

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

USO DE LEVEDURAS VIVAS (*Saccharomyces cerevisiae*) E
MANANOLIGOSSACARÍDEOS EM DIETAS À BASE DE
GRÃOS PARA RUMINANTES

Autora: Tatiana García Díaz
Orientador: Prof. Dr. Antonio Ferriani Branco
Co- orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu Dos Santos

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro – 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

USO DE LEVEDURAS VIVAS (*Saccharomyces cerevisiae*) E
MANANOLIGOSSACARÍDEOS EM DIETAS À BASE DE
GRÃOS PARA RUMINANTES

Autora: Tatiana García Díaz
Orientador: Prof. Dr. Antonio Ferriani Branco
Co- orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu Dos Santos

“Tese apresentada, como parte das exigências para a obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de concentração: Produção Animal.”

MARINGÁ
Estado do Paraná
Fevereiro- 2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR, Brasil)

G216u García Díaz, Tatiana
 Uso de leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*)
 e mananoligossacarídeos em dietas à base de grãos
 para ruminantes / Tatiana García Diaz. -- Maringá,
 PR, 2017.
 62 f. : il. tabs.

 Orientador: Prof. Dr. Antonio Ferriani Branco.
 Co-orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos
 Santos.

 Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
 Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento
 de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em
 Zootecnia, 2017.

 1. Ruminantes - Nutrição. 2. Acidose ruminal -
 Ruminantes - Dieta. 3. Lipopolisacarídeos -
 Ruminantes - Dieta. 4. Oligossacarídeos - Ruminantes
 - Dieta. 5. Probióticos - Ruminantes - Dieta. I.
 Branco, Antonio Ferriani, orient. II. Universidade
 Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias.
 Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação
 em Zootecnia. III. Título.

CDD 23.ed. 636.0852

MRP-003574



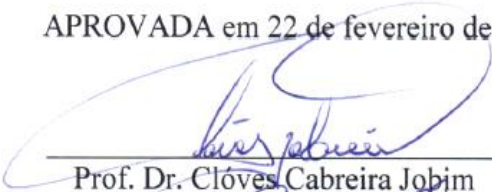
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**USO DE LEVEDURAS VIVAS (SACCHAROMYCES
CEREVISIAE) E MANANOLIGOSSACARÍDEOS
EM DIETAS À BASE DE GRÃOS PARA RUMINANTES**

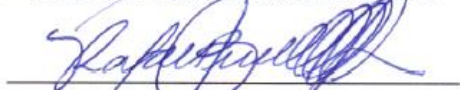
Autora: Tatiana Garcia Diaz
Orientador: Prof. Dr. Antonio Ferriani Branco

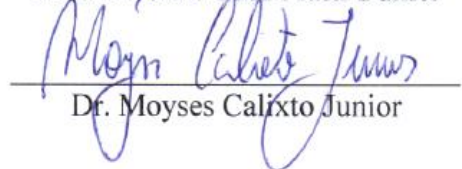
TITULAÇÃO: Doutora em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

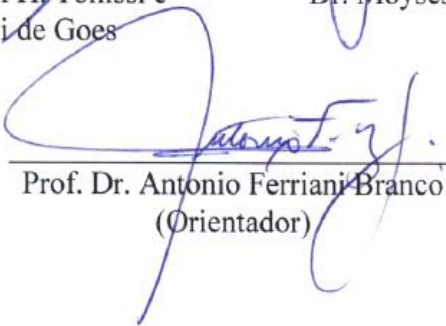
APROVADA em 22 de fevereiro de 2017.


Prof. Dr. Clóves Cabreira Jobim


Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel


Prof. Dr. Rafael H. Tonissi e
Buschenelli de Goes


Dr. Moyses Calixto Junior


Prof. Dr. Antonio Ferriani Branco
(Orientador)

“... O segredo é ter muita fé para seguir em frente, mais coragem para enfrentar os obstáculos e a certeza que quando os nossos sonhos são movidos por amor, a vitória não demora a chegar...”

Anônimo

A minha Avó,

Laura Rosa Paez (*in memoriam*)

Apesar de não estar presente hoje, sinto um enorme amor e gratidão por todos os ensinamentos e cuidados de tantos anos.

