

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**Efeito de diferentes protocolos nutricionais sobre a população
de protozoários ciliados em bovinos Nelore confinados**

Rodrigo José de Oliveira

JABOTICABAL - SP

I

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**Efeito de diferentes protocolos nutricionais sobre a população
de protozoários ciliados em bovinos Nelore confinados**

Rodrigo José de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Danilo Domingues Millen

Coorientadores: Msc. Daniel Moretto Casali e
Msc. Leandro Aparecido Ferreira da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias –
Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para graduação em Zootecnia.

JABOTICABAL - SP

2/2023

O48c	Oliveira, Rodrigo José Efeito de diferentes protocolos nutricionais sobre a população de protozoários ciliados em bovinos Nelore confinados / Rodrigo José Oliveira. -- Jaboticabal, 2023 41 p. : tabs. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Danilo Domingues Millen Coorientador: Daniel Moretto Casali e Leandro Aparecido Ferreira Silva 1. Bovinos confinados. 2. Nelore. 3. Protocolos nutricionais. 4. Microbiologia do rúmen. 5. Protozoários ciliados. I. Título.
------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL



DEPARTAMENTO: Zootecnia

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TÍTULO: Efeito de diferentes protocolos nutricionais sobre a população de protozoários ciliados em bovinos nelore confinados.

ACADÊMICO: Rodrigo José de Oliveira

CURSO: Zootecnia

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Danilo Domingues Millen
Msc. Daniel Moretto Casali
Msc. Leandro Aparecido Ferreira da Silva

Aprovado e corrigido de acordo com as sugestões da Banca Examinadora

BANCA EXAMINADORA:

(Nomes)

(Assinaturas)

Presidente: Prof. Dr. Danilo Domingues Millen

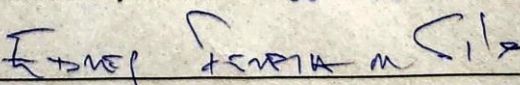
Membro: Msc. Ana Laura Januário Lelis

Membro: Dr. Antonio Marcos Silvestre

Documento assinado digitalmente
ANTONIO MARCOS SILVESTRE
Data: 18/12/2023 23:44:24-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Jaboticabal 06 / 12 / 2023

Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em: 06 / 12 / 2023


Prof. Dr. EDNEY PEREIRA DA SILVA
Chefe do Departamento de Zootecnia
Matrícula Nº 422823-6

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pela oportunidade de estudar, pela vida e saúde. Por nunca ter deixado desanimar e sempre persistir nos meus objetivos. Sou grato por cada aula, cada livro, cada professor e colega que cruzou meu caminho e me ajudou a crescer como estudante e como pessoa.

Aos meus pais, Adriana Cristina De Grandi Oliveira e José Augusto de Oliveira, que sempre me apoiaram em minhas decisões e por todo o esforço que fizeram e fazem para que eu pudesse me dedicar em minhas escolhas. Cada desafio superado, cada conquista celebrada, é uma homenagem direta aos seus esforços. Exemplos para minha vida.

Ao meu irmão, Ricardo Augusto de Oliveira pelo apoio e compreensão.

Aos meus companheiros de equipe, e amigos, Daniel Moretto Casali e Leandro Ferreira, que, apesar do breve tempo de convívio, se tornaram parte da minha vida, pelas boas conversas e das boas risadas de sempre. Guardarei no peito a lembrança de cada risada.

À minha também amiga, Ana Laura Lelis, pelo treinamento na contagem dos protozoários e por ter me dado todo o suporte durante o processo do meu desenvolvimento durante o período que estive no setor de bovinocultura, meus agradecimentos.

Ao Antonio Marcos Silvestre, por ter cedido parte do trabalho de doutorado para realização deste trabalho de conclusão de curso e por ter dado todo o suporte relacionado a este.

Ao meu orientador Danilo Domingues Millen, pela oportunidade a mim concedida, pelo tempo dedicado e sabedoria compartilhada.

À todos aos meus amigos que contribuíram no apoio de forma direta ou indiretamente neste trabalho.

“Faça o melhor que puder. Seja o melhor que puder. O resultado virá na mesma proporção de seu esforço.”

Mahatma Gandhi

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	7
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	9
2.1	Processamento dos Grãos.....	9
2.2	Inclusão de SCAG na dieta	11
2.3	Inclusão de Zinco e Cromo na dieta.....	13
2.4	Protozoários Ciliados	15
3.	HIPÓTESE.....	17
4.	OBJETIVOS	17
4.1	Objetivo Geral.....	17
4.2	Objetivos Específicos.....	17
5.	MATERIAL E MÉTODOS	18
5.1	Animais e locais do experimento	18
5.2	Delineamento experimental	18
5.3	Manejo, arraçãoamento e cuidado com os animais.....	19
5.4	Amostragem	20
5.5	Contagem total e diferencial de protozoários ruminais.....	21
5.6	Análise Estatística	22
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
7.	CONCLUSÕES	30
8.	RESUMO	31
9.	ABSTRACT.....	32
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura de corte é uma atividade que, por se ajustar às diversas condições verificadas no Brasil, é realizada em todo o território nacional (Kepler, *et al.*, 2002). No ano de 2022, o recorde brasileiro no volume de carne bovina exportado em um único ano, alcançou a marca de 2,26 milhões de toneladas vendidas para mais de 150 países. Ainda em 2022, o Brasil superou as exportações de 2021, com um crescimento de 22,6%. Os dados foram levantados pela Secretaria de Comércio Exterior (Secex) e compilados pela Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC, 2023).

Segundo dados divulgados pela ABIEC no ano de 2023, um marco histórico em faturamento também foi atingido ao longo do ano de 2022, com exportações na ordem de USD 12,97 bilhões. Registrou-se um aumento de 40,8% frente ao resultado do ano anterior. Em outras palavras, o setor acrescentou mais de US\$ 3,7 bilhões na balança comercial do Brasil ao longo de 2022 em comparação com 2021. Com um rebanho de mais de 234 milhões de cabeças em 2022, o Brasil se destaca como o maior exportador mundial de carne bovina, e grande parte desse sucesso é atribuído à contribuição da raça nelore. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no ano de 2021 aproximadamente 80% do rebanho bovino brasileiro é de origem Nelore, sendo amplamente reconhecida como a “raça mãe” do rebanho nacional.. Além disso, a raça Nelore é altamente adaptável às diferentes condições climáticas e geográficas do país, tornando-a uma escolha popular para sistemas de criação a pasto e confinamento. Isso se traduz em uma significativa importância econômica, pois a carne de Nelore é uma das principais *commodities* de exportação do Brasil, gerando receitas significativas para o país (Associação dos Criadores de Nelore do Brasil, 2021).

Aliado a esse potencial brasileiro na produção de carne e sabendo-se que historicamente, os ruminantes obtinham a maior parte das suas necessidades energéticas provenientes das forragens, recentemente, essas maiores demandas por produtos animais, aumentaram a necessidade de melhorias nas taxas de produção e crescimento de ruminantes (McAllister *et al.*, 1990). A pecuária de corte brasileira vem passando por um processo de intensificação, em busca do crescimento da taxa de desfrute do rebanho, em função disso, a prática de terminação de animais confinados vem crescendo consideravelmente nos últimos anos (Obeid *et al.*, 2006).

Com o avanço na nutrição atual, principalmente quando se é falado em animais confinados, o milho tem sido o grão mais utilizado nos confinamentos brasileiros, segundo levantamento realizado por Silvestre e Millen (2021), relatado por 97,2% dos nutricionistas entrevistados. A inclusão de grãos nas dietas em confinamentos em relação ao processamento, a moagem fina foi o principal método de processamento de grãos adotado pelos nutricionistas de confinamento no Brasil (44,4%), seguida pela moagem grossa (36,1%) e pela colheita e armazenamento com alto teor de umidade (13,9%).

Uma alternativa com o objetivo de aumentar a densidade energética da dieta, melhorando a eficiência alimentar, além de garantir a ingestão de fibra necessária para o bom funcionamento do rúmen, gorduras e óleos têm sido utilizados em substituição a elevadas proporções de grãos (Valinote *et al.*, 2005). Dietas com elevada proporção de concentrado e a adição de sais de cálcio de ácidos graxos melhoraram as características quantitativas (peso e rendimento) das carcaças de bovinos em fase de terminação, esse resultado faz com que essas carcaças possam ser usadas pelos produtores como alternativa para melhorar a eficiência do sistema de produção, uma vez que essas características são utilizadas pela indústria para a remuneração dos produtores (Margarido *et al.*, 2011).

Outro ponto significativo para o desempenho animal é a suplementação de minerais por eles requeridos, no entanto, para Costa e Silva *et al.* (2016), trabalhos desenvolvidos no Brasil, avaliando as perdas endógenas e os coeficientes de absorção de minerais em bovinos são escassos. Os poucos estudos realizados apresentam valores variáveis, não sendo possível estabelecer em edições anteriores uma recomendação precisa para bovinos criados em condições brasileiras. Todavia, Costa e Silva *et al.* (2015) verificaram que as perdas de minerais via urina podem chegar a 35% da quantidade do mineral consumido e assim, não devem ser desconsideradas. Dessa forma, o coeficiente de retenção verdadeira deveria ser considerado para todos os minerais ao invés do coeficiente de absorção, pois nem sempre o que está sendo absorvido será aproveitado pelo animal.

