigoni, R. D. L. Pacheco, D. D. Millen, C. L. Martins, S. R. Baldin, F. S. Parra, J. R. Ronchesel, D. Tomazella, T. Leiva, H. D. Rosa, T. M. Mariani, J. P. S. T. Bastos, T. C. Putarov. 2009. Feedlot performance of Brangus cattle fed monensin or polyclonal antibody preparation against lactate-producing rumen bacteria. *J. Anim. Sci.* 87 (Suppl.2):283-284 (Abs).
- Bastos, J. P. S. T., C. T. Marino, P. H. M. Rodrigues, M. D. B. Arrigoni, D. D. Millen, R. D. L. Pacheco, J. C. F. Carvalho. 2009. Efeito do preparado de anticorpos policlonais (PAP) sobre o pH ruminal de bovinos recebendo dieta de alto concentrado. Page 273. II Simpósio Internacional de Nutrição de Ruminantes FMVZ-UNESP. Botucatu.
- Bauer, M., R. Britton, R. Stock, T. Klopfenstein, and D. Yates. 1992. Laidlomycin propionate and acidosis. *Nebr. Cattle Feeders Day*. p. 46-48. University of Nebraska, Lincoln.
- Bergen, W. G., and D. B. Bates. 1984. Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. *J. Anim. Sci.* 58:1465-1483.
- Bevans, D. W., K. A. Beauchemin, K. S. Schwartzkopf-Genswein, J. J. McKinnon and T. A. McAllister. 2005. Effect of rapid or gradual grain adaptation on subacute acidosis and feed intake by feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 83:1116-1132.
- Bladen, H. A., M. P. Bryant and R. N. Doetsch. 1961. A study of bacterial species from the rumen which produce ammonia from protein hydrolyzate. *Appl. Microbiol.* 9:175-180.
- Blanch, M., S. Calsamiglia, N. DiLorenzo, A. DiCostanzo, S. Muetzel, and R. J. Wallace. 2009. Physiological changes in rumen fermentation during acidosis induction and its control using a multivalent polyclonal antibody preparation in heifers. *J. Anim. Sci.* 87:1722-1730.
- Britton, R. A., and R. A. Stock. 1987. Acidosis, rate of starch digestion and intake. *Okla. Agric. Exp. Stn. MP-121*. pp 125-137.
- Britton, R., and R. Stock. 1989. Acidosis: A continual problem in cattle fed high grain diets. Pages 8–15 in *Proc. Cornell Nutr. Conf. Feed Manuf.*, Cornell Univ., Ithaca, NY.
- Brown, M. S., C. H. Ponce, and R. Pulikanti. 2006. Adaptation of beef cattle to high-concentrate diets: Performance and ruminal metabolism. *J. Anim. Sci.* 84:E25–E33.
- Brown, M. S., C. R. Krehbiel, M. L. Galyean, M. D. Remmenga, J. P. Peters, B. Hibbard, J. Robinson, and W. M. Moseley. 2000. Evaluation of models of acute and subacute acidosis on dry matter intake, ruminal fermentation, blood chemistry, and endocrine profiles of beef steers. *J. Anim. Sci.* 78:3155–3168.
- Challupa, W. 1977. Manipulating rumen fermentation. *J. Anim. Sci.* 46:585-599.
- Chalupa, W. 1980. Chemical control of rumen microbial metabolism. In: Y. Ruckebush and P. Thivend (Ed.) *Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants*. p 325. AVI Publishing Co., Inc., Westport, CT.

- Chen, G. and J. B. Russel. 1988. Fermentation of peptides and amino acids by a monensin-sensitive ruminal *Peptostreptococcus*. *Appl. Environ. Micro.* 54:2742-2749.
- Chen, G. and J. B. Russell. 1989. More monensin-sensitive, ammonia-producing bacteria from the rumen. *Appl. Environ. Micro.* 55:1052-1057.
- Chen, M. and M. J. Wolin. 1979. Effect of monensin and lasalocid - sodium on the growth of methanogenic and rumen sacchrolytic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 38:72.
- Costa S. F., M. N. Pereira, L. Q. Melo, J. C. Resende Júnior and M. L. Chaves. 2008a. Alterações morfológicas induzidas por butirato, propionato e lactato sobre a mucosa ruminal e a epiderme de bezerros – I Aspectos histológicos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 60:1-9.
- Costa S. F., M. N. Pereira, L. Q. Melo, M. V. Caliari and M.L. Chaves. 2008b. Alterações morfológicas induzidas por butirato, propionato e lactato sobre a mucosa ruminal e epiderme de bezerros. II. Aspectos ultra-estruturais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 60:10-18.
- DiLorenzo, N., F. Diez-Gonzalez, and A. DiCostanzo. 2006. Effects of feeding polyclonal antibody preparations on ruminal bacterial populations and ruminal pH of steers fed high-grain diets. *J. Anim. Sci.* 84:2178-2185.
- DiLorenzo, N., C. R. Dahlen, F. Diez-Gonzalez, G. C. Lamb, J. E. Larson, and A. DiCostanzo. 2008. Effects of feeding polyclonal antibody preparations on rumen fermentation patterns, performance and carcass characteristics of feedlot steers. *J. Anim. Sci.* 86:3023-3032.
- Dirksen, G. 1970. Acidosis. Pages 612-625 in *Physiology of digestion and metabolism in the ruminant*. A. T. Phillipson, ed. Oriel Press, Newcastle, UK.
- Dirksen, G., H. G. Liebich, G. Brosi, H. Hagemeister, and E. Mayer. 1984. Morphologie der Pansenschleimhaut und Fettsäureabsorption beim Rind -bedeutende Faktoren für Gesundheit und Leistung. *Zbl. Vet. Med. A.* 31, 414-430.
- Dirksen, G. 1985. Der Pansenazidose-Komplex: neuere Erkenntnisse und Erfahrungen. *Tierärztliche Praxis* 13:501-512.
- Dunlop, R. H. 1972. Pathogenesis of ruminant lactic acidosis. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 16:259-302.
- Erickson, G. E., C. T. Milton, K. C. Fanning, R. J. Cooper, R. S. Swingle, J. C. Parrott, G. Vogel, and T. J. Klopfenstein. 2003. Interaction between bunk management and monensin concentration during an acidosis challenge with feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 81:2869-2879.
- Erwin, E. S., G. J. Marco, and E. M. Emery. 1961. Volatile fatty acids analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44:1768-1771.
- European Community. 2003. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and the Council of 22 September 2003 on Additives for Use in Animal Nutrition. *Off. J. L* 268:29-43.
- Foldager, J. 1977. Protein requirement and non protein nitrogen for high producing cow in early lactation. PhD Diss. Michigan State University, East Lansing, MI.
- Forbes, J. M. and F. D. Provenza. 2000. Integration of learning and metabolic signals into a theory of dietary choice and food intake. Pages 3-20 in *Ruminant physiology digestion, metabolism, growth and reproduction*. P. B. Cronjé, ed. CABI Publishing, New York, NY.

- Fox, D. G., C. J. Sniffen, J. D. O'Connor, J. B. Russell, and P. J. Van Soest. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. III. Cattle requirements and diets adequacy. *J. Anim. Sci.* 70:3578-3596.
- Fulton, W. R., T. J. Klopfenstein, and R. A. Britton. 1979. Adaptation to high concentrate diets by beef cattle. I. Adaptation to corn and wheat diets. *J. Anim. Sci.* 49:775-784.
- Garry, F. B., 2002. Indigestion in ruminants. Pages 722-747 in *Large animal internal medicine*. Smith, B. P. (ed.). 3rd ed. Mosby, St Louis.
- Goad, D. W., C. L. Goad, and T. G. Nagaraja. 1998. Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. *J. Anim. Sci.* 76:234-241.
- Goodrich, R. D., J. E. Garret, D. R. Gast, M. A. Kirick, D. A. Larson and J. C. Meiseke. 1984. Influence of monensin on the performance of cattle. *J. Anim. Sci.* 58:1484-1498.
- Hendrix, D.L. 1993. Rapid extraction and analyses of nonstructural carbohydrates in plant tissues. *Crop Sci.* 33:1306-1311.
- Hoeben, D., C. Burvenich, E. Trevisi, G. Bertoni, J. Hamann, R. Buckmaier, and J. W. Blum. 2000. Role of endotoxins and TNFalpha in the pathogenesis of experimentally induced coliform mastitis in periparturient cows. *J. Dairy Res.* 67: 503-514.
- Kania, B. F., M. Dutkiewicz, and P. Brikas. 1994. Different reactions of sheep to the intravenously administered Histamine. *Annals of Warsaw.* pp 91-97. Agricultural University No. 19, Warsaw.
- Kleen, J. L., G. A. Hooijer, J. Rehage and J. P. T. M. Noordhuizen. 2003. Subacute ruminal acidosis (SARA): a review. *J. Vet. Med.* 50:406-414.
- Krause, D.O. and J. B. Russell. 1996. A rRNA approach for assessing the role of obligate amino acid fermenting bacteria in ruminal ammonia production. *Appl. Environ. Micro.* 62:815-821.
- Krause, K. M., and G. R. Oetzel. 2006. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 126:215-236.
- Kulasek, G. A. 1972. A micromethod for determination of urea in plasma, whole blood cells using urease and phenol reagent. *Pol. Arch. Weter.* 15:801-810.
- Lammers, B.P., D.R. Buckmaster, e A.J. Heinrichs. 1996. A simple method for the analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. *J. Dairy Sci.* 79:922-928.
- Mariani, T. M., D. D. Millen, R. D. L. Pacheco, M. D. B. Arrigoni, R. S. Barducci, L. M. Sarti, S. R. Baldin, D. Tomazella, E. S. Ogawa, F. S. Parra, J. R. Ronchesel. 2009. Feeding behavior of Nellore and Brangus cattle fed monensin or polyclonal antibody preparation against lactate-producing rumen bacteria. *J. Anim. Sci.* 87:283. Supplement 2. Abstarcts.
- Millen, D. D., R. D. L. Pacheco, M. D. B. Arrigoni, C. L. Martins, J. P. B. Bastos, R. S. Barducci, L. M. Sarti, S. R. Baldin. 2009. Feedlot performance of Nellore and Brangus cattle fed monensin or polyclonal antibody preparation against lactate-producing rumen bacteria. *J. Anim. Sci.* 87 (Suppl.2):282-282 (Abs).
- Millen, D. D., R. D. L. Pacheco, M. D. B. Arrigoni, M. L. Galyean, and J. T. Vasconcelos. 2009. A snapshot of management practices and nutritional recommendations used by feedlot nutritionists in Brazil. *J. Anim. Sci.* 87:3427-3439.
- Millen, D. D., R. D. L. Pacheco, M. D. B. Arrigoni, M. Parrili, S. A. Matsuhara, M. V. Fossa, L. M. Sarti, C. L. Martins, J. P. S. Bastos, T. M. Mariani. 2007. Feedlot