Aos meus pais,

Carlos Júlio García e Jabeth Diaz

Aos meus pais por que sempre me ofereceram o melhor através dos ensinamentos e a formação. Por que mesmo distantes mantiveram-se do meu lado com amor, incentivando-me para continuar a cada dia apesar dos obstáculos.

A minha irmã,

Lorena García Díaz

Por estar sempre junto a mim, pela compreensão e amizade.

Ao meu namorado,

Iván Camilo Ospina Rojas

Porque sempre se manteve ao meu lado, brindando todo o apoio, amor, compreensão, cumplicidade e grande ajuda.

Com muito carinho

DEDICO!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela vida e coisas maravilhosas que me foram concedidas. Pela saúde e amparo em todos os momentos e principalmente por colocar em meu caminho pessoas maravilhosas e especiais que acompanharam todo meu processo de formação;

Ao Programa Estudantes-Convênio de Pós-Graduação – PEC-PG, CAPES/CNPq – Brasil, pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá pelo acolhimento e oportunidade de realizar meus estudos de Mestrado e Doutorado;

Ao Prof. Dr. Antonio Ferriani Branco, pela orientação e sua valiosa influencia na minha formação, pela dedicação e confiança depositada em mim;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Zootecnia por contribuir com minha formação acadêmica. Em especial ao Professor Dr. Luís Paulo Rigolon, pela disposição e apoio na realização das cirurgias nos animais, e especialmente pela amizade. Ao Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos, Prof. Dr. Clóves Cabrera Jobim, Prof^a. Dr. Eliane Gaparino, a Prof^a. Tatiana Carlesso Dos Santos e o Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel, pelos ensinamentos e ajuda na realização do meu trabalho.

As minhas amigas Silvana Teixeira e Ana Lucia Teodoro, pelo carinho e amizade sincera, pelos conselhos e dedicação, nunca medindo esforços para me ajudar. Foram essenciais para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus colegas de trabalho do grupo de pesquisa em nutrição de ruminantes Rosiane Turci, Karoline Guimaraes, Diego Cordeiro de Paula, Andrés Felipe Pachón, Susane Ângelo, Andrei Costa, Alessandra Gonçalves, Giovana Oliveira e Jennifer Braga pela amizade e convívio nas jornadas de trabalho.

Ao grupo de estudos em silagem e feno (GESF), ao Fernando Jacovaci, Angélica Khatlab, Elenice Reis Goes, Isabelle Naemi Kaneko e Talita Zunino pela disposição e ajuda na realização do experimento a campo e análises de laboratório. A ajuda de vocês foi indispensável e agradeço de coração.

Ao Denílson dos Santos Vicentin, secretário do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, pela ajuda, paciência e amizade.

Aos funcionários do LANA (Laboratório de Análises de Alimentos - UEM) Osvaldo Tarelho, Augusto e Creuza Souza Azevedo, pela grande ajuda na condução do meu experimento.

Aos funcionários da FEI (Fazenda Experimental de Iguatemi - UEM) o Wilson Marsola, Vicente Faleiros, Cedinho, Célio Passolongo, Toninho (Fábrica), pela disposição em colaborar com tudo que precisei;

Aos meus amigos colombianos Duvan Ocampo, Viviana Ramirez, Nery Huertas e Sandra Cifuentes, pelo convívio de tantos anos, por que apesar da distância nossa amizade se fortalece a cada dia. Obrigada por fazer parte da minha vida.

A todos os que de uma ou outra maneira contribuíram com a culminação deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

BIOGRAFIA

TATIANA GARCÍA DÍAZ, filha de Carlos Júlio García Rodríguez e Jabeth Emília Díaz Páez, nasceu na cidade de Ibagué - Tolima, Colômbia, no dia 20 de fevereiro de 1987.

Cursou os estudos de ensino médio no Colégio Exalumnas de la Presentación - Ibagué - Tolima, concluindo no ano 2003.

Em fevereiro de 2005 iniciou o curso de graduação em Medicina Veterinária e Zootecnia na Universidad del Tolima, concluindo em janeiro de 2011.

Em março de 2011, iniciou estudos em nível de Mestrado, e em abril de 2013 obteve o título de Mestre em Produção Animal, pelo Programa de Pós-graduação em Zootecnia, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Nutrição de Ruminantes.

Em abril de 2013 ingressou no Doutorado em Produção Animal do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá e no dia 30 de março de 2016 submeteu-se ao exame de qualificação.