Concomitantemente, segundo Russell e Mantovani (2002), o estudo da microbiota ruminal deve ser encarado como importante área de pesquisa. Neste sentido Dehority (1993), classifica protozoários como sendo microrganismos unicelulares, anaeróbicos, não patogênicos,

que variam em tamanho de 20 a 200 μm - micrômetros (portanto, cerca de dez a cem vezes maiores que as bactérias). Apresentam organização interna complexa e altamente diferenciada, com estruturas funcionais similares à boca, esôfago, estômago, reto e ânus.

O rúmen contempla um vasto ecossistema, composto em grande maioria por microrganismos anaeróbicos, tais como bactérias, fungos e protozoários, tendo funções bioquímicas e fisiológicas bastante importantes para os animais ruminantes, de maneira principal no metabolismo dos nutrientes por produzirem enzimas responsáveis pela degradação do alimento ingerido, tal como celulose, hemicelulose e amido, presente na dieta consumida pelo animal, fornecendo energia ao hospedeiro estabelecendo uma relação mutualística de simbiose (Arcuri *et al.*, 2006). Apesar da maioria dos estudos referentes à microbiota do rúmen ser voltados às bactérias, os protozoários utilizam uma porção significativa dos carboidratos solúveis, amidos e carboidratos presentes na parede celular da planta para seu crescimento, além de participar da reciclagem de nitrogênio microbiano no rúmen e diminuição no suprimento de aminoácidos ao intestino (Ivan *et al.*, 2001). Os diferentes protocolos nutricionais hoje empregados em confinamento, com alto teor de carboidratos na dieta ou com gorduras, podem modular a quantidade da população de protozoários totais ou ocorrer uma variação entre os gêneros de ciliados ruminais, o que se torna importante o estudo e o entendimento das variações desses no ambiente ruminal, visto que agem em simbiose ao animal ruminante.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Processamento dos Grãos

A implantação do sistema de confinamento pode levar a um alívio da pressão de pastejo, principalmente na época seca do ano em que as pastagens possuem uma baixa qualidade nutricional. A dieta alto grão, sem volumoso, possibilita ao sistema do confinamento um máximo ganho de peso individual, proporciona a produção de animais precoces e permite uma padronização no lote. O que torna o sistema vantajoso e de fácil implantação é a ausência do fornecimento de volumoso, pois reduz o manejo pelos funcionários e os gastos que envolvem a produção e o armazenamento de um alimento volumoso em uma propriedade (Dias *et. al.*, 2016). Como resultado, os grãos de cereais, que têm um conteúdo de energia metabolizável

mais elevado do que as forragens, têm sido utilizadas para satisfazer as maiores demandas de energia associadas com aumento da produção de ruminantes (McAllister *et. al.*, 1990). O aumento da disponibilidade de energia da dieta sem aumento do teor de concentrado pode ser obtido pelo processamento do grão, que aumenta a disponibilidade do amido para digestão (Silva, 2007).

A moagem fina ou grossa, extrusão, micronização, tostagem, peletização e laminação são exemplos de processamentos a seco, enquanto a maceração, laminação a vapor, floculação, reconstituição, explosão, cozimento a vapor são processamentos que envolvem a adição de água aos grãos, frequentemente na forma de vapor e com pressão. A preparação física de grãos de cereais para a pecuária tem sido praticada por criadores de gado há muitos anos. Triturar, esmagar, laminar ou reidratar pareceu melhorar a palatabilidade e/ou a utilização de certos grãos (Hale, 1973).

Os fundamentos de todas as formas de processamento são a melhoria da digestibilidade dos alimentos por meio da quebra das barreiras que impedem o acesso dos microrganismos ruminais e das enzimas aos componentes nutricionais dos alimentos (McAllister *et. al.*, 1990) e/ou a conservação, o isolamento de partes específicas, a melhoria da palatabilidade ou a destoxificação dos alimentos (Pond *et. al.*, 1995). Na prática, os diferentes tipos de processamentos atuam aumentando a área de superfície dos grãos, reduzindo a interação da matriz proteica com os grânulos de amido e/ou aumentando a solubilidade dos grânulos de amido em água. Dessa forma, os processamentos podem aumentar a disponibilidade do amido e da proteína dos grãos no rúmen, e mudar as características da fermentação ruminal e da taxa de passagem e o sítio de digestão (Berchielli *et. al.*, 2011). Especificamente aos protozoários, um maior processamento dos grãos também possibilitariam uma maior disponibilidade de nutrientes a estes, principalmente a maior disponibilização do amido para obtenção de energia aos microorganismos.

Moran *et al.*, (1986) mostraram que os grãos de cereais diferem em sua suscetibilidade à digestão pelos microrganismos ruminais. O amido é o principal componente dos grãos de cereais. Minato e Suto (1979) sugeriram que a ligação bacteriana pode ser um requisito importante para a digestão microbiana, digestão do amido no rúmen.

A maioria dos métodos de processamento melhora a eficiência de utilização dos nutrientes dos alimentos pelos microrganismos ruminais e pelo trato digestório total, com resultados positivos sobre conversão alimentar (Barajas e Zinn, 1998), e sobre o desempenho do gado de corte em confinamento (Ladely et al., 1995). O aumento da participação ruminal na digestão do amido proporcionada pelos processamentos é benéfica nutricionalmente, porque aumenta a disponibilidade fermentável no rúmen, com consequentes aumentos das produções de proteína microbiana e de ácidos graxos voláteis totais (Nocek e Tamminga, 1991).

Segundo Costa, (2018) relata que a silagem de grãos úmidos é o produto da conservação de grãos de cereais logo após a maturação fisiológica, com teor médio de umidade de 28%. A silagem de grãos úmidos de cereais vem se destacando pela maior eficiência na conservação de alimentos concentrados energéticos para a alimentação animal. Grãos colhidos precocemente (30% de umidade) e armazenados em condições anaeróbicas apresentam em maiores digestibilidades *in vitro* e *in vivo* em comparação a grãos secos, conforme Silva (2007) *apud* Hibberd. O maior teor de umidade favorece a fermentação no interior do silo, resultando em maior solubilização dos nutrientes e melhora da digestibilidade e, consequentemente, aumentando o valor alimentar do grão (Simas, 1997).

2.2 Inclusão de SCAG na dieta

De acordo com Palmquist e Silva (2007), a importância da gordura na produção de bovinos tende a receber menor ênfase que outros nutrientes como proteína, fibra, minerais e vitaminas. No entanto, a gordura possui importantes qualidades para as dietas por ser uma fonte densa de energia e de ácidos graxos essenciais, aumentando a absorção de vitaminas lipossolúveis e a eficiência energética.

A inclusão de gorduras na dieta dos ruminantes pode servir como estratégia, principalmente em dietas de confinamento, que tenham um alto teor de carboidratos fermentáveis e limites de inclusão destes, para que se possa manter o animal sem problemas metabólicos, como ruminites, acidose e timpanismo. Segundo Silva 2007; Haaland et al., 1981; Chalupa et al., 1986; Schauff & Clark, 1989; dietas contendo mais de 5% de gordura não protegida da degradação ruminal reduzem a ingestão de alimento, prejudicando o desempenho de animais em crescimento e terminação. Entretanto, as gorduras protegidas, também

conhecidas como inertes, contêm 80 a 99% de lipídeos, não atuando de forma negativa na digestão das paredes celulares das forragens no rúmen, além de serem de fácil manuseio e possuírem um período de conservação maior que o das gorduras não protegidas.

Os sais de cálcio devem ser apropriadamente chamados de “inertes”, por não interferirem com a atividade microbiana no rúmen, normalmente, a biohidrogenação. Embora os sais de cálcio se dissociem no rúmen, não se observa aumento na concentração de ácidos graxos não-esterificados em nível suficiente para prejudicar o metabolismo microbiano (Berchielli *et al.*, 2011). Para Silva (2007), os sais de cálcio de ácidos graxos são gorduras insolúveis no rúmen, onde o pH é mais elevado, e solúveis no abomaso, onde o pH é ácido. Chalupa *et al.* (1986) observam que valores de pH ruminal inferiores a 6,0 podem causar dissociação desse complexo no rúmen, liberando ácidos graxos livres, que, em níveis elevados, têm efeito tóxico sobre algumas bactérias e protozoários ruminais. Conforme os resultados apresentados por Ngidi *et al.* (1990), foram observados efeitos significativos na ingestão de MS e no ganho de peso de bovinos em fase de terminação, em relação à adição de níveis de SCAG (0, 2, 4 ou 6%) em dietas com alta porcentagem de concentrado (85%). A ingestão de MS e o ganho de peso reduziram linearmente à medida que aumentou o nível de SCAG nas dietas. Os autores atribuíram essa redução à possível falta de aceitabilidade dos sais de cálcio, aos controles quimiostático e lipostático da ingestão e ao efeito depressivo sobre a motilidade ruminal causado pelos ácidos graxos de cadeia longa no duodeno.

Da mesma forma, Aferri *et al.* (2005) conduziram um estudo sobre a inclusão de 5% de SCAG na dieta de novilhos em fase de terminação, mantidos em confinamento por 70 dias, em uma dieta com 81% de concentrado. Os resultados indicaram que a inclusão de SCAG não exerceu um impacto significativo sobre o desempenho geral dos animais. No entanto, os animais tratados com SCAG apresentaram um ganho de peso médio 8% maior e uma ingestão média 9% menor, resultando em uma melhoria média de 2% na conversão alimentar.