- performance and rumen parakeratosis incidence in *Bos indicus* type bullocks fed high grain diets and monensin or polyclonal antibodies preparations against rumen bacteria. *J. Anim. Sci.* 85:552. Supplement 2. Abstracts.
- Nagaraja, T. G., and E. C. Titgemeyer. 2007. Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. *J. Dairy Sci.* 90:17-38.
- Nocek, J. E. 1997. Bovine acidosis: Implications on laminitis. *J. Dairy Sci.* 80:1005-1028.
- NRC. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Oetzel, G. R. 2000. Clinical aspects of ruminal acidosis in dairy cattle. Proceedings of the 33rd Annual Convention of the American Association of Bovine Practitioner, Rapid City, pp. 46–53.
- Owens, F. N., K. S. Lusby, K. Mizwicki and O. Forero. 1980. Slow ammonia release from urea: rumen and metabolism studies. *J. Anim. Sci.* 50:527-531.
- Owens, F. N., D. S. Secrist, W. J. Hill, and D. R. Gill. 1998. Acidosis in cattle: A review. *J. Anim. Sci.* 76:275-286.
- Pereira, J. R. A., and P. Rossi Jr. 1995. Practical manual of feedstuffs nutritional evaluation. 1st.ed. FEALQ., Piracicaba, SP.
- Poos, M. I., T. L. Hanson and T. J. Klopfenstein. 1979. Monensin effects on diet digestibility, ruminal protein bypass and microbial protein synthesis. *J. Anim. Sci.* 48:1516.
- Pryce, J. D. 1969. Modification of the Barker-Summerson method for the determination of lactic acid. *Analyst.* 94:1151-1152.
- Russel, J. B., W. G. Bottje and M. A. Cotta. 1981. Degradation of protein by mixed cultures of rumen bacteria. Identification of *Streptococcus bovis* as an actively proteolytic rumen bacterium. *J. Anim. Sci.* 53:242-252.
- Sarti, L. M. N., R. S. Barducci, D. D. Millen, R. D. L. Pacheco, M.D.B. Arrigoni, C. L. Martins, S. F. Costa, L. Q. Mello, F. S. Parra, J. R. Ronchesel, D. Tomazella, H. D. Rosa, S. R. Baldin, N. R. B. Cònsolo. 2009. Rumen papillae measurements of feedlot cattle fed monensin or polyclonal antibody preparation against lactate-producing rumen bacteria. *J. Anim. Sci.* 87:284. Supplement 2. Abstracts.
- SAS User's Guide: Statistics Version 9 Edition. 2003. SAS Inst., Inc., Cary, NC.
- Schwartzkopf-Genswein, K. S., K. A. Beauchemin, D. J. Gibb, D. H. Crews, Jr., D. D. Hickman, M. Streeter, and T. A. McAllister. 2003. Effect of bunk management on feeding behavior, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 81:149–158.
- Slyter, L. L. 1976. Influence of acidosis on rumen function. *J. Anim. Sci.* 43: 910–924.
- Stock, R. A., S. B. Laudert, W. W. Stroup, E. M. Larson, J. C. Parrott, and R. A. Britton. 1995b. Effect of monensin and monensin and tylosin combination on feed intake variation of feedlot steers. *J. Anim. Sci.* 73:39-44.
- Stone, W. C. 1999. The effect of subclinical rumen acidosis on milk components. Pages 40-46 in Proc. Cornell Nutr. Conf. Feed Manuf., Syracuse, NY. Cornell Univ., Ithaca, NY.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewes. 1991. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism and nutritional implications in dairy cattle. methods for dietary fiber, natural detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.

- Van Winden, S. C. L., R. Jorritsma, K. E. Müller, and J. P. T. M. Noordhuizen, 2003. Left displacement of the abomasums in dairy cattle: recent developments in epidemiological and etiological aspects. *J. Dairy Sci.* 86:1465-1471.
- Vasconcelos, J. T., and M. L. Galyean. 2007. Nutritional recommendations of feedlot consulting nutritionists: The 2007 Texas Tech University survey. *J. Anim. Sci.* 85:2772-2781.
- Verheiden, J. H. M., A. S. J. P. A.M. van Miert, A. J. H. Schotman, and C. T. M. van Duin, 1981. De pathogenese van coliforme mastitis. *Tijdschrift v. Diergeneeskunde* 106, 501-507.
- Villalba, J.J. and F. D. Provenza. 1996. Preference for flavored wheat-straw by lambs conditioned with intraruminal administrations of sodium propionate. *J. Anim. Sci.* 74:2362-2368.
- Villalba, J.J. and F. D. Provenza. 1997. Preference for flavored wheat straw by lambs conditioned with intraruminal infusions of acetate and propionate. *J. Anim. Sci.* 75:2905-2914.
- Wallace, R. J., J. W. Czerkawski and G. Breckenridge. 1981. Effect of monensin on the fermentation of basal rations in the rumen simulation technique. (Rusitec). *Brit. J. Nutr.* 46:131.

Tabela 1. Delineamento inteiramente casualizado dividido em 2 períodos, com 3 tratamentos e 9 animais

Períodos	Animais								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
I	A	B	C	B	C	A	C	A	B
II	B	C	A	C	A	B	A	B	C

Tabela 2. Proporções de ingredientes e composição bromatológica estimada da dieta experimental, com base na matéria seca (%).

Item	Dieta experimental
Ingrediente, % da MS	
Cana-de-açúcar fresca e picada	26.5
Silagem de grão úmido de milho	53.6
Farelo de soja	17.9
Suplemento mineral e vitamínico ¹	1.0
Calcáreo calcítico	1.0
Conteúdo nutricional	
Matéria seca (%)	55.0
Proteína bruta (% MS)	14.8
Proteína degradável no rúmen (% PB)	72.0
Proteína não-degradável no rúmen (%PB)	28.0
Fibra em detergente neutro (% MS)	23.3
Fibra em detergente neutro efetiva (% MS) ²	13.0
Carboidratos não fibrosos (% MS)	55.0
Amido (% MS)	32.6
Energia Metabolizável (Mcal/kg de MS)	2.8
E _{líq.} de Manutenção	1.9
NDT (% MS)	80.0
Cálcio (% MS)	0.6
Fósforo (% MS)	0.4

¹ Mistura mineral e vitamínica, quantidade por kg de produto: 230 g de cálcio, 90 g de fósforo, 15 g de enxofre, 20 g de magnésio, 48 g de sódio, 100 mg de cobalto, 700 mg de cobre, 2.000 mg de ferro, 80 mg de iodo, 1.250 mg de manganês, 20 mg de selênio, 2.700 mg de zinco e 900 mg de flúor (máximo), 200.000 UI de vitamina A, 60.000 UI de vitamina D3, 60 UI de vitamina E.

² Estimada pelo programa C.N.C.P.S-Cornell versão 5.0.40.

Tabela 3. Esquema da análise de variância em delineamento inteiramente casualizado, com 2 períodos e 20 medidas repetidas no tempo.

Causas de variação	Graus de Liberdade
Tratamento	2
Período	1
Resíduo A	14
Parcelas	17
Tempo	19
Interação Tempo x Tratamento	38
Interação Tempo x Período	19
Resíduo B	266
Total	359

Tabela 4. Ingestão de matéria seca expressa em kg (IMKG), porcentagem do peso vivo (IMPV) e em relação ao peso metabólico (IMPM) de bovinos induzidos à acidose ruminal recebendo preparado de anticorpos policlonais ou monensina.

Item	Tratamentos			Média ¹	EPM ²	Valor- <i>P</i>
	CTL	MON	PAP			
IMKG, kg	10.71	10.87	11.04	10.88	0.20	0.5025
IMPV, % do PV ³	1.59	1.58	1.51	1.56	0.03	0.1143
IMPM, g/kg PV ^{0,75}	80.90	80.67	78.48	80.02	1.43	0.4444

¹ Média entre tratamentos.

² EPM = erro padrão da média.

³ PV =Peso vivo = 677 ± 98 kg.

Tabela 5. Flutuação da ingestão de matéria seca (FIMS, em kg) em bovinos induzidos à acidose ruminal recebendo preparado de anticorpos policlonais ou monensina sódica.

Dia ¹	Tratamentos			Média	EPM	Valor- <i>P</i>
	CTL	MON	PAP			
0	10.16	10.22	11.45	10.61	0.81	0.7901
1	-13.88	-15.25	-14.76	-14.63	1.16	0.8999
2	5.88	3.95	4.19	4.67	0.56	0.3284
3	0.72	1.47	1.68	1.29	0.62	0.8045
Geral	0.72	0.10	0.64	0.49	1.18	0.8151

¹ Os dados apresentados representam a diferença de IMS (em kg) entre dias consecutivos, por exemplo: 0 = (IMS do d 0) – (IMS do d -1).

Tabela 6. pH ruminal, dias em que os animais apresentaram acidose (DEA), concentração de lactato, AGCCs e N-NH₃ de bovinos induzidos à acidose ruminal recebendo PAP ou MON.

Item	Tratamentos			Média ¹	EPM ²	Valor- <i>P</i>
	CTL	MON	PAP			
pH	5.91 ^b	6.06 ^a	5.89 ^b	5.95	0.03	< 0.0001
DEA ³ , %	60.00	32.22	58.89	50.37	6.93	0.1410
Lactato, mM	0.23	0.21	0.25	0.23	0.009	0.2320
Acetato, mol/100 mol	57.08	56.44	57.37	56.97	0.29	0.3288
Butirato, mol/100 mol	18.43 ^a	15.42 ^b	16.35 ^b	16.74	0.29	< 0.0001
AGCT ⁴ , mM	115.81	115.04	120.17	117.00	1.23	0.0194
N-NH ₃ , mg/dL	11.20 ^b	14.74 ^a	13.64 ^a	13.19	0.53	0.0039

¹ Média entre tratamentos.

² EPM = erro padrão da média.

³ DEA = contabiliza-se a porcentagem dos dias a partir do desafio com a dieta de alto concentrado cujo pH mensurado na terceira hora pós-prandial foi < 5.66.

⁴ AGCT = ácidos graxos de cadeia curta totais.

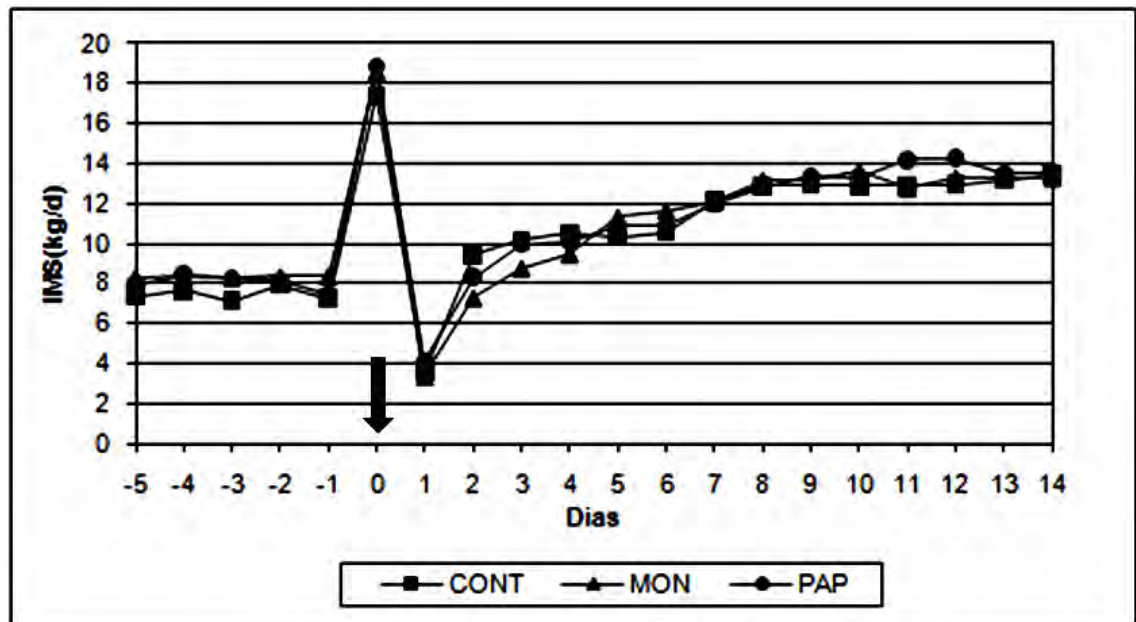


Figura 1. IMKG de bovinos induzidos à acidose ruminal. A flecha em negrito representa a mudança da dieta de 100% forragem para a de 74% concentrados, juntamente com o fornecimento dos aditivos alimentares.