No dia 22 de fevereiro de 2017, submeteu-se a banca para defesa da Tese de Doutorado.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiv
I INTRODUÇÃO.....	1
1. Acidose ruminal subaguda.....	1
2. Aditivos alimentares para a prevenção de acidose ruminal subaguda ...	7
2.1 Probiótico: Leveduras vivas <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
2.2 Prebiótico: Mananoligossacarídeos (MOS)	12
2.3 Associação de aditivos (Leveduras vivas + MOS)	15
II REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
III OBJETIVOS GERAIS	22
3.1 Objetivos específicos.....	22
IV. Inclusão de leveduras vivas e mananoligossacarídeos em dietas à base de grãos para bovinos: parâmetros ruminais, digestibilidade dos nutrientes e resposta inflamatória.....	23
RESUMO.....	23
ABSTRACT.....	24
INTRODUÇÃO.....	25
MATERIAL E MÉTODOS.....	26
RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

V. Inclusão de leveduras vivas e mananoligossacarídeos em dietas à base de grãos para ovinos: desempenho, resposta inflamatória e morfologia ruminal.....	43
RESUMO.....	43
ABSTRACT.....	44
INTRODUÇÃO.....	45
MATERIAL E MÉTODOS.....	46
RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62

LISTA DE TABELAS

	Página
IV- Inclusão de leveduras vivas e mananoligossacarídeos em dietas à base de grãos para bovinos: parâmetros ruminais, digestibilidade dos nutrientes e resposta inflamatória.....	23
Tabela 1. Composição das dietas experimentais (g kg ⁻¹ de matéria seca)	26
Tabela 2. Consumo, fluxo duodenal, fluxo fecal, coeficiente de digestibilidade aparente ruminal (CDR), coeficiente de digestibilidade aparente intestinal (CDI) e coeficiente de digestibilidade aparente total (CDT), da MS, MO, PB, FDN _{cp} , EE e CNF de bovinos alimentados com dieta à base de grãos suplementados com leveduras vivas <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e mananoligossacarídeos (MOS)	30
Tabela 3. Características da fermentação ruminal de bovinos alimentados com dieta à base de grãos suplementados com leveduras vivas <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e mananoligossacarídeos (MOS)	32
Tabela 4. Valores de pH ruminal e amônia (NH ₃) de bovinos alimentados com dieta à base de grãos suplementados com leveduras vivas <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e mananoligossacarídeos (MOS)	33
Tabela 5. Lipopolissacarídeos (LPS) em rúmen, duodeno e plasma de bovinos alimentados com dieta à base de grãos suplementados com leveduras vivas <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e mananoligossacarídeos (MOS)	36
Tabela 6. Soro amiloide A (SAA) e haptoglobina (Hp) plasmáticas de bovinos alimentados com dieta à base de grãos suplementados com leveduras vivas <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e mananoligossacarídeos (MOS)	37
Tabela 7. Quadro hematológico de bovinos alimentados com dieta à base de grãos suplementados com leveduras vivas <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e mananoligossacarídeos (MOS)	38

V- Inclusão de leveduras vivas e mananoligossacarídeos em dietas à base de grãos para ovinos: desempenho, resposta inflamatória e morfologia ruminal.....	43
Tabela 1. Composição das dietas experimentais (g kg ⁻¹ de matéria seca)	47
Tabela 2. Desempenho de ovinos alimentados com dieta à base de grãos e suplementados com leveduras vivas <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , mananoligossacarídeos (MOS) e a associação dos aditivos (leveduras vivas + MOS)	51
Tabela 3. Rendimentos das carcaças de ovinos alimentados com dieta à base de grãos suplementados com leveduras vivas <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , mananoligossacarídeos (MOS) e a associação dos aditivos (leveduras vivas + MOS).	52
Tabela 4. Valores de pH ruminal, amônia (NH ₃) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), de ovinos alimentados com dieta de alto grão suplementados com leveduras vivas <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , mananoligossacarídeos (MOS) e a associação dos aditivos (leveduras vivas + MOS)	53
Tabela 5. Lipopolissacarídeos (LPS), soro amiloide A (SAA) e haptoglobina (Hp) em ovinos alimentados com dieta à base de grãos suplementados com leveduras vivas <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , mananoligossacarídeos (MOS) e a associação dos aditivos (leveduras vivas + MOS)	55
Tabela 6. Parâmetros morfológicos das papilas ruminais de ovinos alimentados com dieta à base de grãos suplementados com leveduras vivas <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , mananoligossacarídeos e a associação dos aditivos (leveduras vivas + MOS)	56
Tabela 7. Incidência e severidade de abscessos hepáticos em ovinos alimentados com dieta à base de grãos com inclusão de com leveduras vivas <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , mananoligossacarídeos (MOS) e a associação dos aditivos (leveduras vivas + MOS)	57