Em contrapartida, Haaland *et al.* (1981) realizaram um estudo focado na suplementação de gordura animal (0, 5 ou 10%) protegida da degradação ruminal em novilhos mantidos em confinamento. Concluíram que a adição de 10% de gordura protegida reduziu a ingestão de MS, mas não afetou significativamente o ganho de peso nem a eficiência alimentar em comparação

com a dieta controle (sem gordura). No entanto, os animais alimentados com dietas suplementadas com um nível intermediário de gordura protegida (5%) consumiram mais, ganharam mais peso e demonstraram ser mais eficientes em relação àqueles alimentados com a dieta contendo 10% de gordura protegida.

2.3 Inclusão de Zinco e Cromo na dieta

Outro fator que tem agregado na nutrição de bovinos, é a suplementação de minerais, para Costa e Silva et al., 2016, as funções do zinco, por exemplo, no organismo estão principalmente relacionadas à ação enzimática, ainda, observa-se que o desenvolvimento e a funcionalidade do sistema imune são dependentes de zinco. Miller e Cragle (1965) sugeriram que a absorção de zinco ocorre principalmente no abomaso e intestino delgado. Porém, Sathler (2015) observou que, em dietas contendo suplementação de microminerais, o principal local de absorção de zinco foi o rúmen (em torno de 43,7% do que foi ingerido), enquanto em dietas sem a suplementação de microminerais, o principal local de absorção foi o intestino grosso sendo, em média, 27% do zinco ingerido foi absorvido.

Para Berchielli *et al.* (2011) os minerais também exercem efeito de forma direta ou indireta sobre a qualidade da carne. Indiretamente, por favorecer ritmos de crescimento aos aspectos qualitativos da carcaça dos animais; diretamente por estarem relacionados com essa característica, como o zinco, que exerce funções juntamente com a vitamina D. O zinco também está relacionado com as características de carcaça. Estudos realizados com novilhos (Spears e Kegley, 2002) constataram que a suplementação com zinco aumentou o grau de qualidade e marmoreio da carne dos animais, e tenderam a apresentar carcaças com maior quantidade e espessura de gordura, quando comparado a novilhos não suplementados. Embora altas inclusões de zinco pode ser tóxico para os protozoários ruminais, principalmente em altas doses, em níveis de 1000 ppm, o zinco pode induzir uma defaunação completa e duradoura, e altas concentrações de zinco reduziram a atividade fermentativa de ciliados.

Já em relação ao cromo, vários estudos apontam os efeitos benéficos deste no sistema imune, na taxa de crescimento e nas funções metabólicas. Este mineral funciona como componente integral e biológico ativo do fator de tolerância à glicose (GTF), que potencializa a

ação da insulina nas células, facilitando a interação entre a insulina e os receptores dos tecidos musculares e gordurosos (Mertz, 1987).

Existem indicações de que o cromo, por exemplo, pode ser requerido para o metabolismo dos lipídeos, para ativação de determinadas enzimas e para estabilização de proteínas (McDowell, 1992). A principal função metabólica desse mineral é potencializar a ação da insulina por meio de sua presença em um composto (GTF-*glucose tolerance factor*) que favorece a tolerância do organismo à glicose. O GTF potencializa a ação da insulina ao facilitar sua interação com receptores localizados nas superfícies das células, melhorando a sensibilidade à insulina e aumentando a resposta à sua ação em tecidos periféricos, sendo capaz de reverter os efeitos da hiperglicemia (McDowell, 1999).

Alguns autores sugerem que animais suplementados com cromo possuem menor concentração sérica de cortisol e são menos susceptíveis ao estresse. De acordo com um deles a resposta imunológica e o desempenho nutricional de bovinos submetidos a uma situação de estresse são melhorados com uma dieta contendo o mineral (Borgs & Mallard, 1998). Vale a pena destacar que não é o uso do cromo em si que faz aumentar o ganho de peso, e sim, o fato de que esse mineral irá evitar a redução do ganho que é provocado pelo estresse (Campos, 2022).

Bernhard et al. (2012) avaliaram os efeitos da suplementação de cromo no desempenho de novilhos e observaram diferença no GMD de novilhos sem suplementação em relação aos que receberam 0,3 mg/kg CMS. Além disso, alguns estudos (Butting et al., 1994; Kegley e Spears, 1995) avaliaram a suplementação de cromo em bezerros e sugeriram que a adição de 0,4 mg/kg CMS de cromo aumenta a taxa de depuração de glicose. Com isso, o NRC (2000) adotou a recomendação de 0,4 mg/kg CMS como as exigências dietéticas de cromo para bovinos de corte. No entanto, na fermentação ruminal, o cromo pode ter um papel importante na regulação da microbiota ruminal, onde estudos in vitro demonstraram a inibição seletiva das taxas de crescimento bacteriano pelo cromo, o que pode ter efeitos sobre as populações de bactérias anaeróbias no rúmen. Essa observação sugere um possível mecanismo indireto pelo qual a dieta contendo cromo pode afetar a saúde e o desempenho dos ruminantes.

2.4 Protozoários Ciliados

A população de protozoários do conteúdo ruminal de animais alimentados com diferentes tipos de dieta varia em concentração, entre 10^4 e 10^6 protozoários/ml de conteúdo ruminal (D'Agosto *et. al.*, 2001). Em decorrência do seu tamanho, essa concentração, em geral, representa de 40% a 60% da biomassa microbiana total do rúmen (Ezequiel *et. al.*, 2002). Como consequência, a presença de protozoários no rúmen traz efeitos benéficos e outros adversos para a produção animal (Berchielli *et. al.*, 2011).

Alguns protozoários são celulolíticos, mas os principais substratos utilizados pela fauna ruminal como fonte de energia são os açúcares e amidos, que são assimilados rapidamente e estocados (Williams, 1986). Portanto, os protozoários desempenham um efeito tamponante, pois as bactérias não têm acesso a uma quantidade excessiva de substratos prontamente fermentáveis. Consequentemente, a presença de protozoários no rúmen reduz o risco de acidose, em dietas ricas em grãos ou açúcares (Lopes *et. al.*, 2002).

Entre os efeitos benéficos aumentados pela presença de protozoários ruminais mais frequentes descrito por Berchielli *et al.* (2011), estão a estabilidade da fermentação e do pH; aspecto físico do animal; concentração de AGVs elevada e estável; degradação da matéria seca; degradação da fibra e digestão do amido. Ainda segundo Berchielli, alguns efeitos podem ser diminuídos também pela presença dos protozoários ruminais, como a concentração de ácido láctico; susceptibilidade à acidose por ácido láctico; susceptibilidade à toxidez por cobre; susceptibilidade às diarreias.

Ademais, Berchielli *et al.* (2011) caracterizam morfologicamente os principais gêneros de protozoários ruminais em 1. *Isotricha*, com cílios cobrindo o corpo em cinécias longitudinais, paralelas ao eixo do corpo, placas esqueléticas ausentes, macronúcleo triangular, com vários vacúolos contráteis, largura entre 73-155 μm , comprimento 105 – 207 μm ; 2. *Dasytricha*, com cílios cobrindo o corpo em cinécias oblíquas ao eixo do corpo, abertura do vestíbulo localizada na extremidade posterior do corpo, placas esqueléticas ausentes, macronúcleo esférico a elíptico, um vacúolo contrátil, largura de 38-53 μm , comprimento 60-100 μm ; 3. *Entodinium* em que a forma corporal varia entre as diferentes espécies (arredondada, alongada, simétrica, assimétrica),

única banda ciliar em volta da abertura oral, placas esqueléticas ausentes, macronúcleo geralmente alongado, presença de vacúolo contrátil em algumas espécies, com largura de 14-90 µm e comprimento de 22-115 µm; e a subfamília 4. *Diplodinium* com forma do corpo variando entre as diferentes espécies, placas esqueléticas ausentes, presença de espinhos (de 1 a 6) na região posterior de algumas espécies, placas esqueléticas ausentes, macronúcleo com o terço anterior inclinado à direita, localizado no meio do corpo, vacúolo contrátil encontrado em algumas espécies, com largura entre 20-80 µm e comprimento de 30-120 µm.

Em estudo publicado por Nagaraja & Titgemeyer (2007) relatam que uma redução no número da população de ciliados ruminais pode ser um bom indicador de acidose aguda e subaguda devido ao acúmulo de ácido láctico ou ácidos graxos voláteis no rúmen, respectivamente. De acordo com Clarke (1977) os protozoários ciliados ruminais são sensíveis às mudanças no pH ruminal e não podem sobreviver se o pH subir acima de 7,8 ou cair abaixo de 5,0. Owens *et al.* (1998) sugeriu que em dietas com alto teor de concentrado, a prevalência de protozoários no rúmen normalmente diminui, provavelmente devido à falta de um tapete fibroso flutuante no rúmen, onde os ciliados permanecem para se multiplicarem. O fato de os protozoários reduzirem o grau e a taxa de digestão do amido no rúmen com a ingestão e o armazenamento dos grânulos de amido pode reduzir a disponibilidade de amido no rúmen, evitando problemas metabólicos em decorrência de sua rápida degradação (Silva, 2007).