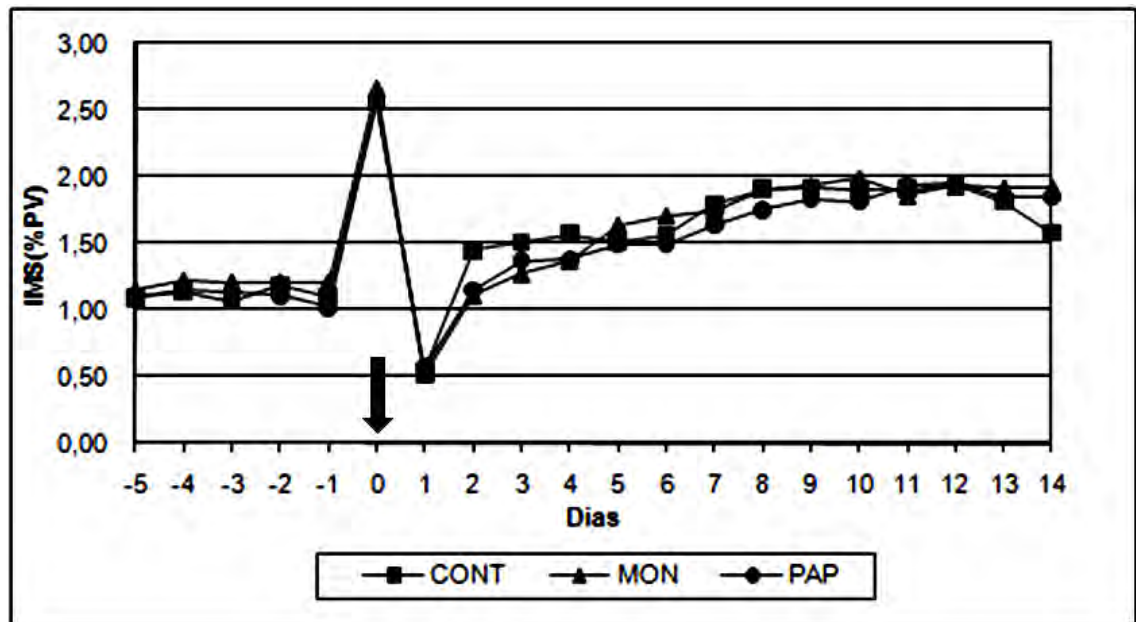


Figura 2. IMPV de bovinos induzidos à acidose ruminal. A flecha em negrito representa a mudança da dieta de 100% forragem para a de 74% concentrados, juntamente com o fornecimento dos aditivos alimentares.

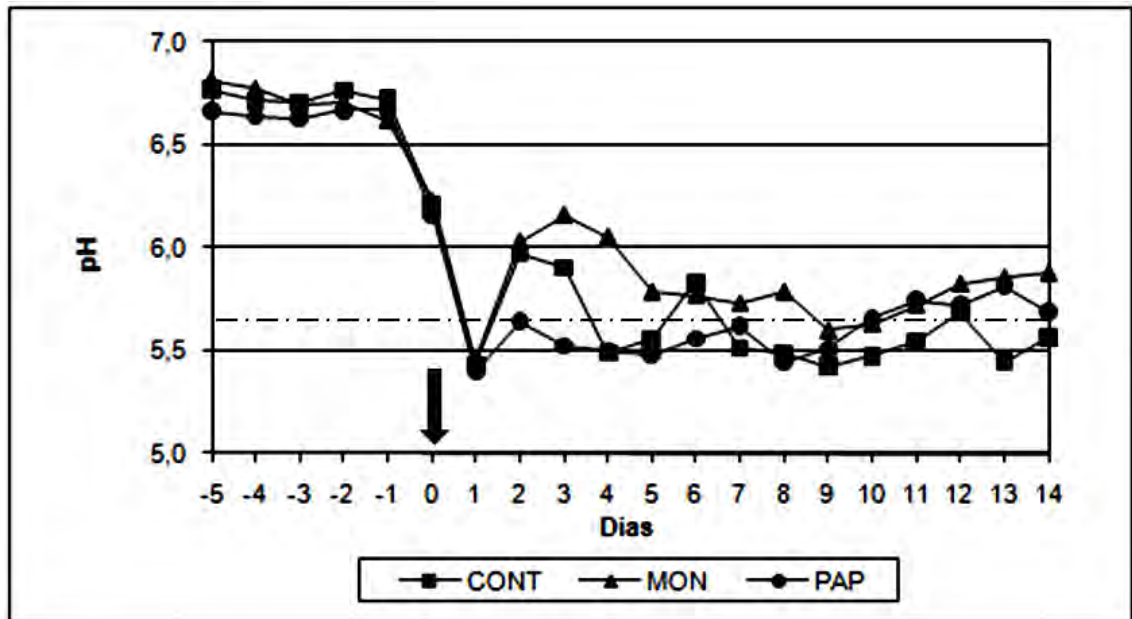


Figura 3. pH ruminal de bovinos induzidos à acidose ruminal. A flecha em negrito representa a mudança da dieta de 100% forragem para a de 74% concentrados, juntamente com o fornecimento dos aditivos alimentares. A linha tracejada representa o limite de acidose (pH < 5.66).

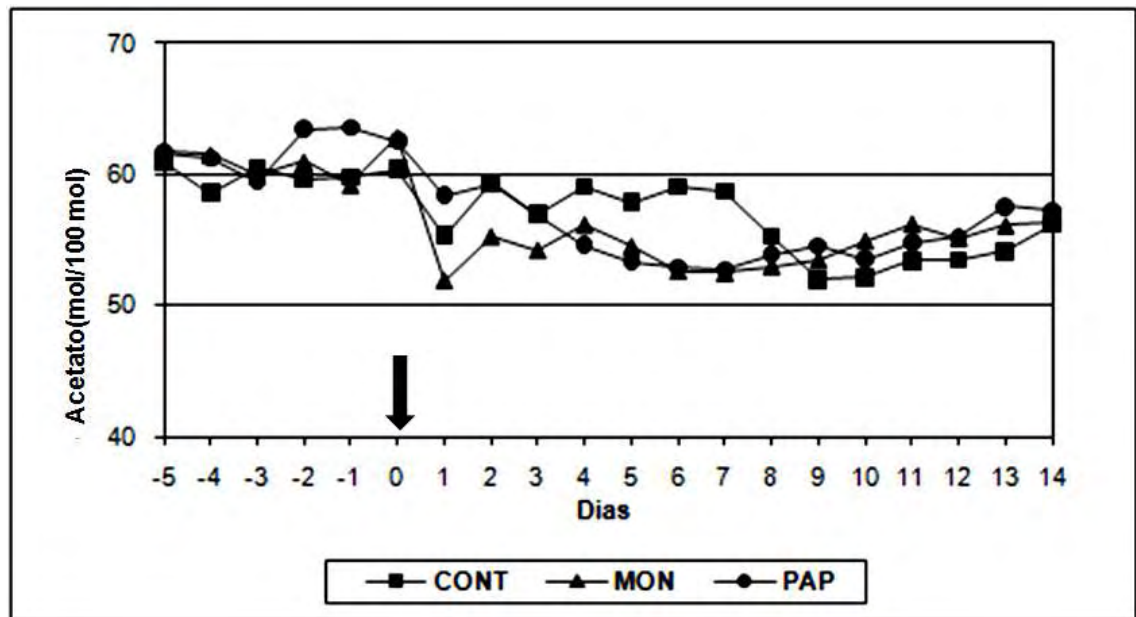


Figura 4. Proporção molar de acetato em bovinos induzidos à acidose ruminal. A flecha em negrito representa a mudança da dieta de 100% forragem para a de 74% concentrados, juntamente com o fornecimento dos aditivos alimentares.

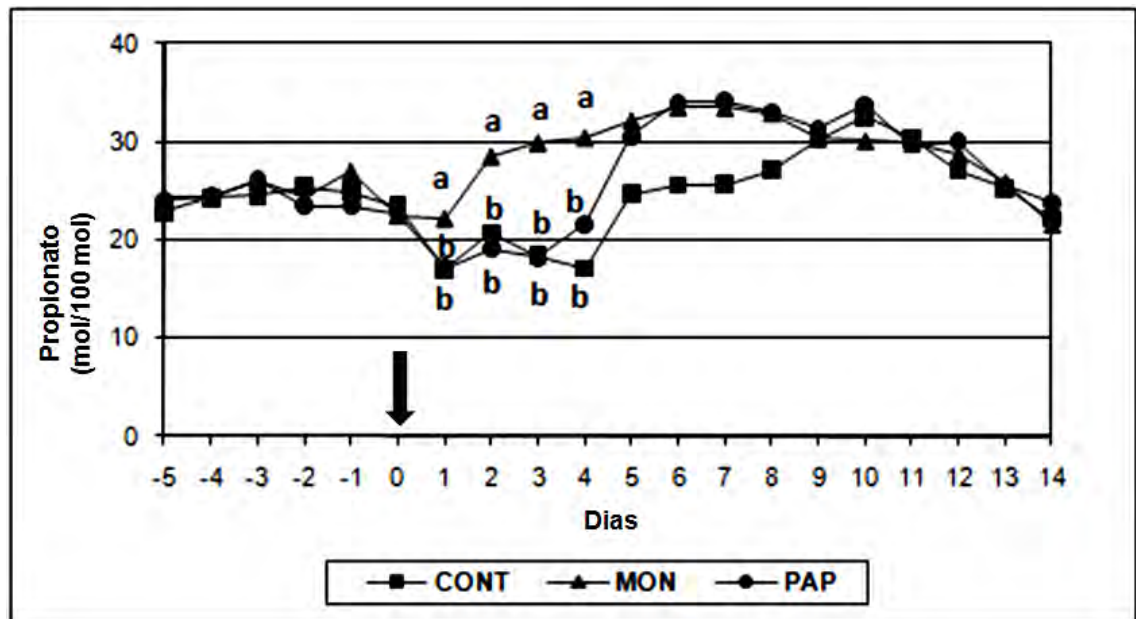


Figura 5. Proporção molar de propionato em bovinos induzidos à acidose ruminal. A flecha em negrito representa a mudança da dieta de 100% forragem para a de 74% concentrados, juntamente com o fornecimento dos aditivos alimentares.

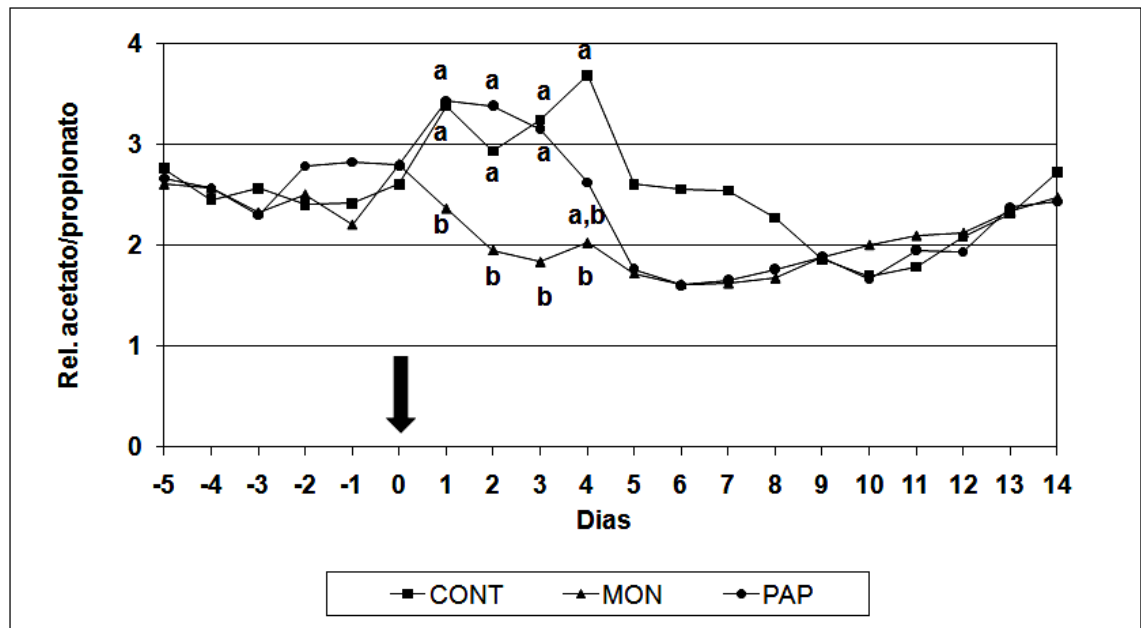


Figura 6. Relação acetato/propionato em bovinos induzidos à acidose ruminal. A flecha em negrito representa a mudança da dieta de 100% forragem para a de 74% concentrados, juntamente com o fornecimento dos aditivos alimentares.