RESUMO

Dois experimentos foram conduzidos com o objetivo de avaliar os efeitos da inclusão de leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*) e/ou mananligossacarídeos (parede celular das leveduras, MOS) em suplementos, sobre os parâmetros ruminais, a digestibilidade dos nutrientes, o desempenho, a morfologia ruminal e a resposta inflamatória de bovinos e ovinos alimentados com dieta à base de grãos. No experimento I, foram utilizados três bovinos machos castrados, da raça Holandesa, com peso corporal médio de 497 ± 3 kg, providos de cânulas ruminal e duodenal. O delineamento experimental utilizado neste experimento foi Quadrado Latino 3x3. Os animais foram mantidos em sistema de confinamento, alimentados *ad libitum*, com rações constituída por 5% de bagaço de cana e 95% de concentrado. Os tratamentos experimentais foram: controle (sem aditivo); $1,5 \text{ g kg}^{-1}$ MS de leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae* – NCYC 996 -10^{10} UFC g^{-1}) e $1,5 \text{ g kg}^{-1}$ MS de mananligossacarídeos (MOS, 460 g kg^{-1} de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*). O consumo de matéria seca (MS), os coeficientes de digestibilidade aparente ruminal, intestinal e total da MS, da matéria orgânica (MO), da proteína bruta (PB), da fibra em detergente ácido corrigida para proteína (FDNcp), do extrato etéreo (EE) e dos carboidratos não fibrosos (CNF) não foram influenciados pelos tratamentos ($P > 0,05$). As concentrações molares de ácido isobutírico no rúmen aumentaram ($P \leq 0,05$) com a adição das leveduras vivas e MOS na dieta. A concentração molar do ácido isovalérico aumentou ($P \leq 0,05$) apenas com a adição de leveduras vivas, mas diminuiu ($P \leq 0,05$) com a adição de MOS. A adição de leveduras vivas e MOS na dieta dos animais aumentou ($P \leq 0,05$) o pH ruminal e reduziu ($P \leq 0,05$) as concentrações médias de NH_3 de 16,47 para 14,47 e 13,43 mg dL^{-1} , respectivamente. As concentrações de lipopolisacarídeos (LPS) livres no rúmen e no fluido duodenal não foram influenciadas pelos tratamentos ($P \leq 0,05$). Mas, os aditivos reduziram as concentrações plasmáticas de LPS e soro amiloide A (SAA). O eritograma