Em bovinos, os protozoários predominantes são do gênero *Entodinium* que atuam englobando o grânulo de amido e o utilizando como fonte de energia para seu desenvolvimento (Dehority, 1991), presentes em maior quantidade no ambiente ruminal quando o pH se mantém no máximo a 5,8, tendo sua população reduzida quando houver maior acidificação (Yokoyama; Johnson, 1993). Já os gêneros *Dasytricha* e *Isotricha* têm como principal fonte de energia carboidratos solúveis e polissacarídeos não estruturais (Nogueira Filho et al., 2008).

Sendo assim, protozoários exercem certo controle biológico da fermentação ruminal, predando as bactérias, não permitindo a proliferação excessiva destas dentro do ambiente ruminal, mantendo que a produção de ácidos não cause desordens, dificultando o desenvolvimento de desordens digestivas como acidose, laminite e timpanismo. Além disso, os protozoários também atuam como controladores da fermentação ruminal, liberando lentamente

o amido para que sejam fermentados pela microbiota bacteriana. Por outro lado, o pH ideal para a sobrevivência dos protozoários gira em torno de 6,5 (Carvalho *et al.*, 2003), concluindo que o pH do ambiente ruminal influencia diretamente a população dos protozoários, afetando os produtos de fermentação, e influenciando na motilidade e absorção ruminal (Nagaraja; Titgemeyer, 2007).

3. HIPÓTESE

Os diferentes protocolos nutricionais podem modular a quantidade da população de protozoários totais ou ocorrer uma variação entre os gêneros de ciliados ruminais, devido à preferência ou adaptação dos protozoários a diferentes disponibilidades de nutrientes?

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a variação da população de protozoários ciliados no rúmen em animais nelore confinados ingerindo diferentes protocolos nutricionais.

4.2 Objetivos Específicos

- 1- Avaliar o efeito dos diferentes protocolos nutricionais na quantidade total de protozoários presentes no rúmen.
- 2- Avaliar o efeito dos diferentes protocolos nutricionais na quantidade de diferentes gêneros de protozoários presentes no rúmen.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais e locais do experimento

O estudo foi conduzido no confinamento experimental da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT), Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Dracena. Todos os procedimentos envolvendo a utilização de animais no estudo seguiram as diretrizes estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade estadual Paulista - UNESP (protocolo nº 0151/2019).

Foram utilizados 150 animais, machos, não castrados, da raça Nelore que participaram do programa de Certificado Especial de Identificação e Produção (CEIP). Os animais tinham peso vivo médio inicial de $404,28 \pm 23,14$ kg, provindos de sistema de recria em pastejo contínuo, sendo que 30 deles foram abatidos como referência no dia 0 do experimento. Portanto, o estudo prosseguiu com 120 animais, os quais foram alocados em 30 baias ($n = 4$ por baia). Para o abate referência foi utilizado 1 animal por baia.

5.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizados em arranjo fatorial $2 \times 2 + 1$. Utilizado as DEP's para marmoreio dos pais dos animais (foram utilizados 18 pais) para separa-los em dois grupos, os 75 animais de maiores valores de DEP no grupo de alta e os 75 animais de menor valor no grupo de baixa (para os animais em que os pais não tinham avaliação para marmoreio utilizou-se o nível de marmoreio mensurado por ultrassom). Feito isto, dentro de cada grupo os animais foram blocados pelo peso vivo inicial. Os animais foram pré-adaptados ao local, e para a uniformização da população ruminal, recebendo feno de *Tifton* por 7 dias. Posteriormente, os animais foram alocados nas baias dividindo-os aleatoriamente, dentro de cada bloco, em cinco tratamentos de acordo com a associação do processamento do milho e a inclusão de SCAG: **1)** Grão de milho seco finamente moído; **2)** Silagem de grão úmido de milho; **3)** Grão de milho seco finamente moído + SCAG (NutriGordura; Nutricorp Nutrição Animal; Araras, SP); **4)** Silagem de grão de milho úmido + SCAG; **5)** Silagem de grão de milho úmido + SCAG + zinco e cromo orgânico (Zinpro Animal Nutrition; Piracicaba, SP). A monensina sódica (Rumensin 200; Elanco Saúde Animal, São Paulo, SP) foi utilizada em todos os tratamentos na dosagem de 25 ppm. Cada tratamento foi composto por 6 repetições

(bacias), as quais respeitaram os critérios de blocagem e foram as unidades experimentais deste estudo.

5.3 Manejo, arraçãoamento e cuidado com os animais

Todos os animais foram submetidos ao mesmo tipo de fornecimento de dietas, alojamento e manejo. Os animais foram pesados, tratados com anti-helmínticos, e vacinados (rota e coronavírus, tétano, botulismo e sete tipos de *Clostridium spp*; “Cattlemaster, Pfizer Animal Health, New York, NY”). O arraçãoamento foi feito duas vezes ao dia: às 09:00 (45% do total) e 16:00 (55% do total). As baias eram parcialmente concretadas, com boa facilidade na circulação do ar e lotação de 4 animais por baia (18 m² e 1,5 m linear de cocho por animal), sempre com água à vontade disponível em bebedouro automático.

O estudo teve duração de 112 dias, com período de adaptação de 20 dias. O protocolo de adaptação foi feito em escada (*step-up*), ou seja, foram fornecidas três dietas de adaptação, iniciando com 69% de concentrado, com acréscimos de 5% entre elas, sendo que a quantia de volumoso retirada é em sua totalidade de feno. A transição das dietas de adaptação para a dieta de terminação foi feita da seguinte forma: 6 dias da Adaptação 1; 5 dias da Adaptação 2 e 9 dias da Adaptação 3. A dieta de terminação foi composta por 84% de ingredientes concentrados. As rações experimentais foram formuladas segundo o LRNS (Large Ruminant Nutrition System, Fox et al. 2004), nível 2, cujos níveis estão apresentados na Tabela 1. As rações foram fornecidas *ad libitum* e submetidas a ajustes de quantidade diariamente, com base na quantidade de sobra nos cochos, a qual foi mantida em 5% da quantidade oferecida.

Tabela 1. Composição e conteúdo nutricional das dietas totais de acordo com os tratamentos.					
Tratamentos	1	2	3	4	5
Níveis de Concentrado (%)	84	84	84	84	84
Ingredientes (% MS)					
Feno	3	3	3	3	3
Bagaço de Cana	13	13	13	13	13
Farelo de Soja	10,71	10,01	10,81	10,41	10,41
Silagem de grão úmido de milho		51		48	48
Milho grão moído fino	70,3	20	67,6	20	20

Uréia	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
Núcleo mineral	0,98	0,98	0,98	0,98	0,86
Sal	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Gordura Protegida			3,2	3,2	3,2
Calcário	1	1	0,4	0,4	0,4
Availa Zn120					0,075
Availa Cr1000					0,045
Rumensin	0,0125	0,0125	0,0125	0,0125	0,0125
Conteúdo Nutricional					
Matéria Seca (MS)	84	76	85	77	77
Nutrientes Digestíveis Totais (% MS)	75	79	79	82	82
Proteína Bruta (% MS)	14,3	14,2	14,1	14,1	14,1
Fibra em Detergente Neutro (% MS)	24,1	21,1	23,8	20,9	20,9
Carboidratos não fibrosos (% MS)	56	59	54	57	57
Extrato Etéreo (% MS)	3	3,6	5,5	6,1	6,1
peFDN	13	14	13	14	14
Elg (Mcal/Kg MS)	1,17	1,27	1,26	1,35	1,35
Ca (% MS)	0,56	0,54	0,56	0,55	0,57
P (% MS)	0,41	0,41	0,41	0,4	0,4
Cr (mg/Kg)					0,45
Zn (mg/Kg)	63,99	52,68	63,47	52,94	143,35

T1: Milho finamente moído; T2: Milho com alta umidade; T3: Milho finamente moído + gordura protegida no rúmen (NutriGordura; NutricorpNutrição Animal; Araras, São Paulo, Brasil); T4: Milho de alta umidade + gordura protegida no rúmen; T5: Milho de alta umidade + gordura protegida no rúmen + Zn e Cr (Zinpro Animal Nutrition; Piracicaba, São Paulo, Brasil).

Fonte: Adaptado pelo autor

O CMS foi medido para cada baía por meio da pesagem do alimento fornecido diariamente, e consequente pesagem da sobra antes do trato da manhã seguinte, aproximadamente 24 horas após o fornecimento. A determinação da matéria seca da ração total oferecida foi efetuada todos os dias coletando-se uma amostra por tratamento, para então se obter o CMS diário, o qual foi expresso em quilos e em porcentagem do peso vivo.

5.4 Amostragem

A amostragem do conteúdo ruminal foi realizada manualmente, após o abate e evisceração, coletando uma amostra do conteúdo ruminal por amostragem em três locais

distintos. Em seguida, 10 ml deste material foi armazenado em um frasco contendo 20 ml de formaldeído 50% (v/v) para posterior análise.

5.5 Contagem total e diferencial de protozoários ruminais

Para a realização da contagem diferencial dos protozoários foi utilizado 1 mL da amostra diluída com formol e nesta, adicionada 2 gotas de verde brilhante a 2%, deixando repousar por 4 horas. Em seguida, adicionado 9 mL de glicerol a 30% e homogeneizado no agitador tipo vortex, tornando a alíquota do líquido ruminal diluída 30 vezes. Antes de utilizar 1 mL da amostra diluída, o frasco foi agitado novamente, para homogeneizar a amostra (Figura 1).