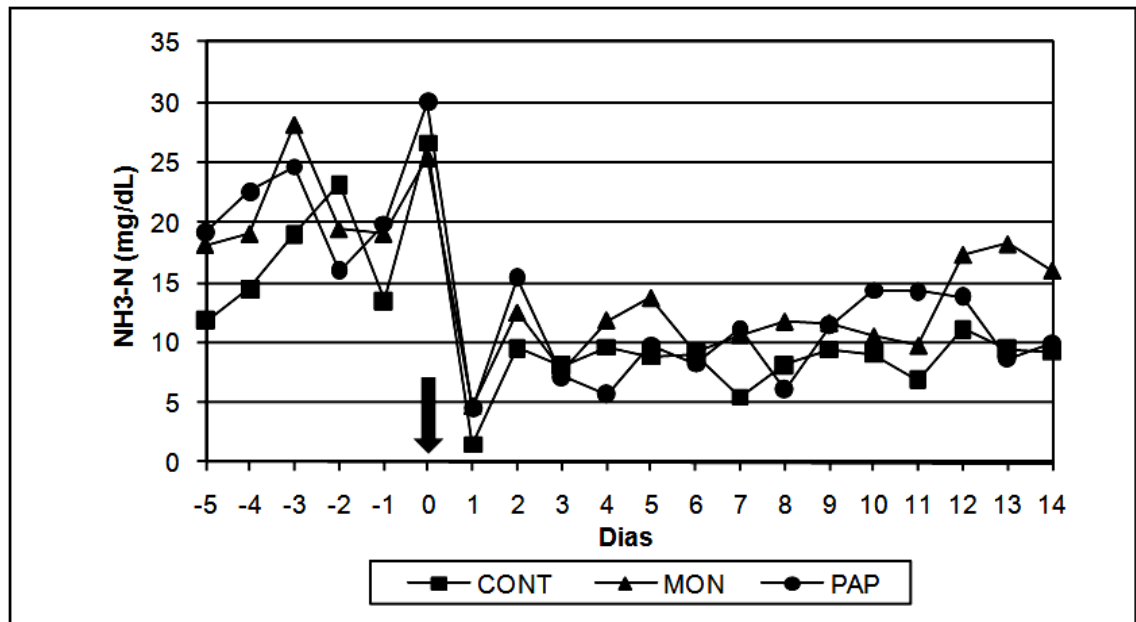


Figura 7. Concentração de N-NH₃ em bovinos induzidos à acidose ruminal. A flecha em negrito representa a mudança da dieta de 100% forragem para a de 74% concentrados, juntamente com o fornecimento dos aditivos alimentares.

CAPÍTULO 3

Síntese de proteína microbiana de bovinos induzidos à acidose ruminal tratados com monensina sódica ou anticorpos policlonais contra bactérias precursoras de distúrbios nutricionais

RESUMO: O presente ensaio científico visou avaliar a síntese de proteína microbiana e derivados de purina em animais induzidos à acidose ruminal e tratados com preparado de anticorpos policlonais contra as bactérias ruminais precursoras de distúrbios nutricionais (*Streptococcus bovis*, *Lactobacillus ssp.* e *Fusobacterium necrophorum*) ou monensina sódica. Nove vacas canuladas no rúmen e com 677 ± 98 kg de peso vivo médio foram agrupadas em baias individuais através de delineamento inteiramente casualizado com dois períodos de 20 dias. Separaram-se os animais em três tratamentos: controle (CTL), preparado de anticorpos policlonais (PAP) e monensina sódica (MON). Nos primeiros cinco dias de cada período, os animais receberam cana e úreia como alimento, em seguida, foi fornecida a dieta de desafio com aproximadamente 74% de concentrado, com o intuito de causar acidose ruminal. Houve o tempo de 15 dias entre cada período para a readaptação dos animais à dieta de volumoso. As amostras “spot” de urina foram coletadas no d -3, d 3 e d 14 para a determinação dos derivados de purina e posterior cálculo da proteína microbiana. Não houve efeito de tratamento ($P > 0.05$) para nenhuma das variáveis experimentais. Houve efeito linear de tempo ($P < 0.05$) para a excreção total de urina (ETU, d -3 = 4.95, d 3 = 6.16 e d 14 = 8.68 L/dia), alantoína na urina (ALUR, d -3 = 76.30, d 3 = 108.16 e d 14 = 114.44 mmol/dia), purinas totais (PT, d -3 = 81.22, d 3 = 114.17 e d 14 = 122.56 mmol/dia), purinas microbianas absorvidas (PMAB, d -3 = 48.89, d 3 = 97.86 e d 14 = 107.62 mmol/dia), nitrogênio microbiano (NMIC, d -3 = 36.90, d 3 = 61.59 e d 14 = 67.74 g/dia), proteína bruta microbiana (PBMI, d -3 = 192.27, d 3 = 384.96 e d 14 = 423.29 g/dia). A ração concentrada aumentou o fluxo de proteína microbiana para o intestino, enquanto o uso dos aditivos alimentares não interferiu nesta variável.

Palavras-chave: derivados de purina, ruminantes, aditivos alimentares.

Microbial protein synthesis in ruminal acidosis induced cows treated with monensin or polyclonal antibodies preparation against several nutritional disturbs precursor ruminal bacteria

ABSTRACT: This study was designed to evaluate the potential of multivalent polyclonal antibody preparation against several nutritional disturbs precursors ruminal bacteria (*Streptococcus bovis*, *Fusobacterium necrophorum* and *Lactobacillus ssp.*), or monensin as acidosis preventative feed additive to high concentrate fed cattle and its effects on microbial protein synthesis and purine derivatives. It was used nine cannulated cows (677±98 kg of BW) in a complete randomized design divided in two periods of 20 d. Animals were separated in three treatments: control (CTL), multivalent polyclonal antibody preparation (PAP) and monensin sodium (MON). During the first five days of each period, animals were fed all forage diet. Ruminal acidosis was induced by an abrupt diet switch to a 73% concentrate diet. An interval of 15 d was considered as ruminal washout in the meantime of the two periods, when animals were refed all forage diet to reestablish normal ruminal pH conditions and cellulolytic microbial population. Spot urine samples were collected in d -3, d 3 and d 14 for purine derivatives determination and microbial protein synthesis calculation. There was no effect ($P > 0.05$) of feed additive on the experimental variables. However, linear day effect ($P < 0.05$) was found for: total urine excretion (TUE, d -3 = 4.95, d 3 = 6.16 and d 14 = 8.68 L/dia), allantoin present in urine (ALUR, d -3 = 76.30, d 3 = 108.16 and d 14 = 114.44 mmol/dia), total purines (TP, d -3 = 81.22, d 3 = 114.17 and d 14 = 122.56 mmol/dia), absorbed microbial purines (ABMP, d -3 = 48.89, d 3 = 97.86 and d 14 = 107.62 mmol/dia), microbial nitrogen (MN, d -3 = 36.90, d 3 = 61.59 and d 14 = 67.74 g/dia), microbial crude protein (MCP, d -3 = 192.27, d 3 = 384.96 and d 14 = 423.29 g/dia). The administration of high concentrate ration increased microbial protein flux to intestine, whereas feed additive had no effects on experimental parameters in the present study.

Keywords: purine derivatives, ruminants, feed additive.

INTRODUÇÃO

A acidose ruminal é o distúrbio nutricional de maior importância econômica em sistemas intensivos de produção de bovinos. Os custos diários advindos da acidose subaguda (ocasionada pelo acúmulo de AGCCs) podem chegar a 1.12 dólares por animal por dia em rebanhos leiteiros diagnosticados com esse distúrbio (Stone, 1999), entre 15-20 dólares por animal em bovinos de corte confinados devido à perda de eficiência (Schartzkopf-Genswein et al., 2003). Este foi levantado como o segundo maior problema de saúde que acomete os bovinos alimentados nesse sistema de engorda em situações brasileiras, abaixo apenas dos problemas respiratórios (Millen et al., 2009). As mudanças da fermentação ruminal e da população microbiana decorrentes de surtos de acidose aguda e láctica são bem documentadas pela literatura (Dirksen, 1970; Dunlop, 1972; Slyter, 1976; citados por Nagaraja e Titgemeyer, 2007), mas muito pouco é conhecido sobre as alterações ocorridas durante o desenvolvimento da acidose subaguda (Goad et al., 1998).

Dentre as diversas formas de manejos preventivos contra esse distúrbio nutricional, destaca-se a inclusão de antibióticos ionóforos, como a monensina sódica (**MON**), nas dietas de bovinos alimentados com alta proporção de concentrados. No entanto, o uso deste princípio ativo está banido em algumas zonas de produção intensiva de bovinos, como a União Européia (European Community, 2003). Por essa razão, as indústrias de leite e carne desse continente pesquisam ativamente alternativas estratégicas para a redução da acidose (Blanch et al., 2009) e dessa forma, o preparado de anticorpos policlonais aviários (**PAP**) contra bactérias precursoras de distúrbios nutricionais, em teoria, apresenta o potencial de aditivo alimentar que preenche a necessidade do menor uso de antibióticos em sistemas intensivos de alimentação de bovinos. Entretanto, mais estudos ainda são necessários para a avaliação científica desta tecnologia e posterior recomendação.

Complementariamente, a MON também possui efeito importante no metabolismo de proteínas. Na presença deste ionóforo, a produção ruminal de $N-NH_3$ foi reduzida (Chalupa, 1980; Ruiz et al., 2001), bem como ocorre o aumento do fluxo de proteína bypass (entre 22 e 55%) para o intestino (Owens et al., 1980 e Poos et al., 1979; respectivamente). Bergen e Bates (1984) inferem que tais efeitos possam ocorrer

devido ao decréscimo do número total de células bacterianas ruminais e, dessa forma, reduz a quantidade de enzimas proteolíticas e deaminativas disponíveis. Ainda, foi reportada a diminuição do fluxo de nitrogênio não-amoniaco microbiano (estimativa da quantidade de proteína microbiana) para o intestino e queda da eficiência da síntese de proteína microbiana em animais tratados com esse princípio ativo (Isichei e Bergen, 1980).

Assim, a MON por ser um antibiótico de largo espectro (atua sobre as bactérias gram-positivas) e possivelmente decresce o número total de células bacterianas ruminais, possa também reduzir a taxa de fermentação de AGCCs, fator este contribuinte para o controle da acidose subaguda, enquanto os anticorpos, por serem altamente específicos (Kelley e Lewin, 1986; DiLorenzo et al., 2006), apenas diminuem as populações das bactérias alvos causadoras de distúrbios nutricionais (*Streptococcus bovis*, *Lactobacillus ssp.*, *Fusobacterium necrophorum* e *E. coli* O157:H7). Portanto, a hipótese a ser testada no presente estudo sugere que em uma situação de indução à acidose ruminal, nos animais tratados com MON observaria-se a redução do fluxo de proteína microbiana para o intestino. Contudo, tal diminuição não seria observada nos bovinos tratados com PAP. Desta maneira, objetivou-se neste experimento avaliar a síntese de proteína microbiana e derivados de purina em animais induzidos à acidose ruminal e tratados com preparado de anticorpos policlonais contra as bactérias ruminais precursoras de distúrbios nutricionais (*Streptococcus bovis*, *Lactobacillus ssp.* e *Fusobacterium necrophorum*) ou monensina sódica.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos, mão-de-obra treinada e instalações experimentais estão de acordo com as normas do comitê de ética (CEEA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Botucatu.