apresentou valores normais, contudo, no leucograma, foi observada leucocitose e linfocitose, porém, sem efeito dos tratamentos ($P>0,05$). No experimento II, foram utilizados 32 ovinos mestiços Dorper x Santa Inês, com peso médio de 24 ± 2 kg. Os animais foram mantidos em sistema de confinamento, e alimentados *ad libitum*, com uma dieta contendo grão inteiro de milho (765 g kg^{-1}), concentrado (145 g kg^{-1} ; farelo de soja, ureia, um suplemento mineral) e silagem de milho (9 g kg^{-1}). Os animais foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e oito repetições. Os tratamentos utilizados foram: controle (sem aditivo); 2 g kg^{-1} MS de leveduras vivas; 2 g kg^{-1} MS de MOS e a combinação de 2 g kg^{-1} MS de leveduras vivas + 2 g kg^{-1} MS de MOS. A levedura viva utilizada foi a *Saccharomyces cerevisiae*-NCYC 996 (10^{10} UFC g^{-1} , LeSaffre®) e o MOS utilizado continha 460 g kg^{-1} parede celular de leveduras. O consumo de matéria seca (CMS), os parâmetros de desempenho e o rendimento de carcaça não foram influenciados ($P>0,05$) pelos tratamentos. A suplementação com MOS e a combinação de leveduras vivas e MOS resultaram em aumento ($P\leq 0,05$) do pH ruminal, enquanto as concentrações totais de AGCC no rúmen foram maiores ($P\leq 0,05$) apenas nas dietas que continham leveduras vivas e MOS. Foi observada redução nas concentrações de NH_3 ruminal ($P\leq 0,05$) dos animais que foram suplementados com leveduras vivas ($29,45 \text{ mg dL}^{-1}$), MOS ($24,93 \text{ mg dL}^{-1}$) e a associação dos aditivos ($28,14 \text{ mg dL}^{-1}$), comparados com o tratamento controle ($36,54 \text{ mg dL}^{-1}$). O uso de leveduras vivas, MOS e a combinação dos dois aditivos reduziu a concentração de LPS no plasma, com valores de 0,46; 0,44 e 0,04 EU mL^{-1} , respectivamente, em comparação com o controle ($0,93 \text{ EU mL}^{-1}$). A adição de MOS na dieta resultou em menor espessura total de epitélio ruminal ($P\leq 0,05$) que as dietas suplementadas com leveduras, enquanto que a espessura da camada córnea foi menor com a adição de MOS e leveduras vivas + MOS, quando comparado com o controle. A suplementação de levedura viva *Saccharomyces cerevisiae* (10^{10} UFC g^{-1}) e mananoligossacarídeos (MOS; 460 g kg^{-1}), nas doses avaliadas nos dois trabalhos ($1,5$ e 2 g kg^{-1} MS), em dietas à base de grãos aumentam os valores de pH ruminal e reduzem as concentrações de amônia, além de diminuir a intensidade da acidose ruminal subaguda, reduzindo, principalmente a translocação de lipopolissacarídeos à corrente sanguínea, a ocorrência de hiperqueratose ruminal e a aparição de abscessos hepáticos.

Palavras-chave: acidose ruminal, lipopolissacarídeos, oligossacarídeos, prebióticos

ABSTRACT

Two experiments were carried out to evaluate the live yeast *Saccharomyces cerevisiae* and/or mannanoligosaccharides, yeast cell wall, (MOS) supplementation on ruminal fermentation, nutrient digestibility, performance, ruminal morphology and inflammatory response of cattle and sheep fed high-grain diets. In the experiment I, three Holstein steers, with mean body weight of 497±3 kg, with ruminal and duodenal cannulas were used. The experimental design was a 3x3 Latin square. The animals were housed in individual pens, receiving diet *ad libitum* contained 5% forage and 95% concentrate. The treatments were control (no additive), 1.5 g kg⁻¹ DM live yeast (*Saccharomyces cerevisiae* - NCYC 996- 10¹⁰ CFU g) and 1.5 g kg⁻¹ DM MOS (MOS, 460 g kg⁻¹ yeast cell wall *Saccharomyces cerevisiae*). The dry matter intake (DM), apparent ruminal, intestinal and total digestibility coefficients of DM, organic matter (OM), crude protein (CP), protein corrected acid detergent fiber (NDFcp), extract ethereal (EE) and non-fibrous carbohydrates (NFC) were not influenced by treatments (P>0.05). The molar concentrations of isobutyric acid in the rumen increased (P≤0.05) with the addition of live yeasts and MOS in diet. The molar concentration of isovaleric acid increased (P≤0.05) only with the addition of live yeasts, but decreased (P≤0.05) with addition of MOS. The addition of live yeasts and MOS in the animals' diet increased (P≤0.05) the ruminal pH and reduced (P≤0.05) the mean concentrations of NH₃ from 16.47 to 14.47 and 13.43 mg dL⁻¹, respectively. Concentrations of free lipopolysaccharide (LPS) in rumen and duodenal fluid were not influenced by treatments (P>0.05). However, the additives reduced (P≤0.05) the plasma concentrations of LPS and serum amyloid A (SAA). The erythrogram showed normal values, however, in the leukogram, leukocytosis and lymphocytosis were observed, however, without effect of the treatments (P>0.05). In the experiment II, 32 crossbred sheep Dorper x Santa Inês, with average body weight of 24±2 kg was housed in