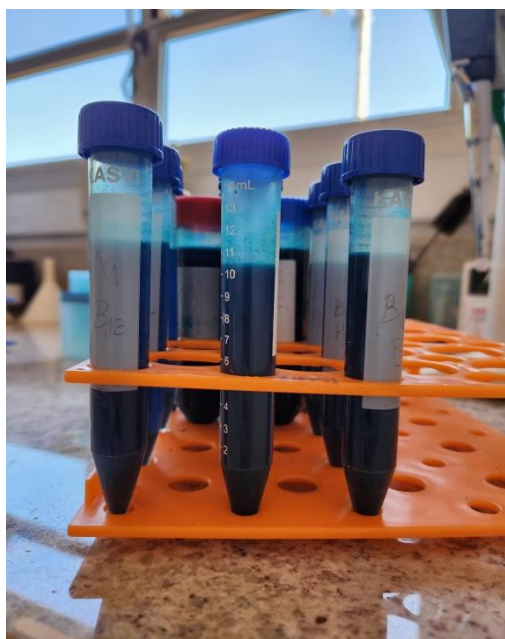


Figura 1. Solução contendo protozoários ruminais armazenados em tubos tipo Falcon.

Para as contagens diferenciais dos protozoários utilizou-se uma câmara de contagem “Sedgwick-Rafter” composta por retículo de 0,5 mm x 0,5 mm de área, com subdivisões de 25 quadrículos. Um Grid Counting foi acoplada à ocular de um microscópio da marca Digilab Microscopio Biológico Trinocular Di-136t (Figura 2), conforme técnica descrita por Dehority (1993). Com o grid acoplado ao microscópio, contou-se 100 campos óticos através do retículo, com aumento de 100 x. Do total de protozoários, diferenciou-se cinco gêneros, dos quais *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium*, e a subfamília *Diplodinium*.

Para calcular o número total de protozoários de cada lâmina, foi utilizado o parâmetro da área do retículo de $0,25 \text{ mm}^2$. A altura interna da câmara de Sedgwick-Rafter de 1 mm . Volume para área do retículo sendo $0,25 \text{ mm}^2 \times 1 \text{ mm} = 0,25 \text{ mm}^3$. Volume para 100 campos = $0,25 \text{ mm}^3 \times 100 = 25 \text{ mm}^3$. $1000 \text{ mm}^3 = 1 \text{ cm}^3 = 1 \text{ mL}$.



Figura 2. Microscópio utilizado para a contagem dos protozoários ruminais.

A correção da área contada para 1 mL foi realizado o cálculo $1000 \text{ mm}^3 / 25 \text{ mm}^3 = 40$. Multiplicado pela diluição, que foi de 30 e dividida por 1000, chegando a um valor de 1,2, utilizado para multiplicar ao resultado de protozoários contados para estimar e corrigir para a área contada e ao volume de 1 mL . Ao final foi multiplicado o número de protozoários estimados por 10^3 para estimar a quantidade total de protozoários.

5.6 Análise Estatística

As variáveis avaliadas no experimento foram analisadas pelo procedimento MIXED of 2 SAS (SAS 2003; SAS Institute, Cary, NC, EUA). Na análise estatística realizada, foi feito uma Análise de Variância (ANOVA) nas variáveis *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium*, *Diplodinium* e Protozoários Totais.

A ANOVA foi empregada para analisar as diferenças entre as médias do grupo da amostra, seguida pelo teste de Tukey, que foi utilizado para identificar quais médias específicas (entre três ou mais) diferem entre si, para comparação de médias, sendo considerado significativo quando $p < 0,05$. Foi aplicado o procedimento de Modelo Linear Misto (PROC MIXED) para a análise dos dados para modelar os dados, com correlações entre as observações.

Foram realizados contrastes, utilizados para efetuar comparações específicas entre os níveis dos fatores. As comparações incluíram MILHO: SECO vs. ÚMIDO, GORDURA: COM vs. SEM, INTERAÇÃO MILHO*GORDURA e EFEITO Zn Cr: T4 vs. T5. Por fim, os efeitos aleatórios foram utilizados para modelar a variabilidade entre as unidades experimentais, neste caso, BLOCO e DEP.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo dado da tabela a seguir é possível analisar alguns valores obtidos entre os tratamentos para os diferentes gêneros de protozoários:

Tabela 1. Efeito dos tratamentos em relação à população dos diferentes gêneros de protozoários ciliados (contagem por ml).

Tratamento/Protozoários	Milho seco		Milho úmido			EPM	Contraste (valor de P)			
	GP-	GP+	GP-	GP+	GP+ ZnCr		Milho	GP	Milho*GP	ZnCr
Isotricha, 10 ³ /ml	0,955	4,345	4,004	5,988	5,875	0,759	0,028	0,014	0,454	0,891
Dasytricha, 10 ³ /ml	6,343	5,925	4,130	6,513	1,269	1,440	0,567	0,4983	0,338	0,019
Entodinium, 10 ³ /ml	99,032	83,496	99,904	107,510	102,210	8,001	0,137	0,625	0,172	0,746
Diplodinium, 10 ³ /ml	29,490	32,580	28,940	27,760	27,920	4,379	0,530	0,830	0,620	0,980
População total, 10 ³ /ml	160,700	118,580	123,550	154,540	107,430	7,020	0,930	0,350	<0,001	<0,001

Fonte: Adaptado pelo autor

As colunas representam os seguintes dados: Milho seco, Milho úmido, GP-, GP+, GP+ ZnCr, EPM. Em relação aos contrastes: Milho, GP, Milho*GP e ZnCr. As linhas representam os gêneros de protozoários: *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium*, *Diplodinium* e População total. Os valores apresentados na tabela são expressos em 10³ por ml e representam a quantidade de protozoários ruminais encontrados em cada tratamento. A população total é a soma dos valores encontrados para cada gênero de protozoário ruminal.

Na tabela apresentada, os valores de EPM (Erro Padrão da Média) variam para cada gênero de protozoário ruminal (contagem por ml). Para *Isotricha*, o valor de EPM é 0,7591. Para *Dasytricha*, o valor de EPM é 1,4397. Para *Entodinium*, o valor de EPM é 8,0007. Para *Diplodinium*, o valor de EPM é 4,3788. Para a população total, o valor de EPM é 7,0197. Um desvio padrão alto indica que os valores estão mais distantes da média e há uma maior dispersão dos dados, portanto, valores menores de EPM indicam resultados mais precisos e que não há uma grande variação nos dados. As diferenças nos gêneros de protozoários obtidas neste estudo vão de encontro com os resultados de Williams (1986), que reporta que a dieta é um dos fatores mais importantes para a concentração e a distribuição de protozoários existentes no rúmen.

Levando em consideração valor de p com significância menor que 5%, ou seja, um valor de significância $p < 0,05$, e considerando a Tabela 2, observou-se diferença estatística com significância de 0,027 para o gênero de protozoário *Isotricha*, entre os processamentos de milho seco com o milho úmido, no qual apresentou 0,955 protozoários do gênero a 10^3 /ml e 4,004 a 10^3 /ml de protozoários, respectivamente. Para esse mesmo gênero de protozoário (*Isotricha*), foi encontrada também uma diferença estatística com significância de 0,014, também em relação à inclusão de gordura protegida (comparações entre ausência e presença de gordura protegida) com $p < 0,05$, houve um aumento na população deste gênero quando adicionado gordura protegida.

Esses resultados indicam que, para o gênero *Isotricha*, a mudança de milho seco para milho úmido resultou em diferenças significativas na quantidade total deste gênero de protozoário. O aumento no processamento do milho, de seco para úmido, para o protozoário *Isotricha*, concordam com o publicado por Lucci *et. al* (2007), em que encontraram que o processamento do grão reduziu a população total de protozoários, mas aumentou a proporção de *Isotricha*, em consonância com os resultados obtidos por este estudo. Uma hipótese pode ser ao fato de o gênero *Isotricha* ter como principal fonte de energia carboidratos solúveis e polissacarídeos não estruturais (Nogueira Filho *et al.*, 2008), o que pode indicar um aumento destes quando aumentado o teor de amido disponível na dieta. Uma hipótese para a inclusão de gordura na dieta ter aumentado a

quantidade deste gênero em relação à ausência da gordura ao tratamento, é que com a inclusão desta ao tratamento, foi substituído parte dos carboidratos fermentáveis na dieta total, e levado a não ocorrer uma redução do pH drasticamente do ambiente ruminal, pela fermentação menor e este gênero ter sido favorecido por este pH mais estável no rúmen.

Ainda levando em consideração os dados da Tabela 2, houve uma diferença para o gênero de protozoário *Dasytricha* para o tratamento contendo Zn e Cr, com significância de 0,0188, com valores de protozoário para o tratamento milho úmido GP+ de $6,5126 \cdot 10^3$ /ml de protozoários e $1,2692 \cdot 10^3$ /ml de protozoários para o tratamento milho úmido GP+ ZnCr. Houve, portanto, redução na população de protozoários do gênero *Dasytricha*, no tratamento com Zn e Cr ($p < 0.05$), além de apresentar uma população de protozoários totais, também menor, do que todos os outros tratamentos, o que pode indicar uma toxicidade por estes minerais, especificamente maiores para este gênero, quando suplementados em dietas para ruminantes. Divergindo o que foi encontrado por Silva (2018), onde a interação entre zinco e cromo foi significativa apenas para o número de protozoários do gênero *Dasytricha*, que foi maior no tratamento zinco + cromo do que nos demais.