Animais e Instalação Experimental

O ensaio experimental foi conduzido na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP), Campus de Pirassununga – São Paulo.

Foram utilizadas nove fêmeas bovinas holandesas, não gestantes e não lactantes com peso vivo médio de 677 ± 98 kg e portadoras de cânula ruminal com 10 cm de diâmetro e 7,5 cm de espessura. Os animais foram mantidos em galpão coberto, em baias individuais providas com cochos de cimento, bebedouros automáticos individuais e camas de areia para o descanso. O estábulo possuía ventiladores suspensos no teto que eram ligados nas horas mais quentes do dia, para amenizar os efeitos de temperatura ambiente.

Delineamento experimental e Tratamentos

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado divididos em dois períodos experimentais (**Tabela 1.**). A escolha por apenas dois períodos experimentais é atribuída à tentativa de evitar a diluição do efeito de desafio às dietas de alto concentrado pelo possível aprendizado adquirido ou memória metabólica de evitar grandes ingestões de concentrado.

Os tratamentos foram em número de três, respectivos aos diferentes modificares ruminais mais o grupo controle:

Tratamento A: Controle

Tratamento B: Monensina

Tratamento C: PAP

A adição dos aditivos foi realizada duas vezes ao dia, entre os dias 0 e 14 de cada período experimental, via fístula ruminal, antes de cada refeição e através de envelopes confeccionados em papel absorvente. A monensina foi administrada na dose $300 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$, o que corresponde a $3 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$ do produto comercial Rumensin - Elanco[®]. Este produto comercial contém 10% de monensina sódica por quilo de produto. Já o preparado de anticorpos policlonais (CAMAS Inc[®]) foi administrado na dose de $3 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$ (correspondente a 10 mL do produto líquido).

Período experimental

O experimento teve duração total de 55 d, divididos em dois períodos de 20 d cada (d -5 ao d 14), com intervalo de readaptação à dieta volumosa de 15 d entre os períodos, a fim de reestabelecer as condições normais de pH ruminal, juntamente com a

repovoação do rúmen pelos microrganismos celulolíticos. Durante o d -5 ao -1, os animais receberam apenas dieta volumosa, composta de cana-de-açúcar suplementada com uréia e sal mineral, de forma a suprir uma quantidade considerável de proteína bruta aos animais (14.05 % de PB, 43.98% de FDN e 22.18% de FDA, baseado na MS). A partir do d 0, foi oferecida a dieta concentrada (53.6% da MS composta por milho úmido) até o d 14.

Anteriormente aos dois períodos experimentais, aproximadamente 20 kg de conteúdo ruminal foi extraído de cada animal e feita a mistura dessas porções. Logo após esse procedimento, a mesma quantidade de conteúdo ruminal retirado e já misturado, foi devolvida a cada animal. Tal procedimento visou à homogeneização da população microbiana ruminal anteriormente a aplicação do tratamento experimental.

Manejo nutricional

Independentemente do tipo de dieta fornecida, os alimentos foram oferecidos duas vezes ao dia, às 0800h e 1600 h. A dieta desafio foi administrada na forma de ração completa, com relação volumoso:concentrado de 26:74, na qual a fonte de volumoso utilizada foi a cana-de-açúcar fresca (2.9% de PB, 47.48% de FDN e 25.68% de FDA, baseado na MS) e picada com partícula média de 1,14 cm, de acordo com metodologia proposta por Lammers et al. (1996). A porção protéica concentrada da dieta foi composta por farelo de soja (44.12% de PB, 20.57% de FDN e 7.30% de FDA, baseado na MS), enquanto a silagem de grão úmido de milho (7.91% de PB, 6.22% de FDN e 3.31% de FDA, baseado na MS) foi usada como fonte energética. As proporções dos diversos ingredientes na dieta e a composição bromatológica da mesma está descrita na **Tabela 2**. As análises bromatológicas e de matéria seca, matéria mineral (MM), PB, extrato etéreo (EE), cálcio e fósforo foram realizadas de acordo com AOAC (1990), enquanto as de FDN corrigidas para cinzas e FDA foram realizadas de acordo com Van Soest et al. (1994). Para a análise de FDN, foi adicionada a α -amilase e uréia. A concentração de amido foi realizada segundo Pereira e Rossi Jr. (1995), fazendo-se a prévia extração de carboidratos segundo Hendrix (1993). A dieta foi formulada segundo o NRC (2001) e avaliada no programa CNCPS versão 5.0.40 (Fox et al., 1992).

Preparado de anticorpos policlonais

Procedimentos similares aos descritos por DiLorenzo et al., (2006) foram utilizados para a geração dos PAP, com a exceção de que um PAP multivalente foi testado, ao invés de preparados específicos como descrito anteriormente. Os anticorpos policlonais foram produzidos pela CAMAS Inc. (Le Center, MN, USA). O produto comercial contém 39.5% de imunoglobulinas contra *Streptococcus bovis* (ATCC 9809), 17.6 % contra *Lactobacillus ssp.* (ATCC 4356; 14917; 9649 e 7469), 13.20% contra *Fusobacterium necrophorum* (ATCC 27852), 17.6% contra *E. coli* O157:H7 e endotoxinas. *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus ssp.* são as bactérias que mais produzem ácido láctico durante o processo de acidose, *Fusobacterium necrophorum* é o causador de abscessos hepáticos em animais com acidose, enquanto a *E. coli* é um patógeno para humanos que habita o rúmen e as endotoxinas são os lipopolisacarídeos que estão presentes nas paredes de bactérias ruminais gram-negativas, sendo liberadas em situações de morte bacteriana e podem debilitar o sistema imune do animal hospedeiro. O PAP com a forma de apresentação sólida foi obtido pelo processo de SPRAY-DRYER, o qual foi mantido em embalagens hermeticamente fechadas durante o período experimental, protegidas do calor e luz solar.

Estimativa da síntese de proteína microbiana no rúmen

As análises para determinação da síntese de proteína microbiana foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal do VNP-FMVZ/USP, a partir da quantificação dos derivados de purinas na urina, de acordo com metodologia descrita por Valadares et al. (1999) e Rennó (2003), considerando-se a absorção de purinas a partir da fórmula sugerida por Verbic et al. (1990).

Amostras de 50 mL de urina (amostra *spot*) foram obtidas de todos os animais nos dias -3; 3 e 14 de cada período experimental, aproximadamente 3 horas após a alimentação, durante micção estimulada por massagem na vulva. A urina foi filtrada e alíquotas de 10 mL foram diluídas imediatamente em 40 mL de ácido sulfúrico a 0,018M para evitar destruição bacteriana dos derivados de purinas e precipitação do ácido úrico, sendo então armazenadas a -15 °C para posteriores análises de alantoína e

ácido úrico. Uma amostra de urina pura foi armazenada para determinação dos compostos nitrogenados totais, uréia e creatinina.

As concentrações de creatinina foram determinadas por meio de kits comerciais (Laborlab[®]), utilizando reação enzimática calorimétrica cinética em aparelho SBA-200 Celm[®]. O volume urinário total diário foi estimado dividindo-se as excreções urinárias diárias de creatinina pelos valores observados de concentração de creatinina na urina das amostras *spot*, segundo Oliveira et al. (2001).

A excreção urinária diária de creatinina foi estimada a partir da excreção média diária, estabelecida de 24.05 mg/kg de peso vivo para vacas leiteiras (Chizzotti, 2004). Dessa forma, com a excreção média diária de creatinina e a concentração de creatinina (mg/dL) na amostra *spot* de urina, foi estimado o volume total diário de urina, em litros por vaca/dia. Os níveis de alantoína e ácido úrico na urina foram determinados pelo método colorimétrico, conforme metodologia de Fujihara et al. (1987), descrita por Chen e Gomes (1992).

A excreção total de derivados de purinas foi calculada pela soma das quantidades de alantoína e ácido úrico excretadas na urina, expressas em mmol/dia. As purinas microbianas absorvidas (Pabs, mmol/dia) foram calculadas a partir da excreção urinária de derivados de purinas (DP, mmol/dia), por meio da equação $Pabs = (DP - 0.236 * PV^{0.75})/0.84$, em que 0.84 é a recuperação de purinas absorvidas como derivados de purina e 0.236, a excreção endógena de derivados de purina (Orellana Boero et al., 2001).

Foram também avaliadas as purinas microbianas absorvidas, considerando-se a excreção endógena de $0.512 * PV^{0.75}$ e a recuperação de 0.70 encontradas por Gonzalez-Ronquillo et al. (2003). A síntese ruminal de compostos nitrogenados (Nmic, gN/dia) foi calculada com base nas purinas absorvidas (Pabs, mmol/dia), utilizando-se a equação (Chen e Gomes, 1992), $Nmic = (70 * Pabs)/(0.83 * 0.134 * 1.000)$, em que 70 é o conteúdo de N nas purinas (mgN/mol); 0.134, a relação N purina: N total nas bactérias (Valadares et al., 1999); e 0.83, a digestibilidade intestinal das purinas microbianas. Para a obtenção de da síntese de proteína bruta microbiana, mutiplicaram-se os dados de nitrogênio microbiano pelo fator Kjeldahl de 6.25.

Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo do programa computacional Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2003), sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo Teste de SHAPIRO-WILK (PROC UNIVARIATE) e as variâncias comparadas pelo Teste “F”. Os dados (variável dependente) que não atenderem a estas premissas foram submetidos à transformação logarítmica [Log (X+1)] ou pela raiz quadrada [RQ (X+1/2)]. Os dados originais ou transformados, quando este último procedimento foi necessário, foram submetidos à análise de variância que separou como fontes de variação os efeitos de tratamentos e períodos, adicionados ainda do fator medidas repetidas no tempo, referentes aos diferentes dias de amostragem (**Tabela 3**). Tal análise foi realizada utilizando-se o procedimento MIXED do SAS. A análise por tempo somente foi realizada quando as interações entre efeito de tempo e efeito de tratamentos foram significativas. A separação entre as médias foi realizada pelo teste de Tukey. Foi utilizado um nível de significância de 5% para todos os testes realizados.

RESULTADOS

Não foram observadas interações entre dia e tratamento ($0.3271 \leq P \leq 0.8251$) para nenhuma das variáveis experimentais avaliadas. Complementariamente, a adição dos aditivos alimentares não resultou em diferenças significativas ($P > 0.05$, **Tabela 4**) para nenhuma variável experimental avaliada no presente estudo. Contudo, foi observado efeito linear de dia ($P < 0.05$), para as seguintes variáveis: excreção total de urina ao longo dos dias (ETU; d -3 = 4.95, d 3 = 6.16 e d 14 = 8.68 L/dia, **Figura 1**), alantoína na urina (ALUR; d -3 = 76.30, d 3 = 108.16 e d 14 = 114.44 mmol/dia, **Figura 2**), purinas totais (PT; d -3 = 81.22, d 3 = 114.17 e d 14 = 122.56 mmol/dia, **Figura 3**), purinas microbianas absorvidas (PMAB, d -3 = 48.89, d 3 = 97.86 e d 14 = 107.62 mmol/dia, **Figura 4**), nitrogênio microbiano (NMIC, d -3 = 36.90, d 3 = 61.59 e d 14 = 67.74 g/dia, **Figura 5**), proteína bruta microbiana (PBMI, d -3 = 192.27, d 3 = 384.96 e d 14 = 423.29 g/dia, **Figura 6**).