Não houve diferença estatística entre os tratamentos para a população de *Entodinium* e *Diplodinium* ($p > 0.05$). Entretanto, entre os gêneros analisados, o gênero *Entodinium* foi o que mais apresentou indivíduos, independentemente ao tratamento analisado, com algumas variações na quantidade, porém sempre em maior número. A predominância do gênero *Entodinium* nesta análise é semelhante à encontrada por Martinele (2008), em que relata que por serem espécies colonizadoras ruminais e possuir grande número de espécies, tem ampla distribuição no rúmen. Em complemento, os autores Williams e Coleman (1992), citam que grande parte das espécies que compõem o gênero são amilolíticas, expondo um dos motivos dos *Entodinium* serem encontrados em alta densidade em bovinos confinados, o que pode ser replicado a esta análise, uma vez em que os tratamentos foram usados dietas com alto teor de amido. O predomínio de protozoários *Entodinium* também foi relatado por outros autores que estudaram as populações de protozoários em bovinos com diferentes

dietas alimentares, como dieta rica em cana-de-açúcar e, portanto, com alto teor de energia (Franzolin; Franzolin, 2000), em dietas ricas em concentrados, com ou sem adição de gordura (Towne et al., 1990) e influência de gordura na microbiota ruminal (Messana, 2012).

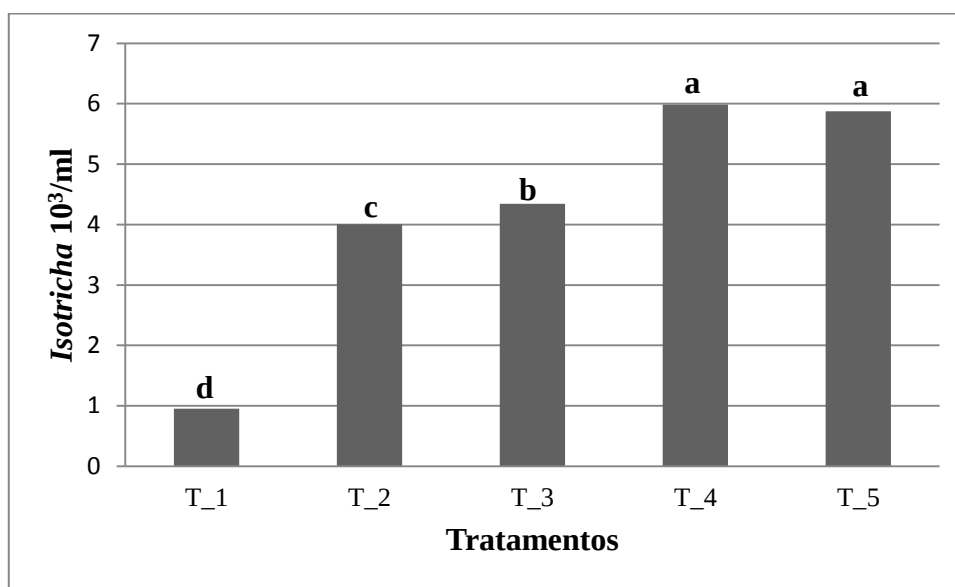
Em relação à população total de protozoários, houve diferenças relevantes na quantidade total de protozoários - contagem por ml ($p < 0.05$), para a interação milho e gordura protegida. Entre as hipóteses disto ter ocorrido é que o aumento da disponibilidade do amido proveniente do melhor processamento, silagem de grão úmido de milho, aliado ao fato de quando se introduz gordura na dieta pode ser estratégico retirando carboidratos, em que esta substituição diminua fermentação ruminal e não diminua o pH deste. Em discordância ao observado por Towne et al. (1990) em que não observaram alteração na quantidade total de protozoários ruminais de bovinos alimentados com dietas com 90% de concentrado contendo 3,5 a 4,0% de gordura de origem animal ou vegetal. Do mesmo modo, Valinote et al. (2005) não observaram efeito do fornecimento de 5% de SCAG (LAC 100) sobre o número de protozoários totais em comparação à dieta controle, sem SCAG.

Especificamente, a defaunação de protozoários poderia reduzir a produção de metano em 20-30% e aumentar a disponibilidade de energia metabolizável para os animais em cerca de 12% (Santra *et al.*, 1994). A eliminação de protozoários ruminais (defaunação) tem aumentado as taxas de crescimento e o ganho médio diário (GMD) dos ruminantes (Newbold et al., 2015). Os protozoários ruminais são produtores de hidrogênio (H_2) e sintetizam principalmente acetato e butirato em vez de propionato. Dessa forma, a defaunação deveria induzir maior proporção de propionato no ambiente ruminal, entretanto esse fenômeno nem sempre é observado (Hegarty et al., 2008), em consonância aos resultados encontrados neste trabalho, em que a população total de protozoários foi menor somente no tratamento T5, entre os tratamentos analisados.

Para o gênero *Isotricha* - Gráfico 1 - os tratamentos, milho seco e milho úmido, quando comparado os tratamentos com e sem gordura protegida (GP+ e GP- respectivamente), houve um aumento para esse gênero de protozoário entre o

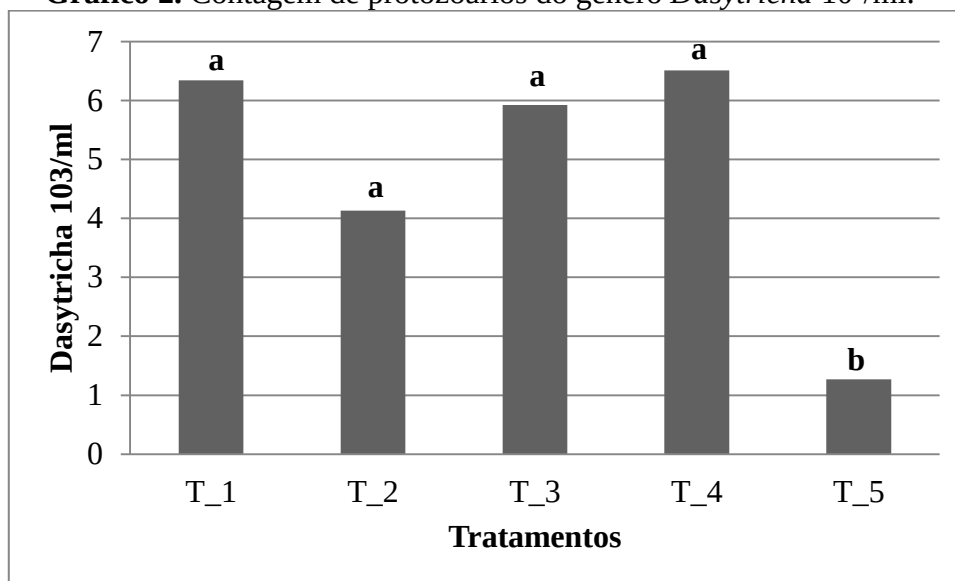
tratamento em que foi adicionado gordura protegida (SCAG); também apresentou maior quantidade de *Isotricha* para o tratamento milho úmido, sendo maior do que em relação ao tratamento milho seco.

Gráfico 1. Contagem de protozoários do gênero *Isotricha* 10³/ml.



Esses resultados podem ser justificados pelo fato de o milho úmido o que pode influenciar a disponibilidade de substratos diferentemente para os protozoários, do que comparado ao milho seco. O milho úmido é conhecido por ter uma maior disponibilidade de amido em comparação com o milho seco. O amido é um importante substrato para a fermentação ruminal e pode promover o crescimento de certos grupos de microorganismos, incluindo protozoários como *Isotricha*.

Para o gênero *Dasytricha* – Gráfico 2, houve uma redução na quantidade deste gênero de protozoário entre os tratamentos com gordura protegida sem Zn e Cr e com Zn e Cr, respectivamente (T4 e T5).

Gráfico 2. Contagem de protozoários do gênero *Dasytricha* 10³/ml.

A população de *Dasytricha* pode ser mais afetada do que outros protozoários, como *Isotricha*, *Entodinium* ou *Diplodinium*, devido a várias razões. Uma delas é a capacidade de degradação de proteínas bacterianas (Firkins et al., 2020). Estudo publicado por Belanche et al., 2012 demonstrou que o gênero *Dasytricha* tem uma capacidade de degradação de proteínas bacterianas significativamente menor do que outros protozoários, como *Diplodinium* e *Entodinium*. Isso significa que *Dasytricha* pode ser menos capaz de se adaptar a mudanças no ambiente ruminal que afetam a disponibilidade de proteínas bacterianas. Todos os ciliados ingerem bactérias como sua principal fonte de aminoácidos e de ácidos nucleicos, sendo que o engolfamento é mais intenso em dietas ricas em grãos (Kozloski, 2010). É importante notar que a resposta de diferentes protozoários a mudanças no ambiente ruminal pode variar dependendo de uma variedade de fatores, incluindo a dieta do ruminante, a presença de outros microorganismos e as condições específicas do ambiente ruminal (Firkins et al., 2020).

Outras possíveis hipóteses são de que o zinco quando adicionado às dietas pode ter um efeito semelhante à monensina, regulando a ingestão de matéria seca pelo animal, onde neste tratamento com a suplementação de zinco também houve uma menor ingestão de FDNfe, de aproximadamente metade do que quando comparado ao tratamento sem a suplementação deste mineral (tratamento 4). Essa menor ingestão de FDNfe, possivelmente provocou menor ruminação e também menor tamponamento no

rúmen, o que pode ter reduzido drasticamente o pH ruminal e ter afetado a população do gênero *Dasytricha*.

Além disso, *Dasytricha* pode ser mais sensível a certos fatores ambientais. Por exemplo, foi observado que o gênero, em estudo publicado por Firkins et al., 2020, ser difícil de manter em culturas de longo prazo, possivelmente devido à necessidade de controlar o excesso de glicogênese. Isso sugere que este gênero pode ter requisitos metabólicos específicos que tornam mais desafiador para este protozoário sobreviver em condições que não são ideais.

No entanto, é importante notar que a resposta dos microorganismos ruminais à suplementação de gordura protegida e ao tipo de processamento do milho na dieta pode variar dependendo de vários fatores, incluindo a espécie do ruminante, a composição geral da dieta e o equilíbrio de outros nutrientes na dieta.

7. CONCLUSÕES

Os dados revelam variações notáveis na população de protozoários ciliados em resposta a diferentes tratamentos. O aumento significativo de *Isotricha* nos tratamentos com gordura protegida, especialmente no milho úmido, sugere uma resposta positiva desse protozoário a esses tipos de tratamento. Em contraste, a população de *Dasytricha* reduziu no tratamento com suplementação de zinco e cromo, indicando sensibilidade desses protozoários a esses minerais. A predominância do gênero *Entodinium*, independentemente do tratamento, está em consonância com achados anteriores. No entanto, devido o assunto ser complexo e depender de diversos fatores interligados que afetam os gêneros de protozoários estudados, são necessárias mais investigações para entender melhor as respostas específicas de cada gênero de protozoário entre tratamentos distintos, visando otimizar a nutrição e o desempenho dos animais ruminantes.

8. RESUMO

Este estudo tem por objetivo avaliar a variação na população de protozoários ciliados em bovinos Nelore confinados, considerando diferentes protocolos nutricionais, além da variação da quantidade de diferentes gêneros desses protozoários. O estudo foi realizado no confinamento experimental da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT), UNESP, campus de Dracena. Utilizando 150 animais Nelore machos, não castrados, provenientes do programa de Certificado Especial de Identificação e Produção (CEIP) e envolveu 30 animais abatidos no início. O delineamento experimental foi em blocos inteiramente casualizados. Cada grupo foi subdividido com base no peso corporal inicial dos animais. Cinco tratamentos foram aplicados, cada um com 6 repetições, envolvendo diferentes processamentos de milho e a inclusão de SCAG. O manejo, arração e cuidado com os animais foram padronizados. O estudo teve duração de 112 dias, com um período de adaptação de 20 dias, envolvendo um protocolo de adaptação em escada. A dieta de terminação foi composta por 84% de ingredientes concentrados, conforme o sistema LRNS. As rações foram ajustadas diariamente baseadas na quantidade de sobra nos cochos. A amostragem incluiu a medição diária do consumo de matéria seca (CMS) e a coleta do conteúdo ruminal após o abate para análises subsequentes. A contagem total e diferencial de protozoários ruminais foi realizada utilizando a técnica da câmara de contagem "Sedgwick-Rafter" e envolveu quatro gêneros: *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium* e a subfamília *Diplodinium*. Os resultados revelaram variações significativas na população de protozoários ciliados em resposta aos diferentes tratamentos. O aumento expressivo de *Isotricha*, especialmente em tratamentos com gordura protegida, sugere uma resposta positiva desse protozoário a esses tipos de tratamento, especialmente no contexto de milho úmido. Em contrapartida, a população de *Dasytricha* diminuiu no tratamento com suplementação de zinco e cromo, indicando a sensibilidade desses protozoários a esses minerais. O gênero *Entodinium* foi o que mais apresentou indivíduos, independentemente ao tratamento analisado, com algumas variações na quantidade, porém sempre em maior número.

Palavras-chaves: bovinos confinados, Nelore, processamento de grãos, SCAG, zinco e cromo, microbiologia do rúmen, protozoários ciliados.

9. ABSTRACT

The study was conducted at the experimental confinement of the University of Agricultural and Technological Sciences (FCAT), UNESP, Dracena campus. Using 150 male Nelore animals, not castrated, from the Special Certificate of Identification and Production (CEIP) program. The experiment followed ethical guidelines and involved 30 animals slaughtered at the beginning. The experimental design was in completely randomized blocks, dividing the animals into two groups based on the parents' DEP's for marbling. Each group was subdivided based on the initial body weight of the animals. Five treatments were applied, each with 6 repetitions, involving different corn processing and the inclusion of SCAG. The management, feeding and care of the animals were standardized. The study lasted 112 days, with a 20-day adaptation period, involving a gradual adaptation protocol. The finishing diet consisted of 84% concentrated ingredients, according to the LRNS system. The rations were daily adjustments based on the amount of leftovers in the troughs. The sampling included daily measurement of dry matter intake (DMI) and collection of ruminal content after slaughter for subsequent analyses. The total and differential count of ruminal protozoa was performed using the "Sedgwick-Rafter" counting chamber technique and involved four genders: *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium* and the *Diplodinium* subfamily. The results revealed significant variations in the population of ciliated protozoa in response to different treatments. The expressive increase of *Isotricha*, especially in treatments with protected fat, suggests a positive response of this protozoan to these types of treatment, especially in the context of wet corn. On the other hand, the population of *Dasytricha* decreased in the treatment with zinc and chromium supplementation, indicating the sensitivity of these protozoa to these minerals. The genus *Entodinium* was the one that presented the most individuals, regardless of the treatment analyzed, with some variations in quantity, but always in greater number.

Keywords: confined cattle, Nelore, grain processing, SCAG, zinc and chromium, rumen microbiology, ciliated protozoa.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES - *BEEF REPORT* 2023. ([s.d.]). Disponível em: <<https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2023-capitulo-02/>> Acesso em 03 de setembro de 2023.

AFERRI, G.; LEME, P.R.; SILVA, S.L. et al. Desempenho e características de carcaça de novilhos alimentados com dietas contendo diferentes fontes de lipídios. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.5, p.1651-1658, 2005.

ARCURI, P. B.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. C. Microbiologia do rúmen. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. de. Nutrição de Ruminantes, Jaboticabal: Funep, p. 111-116, 2006.

ASSOCIAÇÃO DOS CRIADORES DE NELORE DO BRASIL - RAÇA - HISTÓRICO. Disponível em: <<http://www.nelore.org.br/Raca/Historico>>. Acesso em: 13 set. 2023.

BARAJAS, R.; ZINN, R.A. The feeding value of dry-rolled and steam-flaked corn in finishing diets for feedlot cattle: influence of protein supplementation. *Journal of Animal Science*, 76:1744, 1998.

BELANCHE, G. DE LA FUENTE, J. M. MOORBY, C. J. NEWBOLD, Bacterial protein degradation by different rumen protozoal groups, *Journal of Animal Science*, Volume 90, Issue 12, December 2012, Pages 4495–4504, <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5118>.

BERCHIELLI, T. T. Nutrição de Ruminantes. *In: Microbiologia do rúmen*. [S. l.: s. n.], 2011. Cap. 5.

CARVALHO, P.A.; SANCHEZ, L.M.B.; VIEGAS, J. et al. Desenvolvimento de estômago de bezerros Holandeses desaleitados precocemente. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, p.1461-1468, 2003.

COSTA E SILVA, Luiz Fernando; VALADARES FILHO, Sebastião de Campos; ROTTA, Polyana Pizzi; MARCONDES, Marcos Inácio; ZANETTI, Diego; GIONBELLI, Mateus Pies; ENGLE, Terry Eugene; PAULINO, Mário Fonseca. Exigências de minerais para bovinos de corte. In: Br Corte - Exigências nutricionais zebuínos puros e cruzados. 3. ed. Viçosa (MG): UFV, DZO, 2016.

CHALUPA, W.; VECCHIARELLI, B.; ELSE, A.E. et al. Ruminant fermentation in vivo as influenced by long-chain fatty acid. **Journal of Dairy Science**, v.69, n.5, p.1293-1301, 1986.

CLARKE, R.T. Protozoários no ecossistema ruminal. Em: CLARKE, R.T.; BAUCHOP, T. (Ed.). **Ecologia microbiana do intestino**. Nova York: Academic Press, 1977. p.251-275.

DEHORITY, B. A. Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa. Florida: CRC Press Inc. 96p. 1993.

D'AGOSTO, M.; Siqueira, I.C.V.; ESPÍRITO-SANTO, N.B. Comportamento e distribuição de protozoários ciliados (Protista, Ciliophora) no rúmen e no retículo de bovinos submetidos ao jejum. *Revista Brasileira Ciência Veterinária*, 8:16, 2001.

DIAS, A. M., OLIVEIRA, L. B. DE, ÍTAVO, L. C. V., MATEUS, R. G., GOMES, E. N. O., COCA, F. O. DO C. G., ÍTAVO, C. C. B. F., NOGUEIRA, É., MENEZES, B. B. DE, & MATEUS, R. G. (2016). Terminação de novilhos Nelore, castrados e não castrados, em confinamento com dieta alto grão. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal/Brazilian journal of animal health and production*, 17(1), 45–54. <https://doi.org/10.1590/s1519-99402016000100005>

EUCLIDES FILHO, Kepler; CORRÊA, Eduardo Simões; EUCLIDES, Valéria Pacheco Batista. Boas práticas na produção de bovinos de corte. Embrapa Gado de Corte - Campo Grande, 2002. Disponível em: <https://old.cnpgc.embrapa.br/publicacoes/doc/doc129/>. Acesso em 03 de setembro de 2023.