DISCUSSÃO

Surpreendentemente, não foram observadas alterações do metabolismo de proteína microbiana para ambos os tratamentos experimentais. Isichei e Bergen (1980) observaram reduções do fluxo de proteína microbiana para o intestino e diminuição da eficiência de síntese de proteína microbiana tanto em dietas compostas por milho e silagem quanto em dietas compostas por silagem de milho e farelo de soja, nos animais que recebiam MON. Van Nevel e Demeyer (1979) reportaram a depressão *in vitro* do crescimento microbiano total e líquido causado pela MON. No entanto, o substrato de fermentação não foi alterado, resultando em menores eficiências de crescimento. Ainda, Stouthammer e Bettenhausen (1973) alegam que a menor eficiência de síntese de proteína microbiana acontece pelo aumento das exigências dos microrganismos em taxas de crescimento mais lentas.

Talvez a transição brusca de dieta, juntamente com a administração dos tratamentos no momento do desafio, contribuíram para o grande crescimento da população microbiana ruminal e, dessa forma, não houve tempo hábil para a MON conter o crescimento bacteriano. Todos os experimentos citados acima expõem os resultados das coletas de dados em situações nas quais a fermentação teoricamente já estaria estabilizada. Outra explicação baseia-se na constatação de que a MON controla a população das bactérias gram-positivas, o que proporcionaria a oportunidade para as bactérias gram-negativas fermentadoras de carboidratos não-estruturais crescessem desordenadamente após o desafio com a dieta concentrada, não possibilitando a detecção de diferenças entre os tratamentos.

O aumento linear de excreção de urina pode ser explicado primeiramente pela diferença de MS das duas dietas, sendo que a dieta desafio apresentava aproximadamente a metade de umidade, em relação à dieta de forragem. Dessa forma ocorre o aumento de ingestão de água e por consequência, o incremento do volume de urina excretada. Ainda, é conhecido o fato de a osmolaridade do rúmen ser alta em dietas ricas em carboidratos rapidamente fermentescíveis (Owens et al., 1998; Nagaraja e Titgemeyer, 2007). Em casos de acidose aguda, a osmolaridade ruminal pode ser tão alta que ocasiona o fluxo de água do sangue em direção ao rúmen. O animal neste caso pode morrer de desidratação (Owens et al., 1998). Assim é esperado que o animal

aumente o consumo de água em dietas de alto concentrado e, o mesmo acontece quando o animal passa por períodos críticos diurnos, nos quais apresentam baixo pH ruminal (Cottee et al., 2004).

O aumento linear da excreção de derivados de purina (ALUR, PT, PMAB) ao longo dos dias experimentais, bem como o incremento de NMIC e, conseqüentemente de proteína bruta microbiana digerida pelo intestino, é explicado pelo aumento da densidade energética da dieta e maior fornecimento de carboidratos rapidamente fermentescíveis. Adicionalmente, Valadares et al. (1999), Pereira et al. (2007) e Pina et al. (2009) também observaram o aumento da síntese de NMIC à medida que aumentava-se o teor de concentrados na dieta. De acordo com Stern e Hoover (1979; citados por Pina et al., 2009), os carboidratos prontamente fermentescíveis (amido e açúcares) são mais efetivos que outros tipos de carboidratos (celulose) em promover crescimento microbiano. Assim, como a fonte de concentrado no experimento foi a silagem de grão úmido de milho (fonte rica em amido), ocorreu o maior aporte energético para a microbiota ruminal, aumentando-se a taxa multiplicativa destes, o que explica os efeitos lineares encontrados neste estudo.

Pina et al. (2009), semelhantemente ao presente estudo, não encontraram diferenças significativas para a excreção de urinária de ácido úrico, conforme o aumento de concentrados na dieta. Giesecke et al. (1994) reportaram a baixa correlação (0.50) entre o nível de concentrado e a excreção urinária de ácido úrico. Adicionalmente, a alantoína é responsável por mais de 90% dos derivados de purina (Giesecke et al., 1994). Dessa forma, é esperado que a excreção de ácido úrico apresente menores correlações com o nível de concentrado do que as de alantoína (Pina et al., 2009).

IMPLICAÇÕES

A administração de PAP ou MON possivelmente não interfere na síntese de proteína microbiana em animais induzidos à acidose subaguda sob condições similares ao presente estudo. O fornecimento da dieta rica em concentrado, em contrapartida, aumenta a síntese e fluxo de proteína microbiana para o intestino em animais induzidos à acidose subaguda.

LITERATURA CITADA

- AOAC. 1990. Official methods of analysis. 15th ed. Association Office Analytical Chemistry, Arlington, VA.
- Bergen, W. G., and D. B. Bates. 1984. Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. *J. Anim. Sci.* 58:1465-1483.
- Blanch, M., S. Calsamiglia, N. DiLorenzo, A. DiCostanzo, S. Muetzel, and R. J. Wallace. 2009. Physiological changes in rumen fermentation during acidosis induction and its control using a multivalent polyclonal antibody preparation in heifers. *J. Anim. Sci.* 87:1722-1730.
- Chalupa, W. 1980. Chemical control of rumen microbial metabolism. Page 325 in *Digestive physiology and metabolism in ruminants*. Y. Ruckebush and P. Thivend (Ed.). AVI. Westport, CT.
- Chen, X. B., M. J. Gomes. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: an overview of technical details. Rowett Research Institute, International Feed Resources Unit. Bucksburn.
- Chizzoti, M. L., S. C. Valadares Filho, R. F. D. Valadares, M. I. Marcondes, M. A. Fonseca, D. S. Pina, M. O. Porto, T. Lázaro, J. M. Silva, M. L. Paixão, L. M. Ribeiro. 2004. Excreção de creatinina em novilhos e novilhas. 1 CD-ROM. In *Anais da 41o. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*. Campo Grande. Brasil.
- Cotee, G., I. Kyriazakis, T. M. Widowski, M. I. Lindinger, J. P. Cant, T. F. Duffield, V. R. Osborne and B. W. McBride. 2004. The effects of subacute ruminal acidosis on sodium bicarbonate-supplemented water intake for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87:2248-2253.
- DiLorenzo, N., F. Diez-Gonzalez, and A. DiCostanzo. 2006. Effects of feeding polyclonal antibody preparations on ruminal bacterial populations and ruminal pH of steers fed high-grain diets. *J. Anim. Sci.* 84:2178-2185.
- Dirksen, G. 1970. Acidosis. Pages 612–625 in *Physiology of digestion and metabolism in the ruminant*. A. T. Phillipson (Ed.). Oriel Press, Newcastle, UK.
- Dunlop, R. H. 1972. Pathogenesis of ruminant lactic acidosis. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 16:259-302.
- European Community. 2003. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Off. J. L* 268:29-43.
- Fox, D. G., C. J. Sniffen, J. D. O'Connor, J. B. Russell, and P. J. Van Soest. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. III. Cattle requirements and diets adequacy. *J. Anim. Sci.* 70:3578-3596.
- Fujihara, T., E. R. Ørskov, P. J. Reeds, D. J. Kyle. 1987. The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. *J. Agric. Sci.* 109:7-12.
- Giesecke, D., L. Ehrentreich, and M. Stangassinger. 1994. Mammary and renal excretion of purine metabolites in relation to energy intake and milk yield in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77:2376-2381.
- Goad, D. W., C. L. Goad, and T. G. Nagaraja. 1998. Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. *J. Anim. Sci.* 76:234–241.

- González-Ronquillo, M., J. Balcells, J. A. Guada, F. Vicente. 2003. Purine derivative excretion in dairy cows: Endogenous excretion and the effect of exogenous nucleic acid supply. *J. Dairy Sci.* 86:1282-1291.
- Hendrix, D.L. 1993. Rapid extraction and analyses of nonstructural carbohydrates in plant tissues. *Crop Sci.* 33:1306-1311.
- Isichei, C. O. and W. G. Bergen. 1980. The effect of monensin on the composition of abomasal nitrogen flow in steers fed grain and silage ration. *J. Anim. Sci.* 51:371. Supplement 1. Abstarct.
- Kelley, K. W., Lewin, H. A. 1986. Monoclonal antibodies: pragmatic application of immunology and cell biology. *J. Anim. Sci.* 63:288-309.
- Lammers, B.P., D.R. Buckmaster, e A.J. Heinrichs. 1996. A simple method for the analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. *J. Dairy Sci.* 79:922-928.
- Millen, D. D., R. D. L. Pacheco, M. D. B. Arrigoni, M. L. Galyean, and J. T. Vasconcelos. 2009. A snapshot of management practices and nutritional recommendations used by feedlot nutritionists in Brazil. *J. Anim. Sci.* published on line Jul 2, 2009.
- Nagaraja, T. G., and E. C. Titgemeyer. 2007. Ruminant acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. *J. Dairy Sci.* 90:E17-E38.
- NRC. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Oliveira, A.S., R. F. D. Valadares, S. C. Valadares Filho, P. R. Cecon, L. N. Rennó, A. C. Queiroz, M. L. Chizzotti. 2001. Produção de proteína microbiana e estimativas das excreções de derivados de purinas e de uréia em vacas lactantes alimentadas com rações contendo diferentes níveis de compostos nitrogenados não-protéicos. *Rev. Bras. de Zoot.* 30:1621-1629.
- Orellana Boero, P., J. Balcellis, S. M. Martín-Orué, J. B. Liang , J. A. Guada. 2001. Excretion of derivatives in cow: endogenous contribution and recovery of exogenous purine bases. *Livest. Prod. Sci.* 68:243-250.
- Owens, F. N. K. S. Lusby, K. Mizwicki and O. Forero. 1980. Slow ammonia release from urea: rumen and metabolism studies. *J. Anim. Sci.* 50:527-531.
- Owens, F. N., D. S. Secrist, W. J. Hill, and D. R. Gill. 1998. Acidosis in cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 76:275-286.
- Pereira, D. H., O. G. Pereira, B. C. Da Silva, M. I. Leao, S. C. Valadares Filho, F. H. M. Chizzotti, and R. Garcia. 2007. Intake and total and partial digestibility of nutrients, ruminal pH and ammonia concentration and microbial efficiency in beef cattle fed with diets containing sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) silage and concentrate in different ratios. *Livest. Sci.* 107:53-61.
- Pereira, J. R. A., and P. Rossi Jr. 1995. Practical manual of feedstuffs nutritional evaluation. FEALQ, Piracicaba, SP.
- Pimentel Gomes, F. 1985. Curso de Estatística Experimental. ESALQ, Piracicaba, SP.
- Pina D. S., S. C. Valadares Filho, L. O. Tedeschi, A. M. Barbosa and R. F. D. Valadares. 2009. Influence of different levels of concentrate and ruminally undegraded protein on digestive variables in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 2009. 87:1058-1067.
- Poos, M. I., T. L. Hanson and T. J. Klopfenstein. 1979. Monensin effects on diet digestibility, ruminal protein bypass and microbial protein synthesis. *J. Anim. Sci.* 48:1516.

- Rennó, L.N. 2003. Consumo, digestibilidade total e parcial, produção microbiana, parâmetros ruminais e excreções de uréia e creatinina em novilhos alimentados com dietas contendo quatro níveis de uréia ou dois de proteína. Tese. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.
- Ruiz, R., G. L. Albrecht, L. O. Tedeschi, G. Jarvis, J. B. Russell, D. G. Fox. 2001. Effect of Monensin on the Performance and Nitrogen Utilization of Lactating Dairy Cows Consuming Fresh Forage. *J. Dairy Sci.* 84:1717-1727.
- SAS User's Guide: Statistics Version 9 Edition. 2003. SAS Inst., Inc., Cary, NC.
- Schwartzkopf-Genswein, K. S., K. A. Beauchemin, D. J. Gibb, D. H. Crews, Jr., D. D. Hickman, M. Streeter, and T. A. McAllister. 2003. Effect of bunk management on feeding behavior, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: A review. *J. Anim. Sci.* 81:149–158.
- Slyter, L. L. 1976. Influence of acidosis on rumen function. *J. Anim. Sci.* 43: 910–924.
- Stern, M. D., and W. H. Hoover. 1979. Methods for determining and factors affecting rumen microbial protein synthesis: A review. *J. Anim. Sci.* 49:1590–1603.
- Stone, W. C. 1999. The effect of subclinical rumen acidosis on milk components. Pages 40–46 in *Proc. Cornell Nutr. Conf. Feed Manuf.*, Syracuse, NY. Cornell Univ., Ithaca, NY.
- Stouthammer, A. H. and C. Bettenhausen. 1973. Utilization of energy for growth and maintenance in continuous and batch cultures of microorganisms. *Biochim. Biophys. Acta* 301:53.
- Valadares, R. F. D, G. A. Broderick, S. C. Valadares Filho, M. K. Clayton. 1999. Effect of replacing alfafa with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. *J. Dairy Sci.* 82:2686-2696.
- Van Nevel, C. J. and D. I. Demeyer. 1979. The effect of monensin on some rumen fermentation parameters. *Ann. Rech. Vet.* 10: 338.
- Van Soest, P. J. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2nd ed. Cornell Univ. Press, Ithaca, NY.
- Verbic, J., X. B. Chen, N. A. Macleod, E. R. Ørskov. 1990. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. *J. Agric. Sci.* 114:243-248.

Tabela 1. Delineamento inteiramente casualizado dividido em 2 períodos, com 3 tratamentos e 9 animais

	Animais								
Períodos	1	2	3	4	5	6	7	8	9
I	A	B	C	B	C	A	C	A	B
II	B	C	A	C	A	B	A	B	C

Tabela 2. Proporções de ingredientes e composição bromatológica estimada da dieta experimental, com base na matéria seca (%).

Item	Dieta experimental
Ingrediente, % da MS	
Cana-de-açúcar fresca e picada	26.5
Silagem de grão úmido de milho	53.6
Farelo de soja	17.9
Suplemento mineral e vitamínico ¹	1.0
Calcáreo calcítico	1.0
Conteúdo nutricional	
Matéria seca (%)	55.0
Proteína bruta (% MS)	14.8
Proteína degradável no rúmen (% PB)	72.0
Proteína não-degradável no rúmen (%PB)	28.0
Fibra em detergente neutro (% MS)	23.3
Fibra em detergente neutro efetiva (% MS) ²	13.0
Carboidratos não fibrosos (% MS)	55.0
Amido (% MS)	32.6
Energia Metabolizável (Mcal/kg de MS)	2.8
E _{líq.} de Manutenção	1.9
NDT (% MS)	80.0
Cálcio (% MS)	0.6
Fósforo (% MS)	0.4

¹ Mistura mineral e vitamínica, quantidade por kg de produto: 230 g de cálcio, 90 g de fósforo, 15 g de enxofre, 20 g de magnésio, 48 g de sódio, 100 mg de cobalto, 700 mg de cobre, 2.000 mg de ferro, 80 mg de iodo, 1.250 mg de manganês, 20 mg de selênio, 2.700 mg de zinco e 900 mg de flúor (máximo), 200.000 UI de vitamina A, 60.000 UI de vitamina D3, 60 UI de vitamina E.

² Estimada pelo programa C.N.C.P.S-Cornell versão 5.0.40.

Tabela 3. Esquema da análise de variância em delineamento em blocos com 20 medidas repetidas no tempo.

Causas de variação	Graus de Liberdade
Tratamento	2
Período	1
Resíduo A	14
Sub-parcelas	17
Tempo	19
Interação Tempo x Tratamento	38
Interação Tempo x Período	19
Resíduo B	266
Total	359

Tabela 4. Excreção total de urina (ETU), alantoína na urina (ALUR), ácido úrico na urina (AUUR), purinas totais (PT), alantoína em relação às purinas totais (ALPT), purinas microbianas absorvidas (PMAB) e proteína bruta microbiana (PBMI) de bovinos induzidos à acidose ruminal recebendo PAP ou MON.

Item	Tratamentos			Média ¹	EPM ²	Valor- <i>P</i>
	CTL	MON	PAP			
ETU, L/dia	6.57	7.76	5.72	6.70	0.47	0.1183
ALUR, mmol/dia	104.72	106.51	89.92	100.38	6.20	0.4046
AUUR, mmol/dia	7.04	6.40	5.81	6.42	0.59	0.6070
PT, mmol/dia	111.74	112.90	95.75	106.80	6.41	0.3822
ALPT, %	92.80	94.74	93.58	93.58	0.54	0.3091
PMAB, mmol/dia	95.58	90.0	74.66	86.68	7.35	0.4247
NMIC, g/dia	60.15	60.90	46.99	56.01	4.76	0.4249
PBMI, g/dia	375.93	354.03	293.66	340.95	28.92	0.4250

¹ Média entre tratamentos.

² EPM = erro padrão da média.

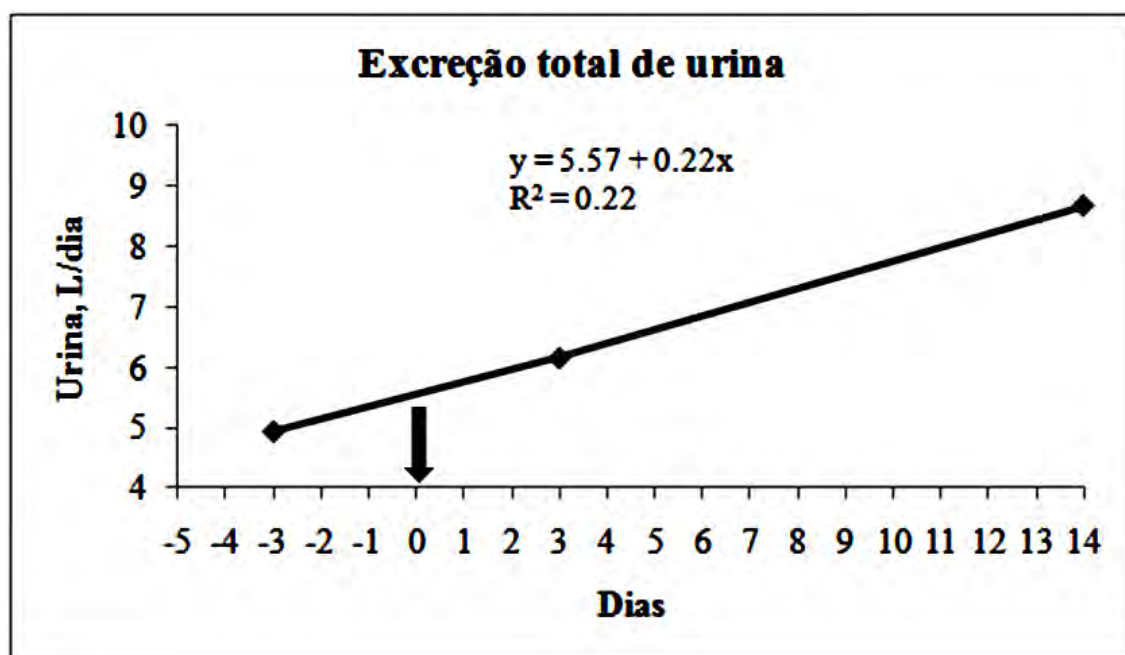


Figura 1. Excreção total de urina em bovinos induzidos à acidose ruminal. A flecha em negrito representa a mudança da dieta de 100% forragem para a de 74% concentrados, juntamente com o fornecimento dos aditivos alimentares.

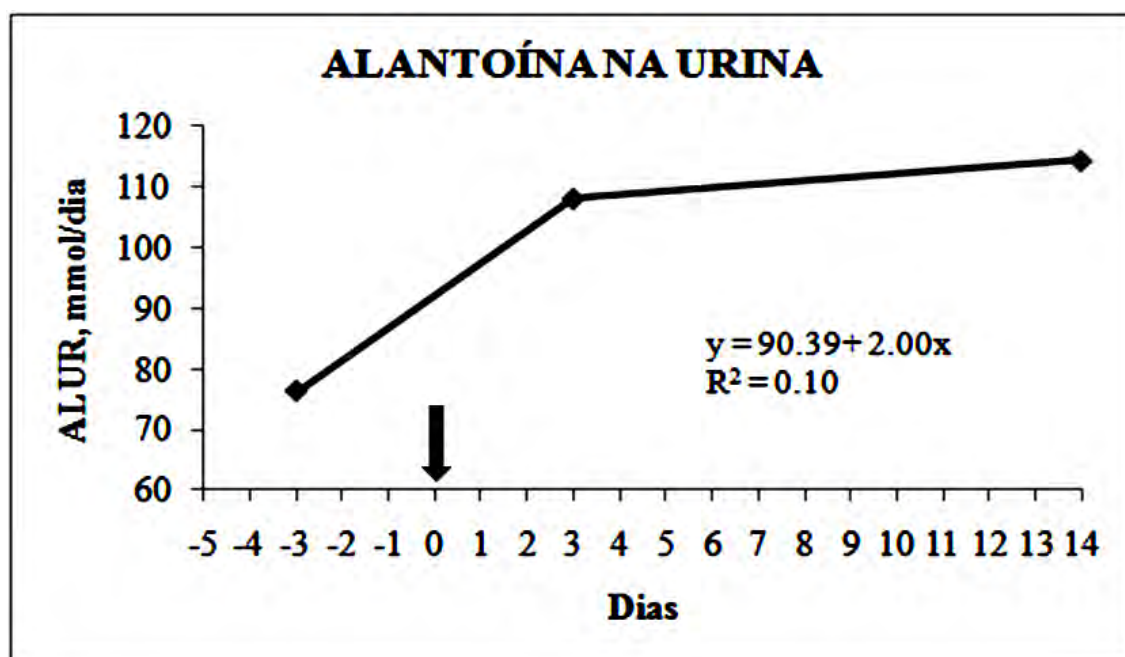


Figura 2. Alantoína presente na urina de bovinos induzidos à acidose ruminal. A flecha em negrito representa a mudança da dieta de 100% forragem para a de 74% concentrados, juntamente com o fornecimento dos aditivos alimentares.

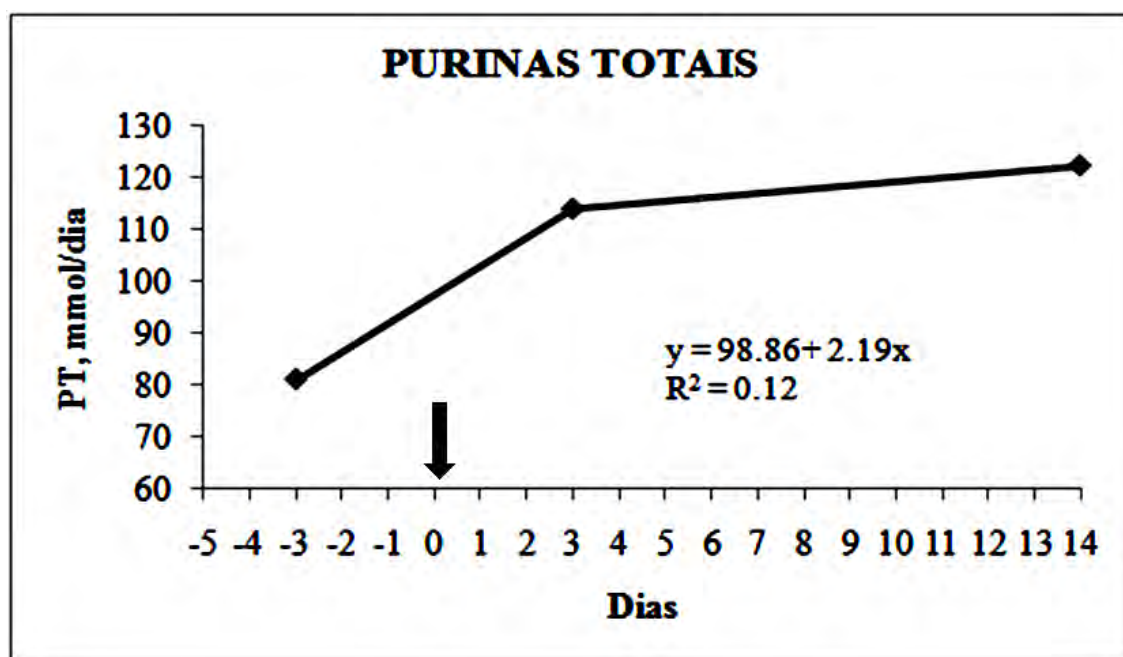


Figura 3. Purinas totais presentes na urina de bovinos induzidos à acidose ruminal. A flecha em negrito representa a mudança da dieta de 100% forragem para a de 74% concentrados, juntamente com o fornecimento dos aditivos alimentares.