EZEQUIEL, J.M.B. *et. al.*, Quantificação das bactérias sólido-aderidas, bactérias e protozoários líquidos-associados do rúmen de bovinos jovens alimentados com amiréia. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 31-707, 2002.

FRANZOLIN, R.; FRANZOLIN, M. H. População de protozoários ciliados e degradabilidade ruminal em búfalos e bovinos zebuínos sob dieta a base de cana de açúcar. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 29, n. 6, p. 1853-1861, 2000.

FRANZOLIN, R.; ROSALES, FP; SOARES, WVB Efeitos de suplementos dietéticos de energia e nitrogênio na fermentação ruminal e na população de protozoários em bovinos bubalinos e zebuínos. ***Revista Brasileira de Zootecnia***, v.39, p.549-555, 2010.

FIRKINS JL, YU Z, PARK T E PLANK JE (2020) Extending Burk Dehority's Perspectives on the Role of Ciliate Protozoa in the Rumen. *Front. Microbiol.* 11:123. doi: 10.3389/fmicb.2020.00123. :

FOX, D.G.; TEDESCHI, L.O.; TYLUTKI, T.P.; RUSSELL, J.B.; VAN AMBURGH, M.E.; CHASE, 6 L.E.; PELLA, A.N.; OVERTON, T.R. The cornell net carbohydrate and protein system model 7 for evaluating herd nutrition and nutrient excretion. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2004**, 8 112, 29–78.

HAALAND, G.L.; MATSUSHIMA, J.K.; JOHNSON, D.E. *et al.* Effect of replacement of corn by protected tallow in a cattle finishing diet on animal performance and composition. ***Journal of Animal Science***, v.52, n.4, p.696-702, 1981.

HALE, W.H. Influence of processing on the utilization of grains (starch) by ruminants. *Journal of Animal Science*, 37:1075, 1973.

HENRIQUE, W.; LEME, P.R.; LANNA, D.P.D. et al. Avaliação do milho úmido com bagaço de cana ou silagem de milho na engorda de bovinos. 1. Desempenho animal e características de carcaça. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., 1999, Porto Alegre. **Anais**. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1999. p.307.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/busca.html?searchword=rebanho+bovinos>>. Acesso em: 13 set. 2023.

IVAN, M.; MIR, P. S.; KOENIG, K. M. et al. Effects of dietary sunflower seed oil on rumen protozoa population and tissue concentration of conjugated linoleic acid in sheep. *Small Ruminant Research*, v. 41, p. 221-227, 2001.

KOZLOSKI, G. V. (2010). Bioquímica dos Ruminantes. Disponível em <<https://archive.org/details/bioquimica-dos-ruminantes-gilberto-vilmar-Kozloski/page/98/mode/2up?view=theater>> Acesso em 12 /11/2023.

LUCCI, C. DE S., FONTOLAN, V., HAMILTON, T. R., KLU, R., & WICKBOLD, V. (2008). Corn grain: Corn grain processing for ruminants: Apparent and "in situ" digestibility. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 45(1), 35-40. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2008.26718>

LADELY, S.R. *et al.*, Effect of corn hybrid and grain processing method on rate of starch disappearance and performance of finishing cattle. *Journal of Animal Science*, 73:360, 1995.

LOPES, F.C.F. *et al.*, Efeitos da defaunação em ovinos alimentados com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, L.) adicionada de ureia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 54-180, 2002.

MARGARIDO, R. C. C., LEME, P. R., SILVA, S. DA L. E., & PEREIRA, A. S. C. (2011). Níveis de concentrado e sais de cálcio de ácidos graxos para novilhos terminados em confinamento. *Ciencia rural*, 41(2), 330–336. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782011000200025>.

MARTINELE, i., Protozoários ciliados no rúmen de ovinos mestiços mantidos em pastagem natural de caatinga. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9n.2,p.280-292. 2008.

MCALLISTER, T.A. *et. al.* Effect of ruminal microbial colonization on cereal grain digestion. *Canadian Journal of Animal Science*, 70:571, 1990.

McDOWELL, L.R. Minerais para Ruminantes sob Pastejo em Regiões Tropicais Enfatizando o Brasil. Gainesville – University of Florida, 1999. 93p.

McDOWELL, L.R. Minerals in Animal and Human Nutrition. Academic Press, San Diego, C.A. 1992. 524p.

MESSANA, J. D., BERCHIELLI, T. T., ARCURI, P. B., RIBEIRO, A. F., FIORENTINI, G., & CANESIN, R. C. (2012). Effects of different lipid levels on protozoa population, microbial protein synthesis and rumen degradability in cattle. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 34(3), 279-285. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v34i3.12729>

MINATO, H. AND SUTO, T. 1979. Technique for fractionation of bacteria in rumen microbial ecosystems II. Attachment of bacteria isolated from the bovine rumen to starch granules in vitro and elution of bacteria attached therefrom. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 24: 1-76.

MORAN, J. B. 1986. Cereal grains in complete diets of dairy cows: A comparison of rolled barley, wheat and oats and of three methods of processing oats. *Anim. Prod.* 43: 27-36.

MUNDO DO LEITE - RETROSPECTIVA 2018 (PÁG.10 - ED.92). Disponível em: <https://issuu.com/portaldbo/docs/pg_10_69e020a8d7b6c1>. Acesso em: 13 set. 2023.

NAGARAJA, T.G.; TITGEMEYER, E.C. Rumen acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. **Journal of Dairy Science**, v.90 (E. Suppl.), p.E17-E38, 2007.

NGIDI, M.E.; LOERCH, S.C.; FLUHARTY, F.L.; PALMQUIST, D.L. Effects os calcium soaps of long-chain fatty acids on feedlot performance, carcass characteristics and ruminal metabolism of steers. **Journal of Animal Science**, v.68, p.2555-2565, 1990.

NOCEK, J.E.; TAMMINGA, S. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition. *Journal of Dairy Science*, 74:3598, 1991.

NOGUEIRA FILHO, J. C. M.; OLIVEIRA, M. E. M. DE; ABLAS, D. DE S.; TITTO, E. A. L.; TOLEDO, L. R. A. DE; OLIVEIRA, T. S. B. M. DE. Fauna ciliada do rúmen de zebuínos e bubalinos em Pirassununga, São Paulo, Sudeste do Brasil. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 22, p. 663-668, 13 maio 2008.

OBEID, J.A.; PEREIRA, O.G.; PEREIRA, D.H; VALADARES FILHO, S.C.; CARVALHO, I.P.C.; MARTINS, J.M. Níveis de Proteína Bruta em Dietas para Bovinos de corte: consumo, digestibilidade e desempenho produtivo. **Revista Brasileira de Zootecnia** , v.35, n.6, p.2434-2442, 2006.

OWENS, FN; SECRISTA, DS; HILL, WJ et al. Acidose em bovinos: uma revisão. **Journal of Animal Science**, v.76, p.27-286, 1998.

PALMQUIST, D.L. The feeding value of fat. In: PALMQUIST, D.L. (Ed.) **Use of fats in diets for lactating dairy cows**. London: Butterworths, 1984. p.293-311.

POND, W.G.; CHURCH, D.C.; POND, K.R. Basic Animal Nutrition and Feeding. 4 Ed. New York – John Willey and Sons, 1995, p. 353-364.

RUSSELL, J. B. Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition. Ithaca, NY: Cornell University Press. 2002. pg 121.

SILVA, L. G., DETMANN, E., MANTOVANI, H. C., PAULINO, M. F., VALADARES FILHO, S. C., LANA, R. P., ... & CAMPOS, M. M. (2018). Effects of zinc and chromium supplementation on rumen protozoa population and rumen fermentation in steers fed a high-concentrate diet. *Animal Feed Science and Technology*, 235, 8-18.

SILVA, S. DA L. E. et al. Milho grão seco ou úmido com sais de cálcio de ácidos graxos para novilhos Nelore em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 5, p. 1426–1434, 2007.

SILVA, L. G. et al. Use of biometrics in the prediction of body weight in crossbred lambs. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 73 (01), 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9009>. Acesso em: 07 nov. 2023.

SILVESTRE, A. M., & MILLEN, D. D. (2021). The 2019 Brazilian survey on nutritional practices provided by feedlot cattle consulting nutritionists. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 50. <https://doi.org/10.37496/rbz5020200189>

SPEARS, J.S; KEGLEY, E. B. Effect of zinc and manganese methionine on performance of beef cows and calves. *Journal of Animal Science*, 1991.

VALINOTE, A.C.; NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; LEME, P.R. et al. Fontes de lipídeos e monensina na alimentação de novilhos Nelore e sua relação com a população de protozoários ciliados do rúmen. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.4, p.1418-1423, 2005.

TOWNE, G.; NAGARAJA, T. G.; BRANDT JR., R. T.; KEMP, K. E. Ruminal ciliated protozoa in cattle fed finishing diets with or without supplemental fat. *Journal of Animal Science*, v. 68, n. 7, p. 2150-2155, 1990.

WILLIAMS, A.G. Rumen holotrich ciliate protozoa. *Microbiology Reviews*, 50-25, 1986.

WILLIAMS, A.G. & G.S. COLEMAN. *The Rumen Protozoa*. London: **Springer-Verlag**, New York Inc, 423 p. 1992.