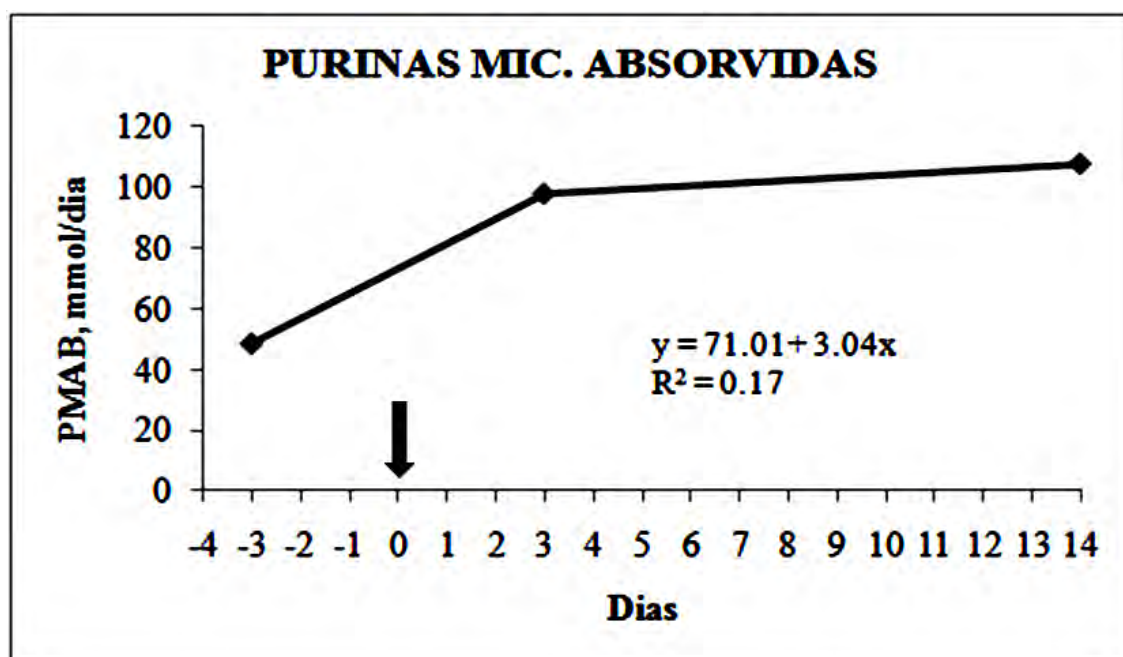


Figura 4. Purinas microbianas absorvidas em bovinos induzidos à acidose ruminal. A flecha em negrito representa a mudança da dieta de 100% forragem para a de 74% concentrados, juntamente com o fornecimento dos aditivos alimentares.

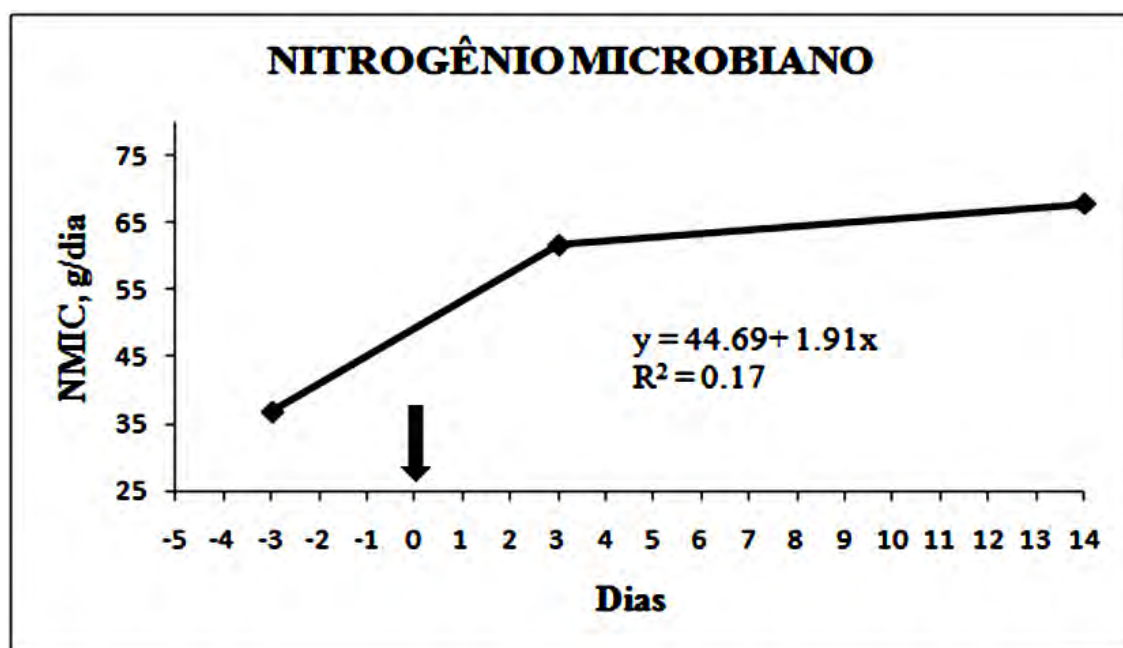


Figura 5. Nitrogênio microbiano de bovinos induzidos à acidose ruminal. A flecha em negrito representa a mudança da dieta de 100% forragem para a de 74% concentrados, juntamente com o fornecimento dos aditivos alimentares.

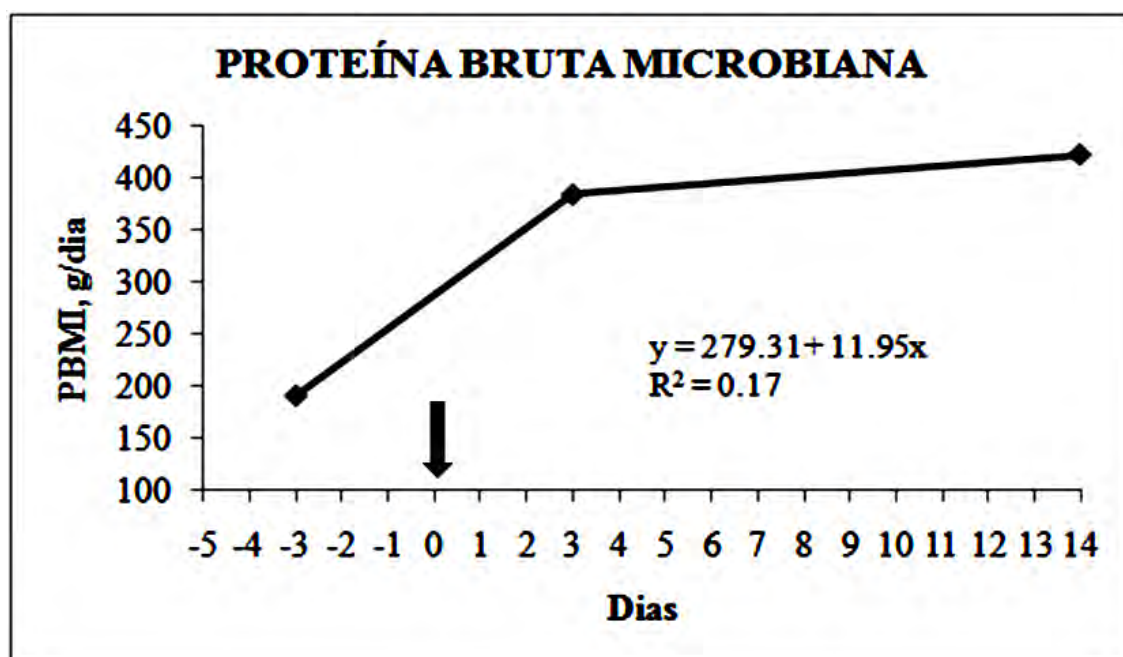


Figura 6. Proteína bruta microbiana de bovinos induzidos à acidose ruminal. A flecha em negrito representa a mudança da dieta de 100% forragem para a de 74% concentrados, juntamente com o fornecimento dos aditivos alimentares.

Capítulo 4

IMPLICAÇÕES

Ao analisar os principais resultados dos dois trabalhos conduzidos, é possível chegar à inferência de que em condições de indução à acidose subaguda, a MON controla o pH ruminal possivelmente pelo maior parcelamento da IMS e, de forma indireta, pelo aumento de área absorviva ruminal, o que contribui para o maior absorção ou desaparecimento ruminal de AGCCs.

Contudo, nenhum aditivo alimentar controlou o pH ruminal no 1 d. Partindo-se do ponto de vista prático e levando-se em consideração de que a dieta desafio estava, de certo modo, próxima das dietas de terminação administradas em confinamentos comerciais, o estudo de manejos de recebimento e pré-recebimento em confinamento com a administração de aditivos alimentares tornam-se interessantes, principalmente, quando buscados ciclos de crescimento e engorda com menores dias sob alimentação e transições rápidas de dietas.

Por outro lado, como a maioria dos resultados obtidos com a MON no presente estudo ocorreram até o 4 d, a avaliação da administração otimizada (e.g. por períodos curtos de tempo) deste ionóforo pode ser um caminho pela busca do menor uso de antibióticos na produção de carne.

A falta de resultados com o tratamento de PAP levanta a dúvida se ocorre perda de atividade com o processo de secagem do produto e se as condições experimentais deste estudo foram as mais corretas para a avaliação deste aditivo. Entretanto, como ocorre mais dificilmente a acidose aguda em animais alimentados em operações comerciais com alto grão, em comparação à acidose subaguda, outros enfoques podem ser dados para as pesquisas com PAP. Dentre todos, destaca-se a avaliação da redução ruminal de endotoxinas, justamente por essas substâncias debilitarem o sistema imune do ruminante e possivelmente estarem relacionadas com laminites e morte súbita.

A partir dos dados de IMS e pH ruminal, experimentos com menores tempos de adaptação à dietas de alto teor de concentrados tornam-se interessantes e fundamentáveis para as condições nacionais de alimentação em confinamento de gado de corte.

Estudos com a contagem de microrganismos ruminais, através de técnicas de biologia molecular, como o RT-PCR (PCR em tempo real), são imprescindíveis para a validação do uso destes aditivos alimentares.

Do ponto de vista do delineamento experimental, aconselha-se que em futuros estudos de acidose em animais canulados, nos quais a ingestão de matéria-seca seja variável importante, a administração dos tratamentos (aditivos alimentares) seja realizada via suplementação mineral. Dessa forma, a dosagem diária destes aditivos será proporcional à ingestão de matéria-seca e, possivelmente, gerará dados de mais fácil aplicabilidade para os técnicos de campo e produtores.