individual pens, received diet *ad libitum*, based on whole corn grain (765 g kg⁻¹), concentrate (145 g kg⁻¹; soybean meal, urea, mineral supplement and additive, probiotic and/or prebiotic) and corn silage (90 g kg⁻¹). The animals were distributed in a completely randomized design with four treatments and eight repetitions. The treatments were control (no additive), 2 g kg⁻¹ DM live yeast, 2 g kg⁻¹ DM MOS and the combination containing 2 g kg⁻¹ DM live yeast + 2 g kg⁻¹ DM MOS. The live yeast used was *Saccharomyces cerevisiae* - NCYC 996- contained 10¹⁰ CFU g, and the MOS (LeSaffre®) contained 460 g kg⁻¹ DM yeast cell wall. The dry matter intake (DMI), performance parameters and carcass yield were not affected (P>0.05) by additives in the diet. Supplementation with MOS and the combination of live yeasts and MOS resulted in an increase (P≤0.05) in ruminal pH, while total concentrations of ruminal motility were higher (P≤0.05) only in diets containing live yeasts and MOS. There was a reduction in ruminal NH₃ concentrations (P≤0.05) of the animals supplemented with live yeasts (29.45 mg dL⁻¹), MOS (24.93 mg dL⁻¹) and the combination of the additives (28.14 mg dL⁻¹) compared with the control treatment (36.54 mg dL⁻¹). The use of live yeast, MOS and the combination of the two additives reduced the plasma LPS concentration, with values of 0.46; 0.44 and 0.04 EU mL⁻¹, respectively, compared to the control (0.93 EU mL⁻¹). The addition of MOS in diet resulted in a lower total ruminal epithelial thickness (P≤0.05) than diets supplemented with yeasts, whereas the thickness of the corneous layer was lower (P≤0.05) with the addition of MOS and live yeast + MOS than control treatment. The supplementation of live yeast *Saccharomyces cerevisiae* (10¹⁰ CFU g) and mannanoligosaccharides (MOS, 460 g kg⁻¹) in the grain-based diets at the doses evaluated in the two studies (1.5 and 2 g kg⁻¹ MS) increase ruminal pH values and reduce ammonia concentrations, as well as reduce the intensity of subacute ruminal acidosis, mainly reducing lipopolysaccharide translocation to the bloodstream, the occurrence of ruminal hyperkeratosis and the appearance of hepatic abscesses.

Key words: lipopolysaccharide, oligosaccharides, prebiotics, probiotics, ruminal acidosis

I- INTRODUÇÃO

A maximização da renda líquida e a redução no tempo de retorno do capital faz parte das metas de pecuaristas e técnicos, e tem levado a pecuária de corte a intensificar seus sistemas de produção. No entanto, esses agentes não podem perder de vista a competitividade, a sustentabilidade e a produção de produtos de qualidade. O confinamento é uma das práticas desses sistemas mais intensivos e, no Brasil, tem crescido consideravelmente, pois traz inúmeras vantagens, como o aumento da lotação e do estoque de gado, permitindo aproveitar melhor as áreas de pastagens e diversificar a produção, favorecendo o aumento da produtividade (Claudino et al., 2013).

Um dos fatores ligados à produção de animais confinados que tem maior peso no custo de produção é a alimentação. No Brasil, os confinamentos mais profissionalizados tem adotado dietas com menor utilização de volumosos e maiores quantidades de concentrados, principalmente à base de grãos (González et al., 2012). Isso se deve ao fato de que os alimentos concentrados são armazenados, processados e manuseados com maior facilidade. Além disso, pela maior concentração de energia, permitem aumentar o ganho de peso, melhorando a eficiência alimentar e reduzindo o tempo de confinamento (Krause e Oetzel, 2006; Chang et al., 2015). No entanto, essas dietas requerem maior atenção, uma vez que, os desafios associados a esses planos nutricionais são maiores, pois contribuem com o desenvolvimento de distúrbios digestivos, como a acidose ruminal aguda ou subaguda (Krause e Oetzel, 2006; Calsamiglia et al., 2012; Chang et al., 2015).

1. Acidose ruminal subaguda

A acidose ruminal é uma condição patológica associada a elevadas concentrações de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ácido lático no rúmen, provocando a queda

do pH ruminal para níveis abaixo de 6, prejudiciais aos microrganismos (Krause e Oetzel, 2006; Calsamiglia et al., 2012).

Dietas ricas em concentrado (grão de cereais e subprodutos) normalmente apresentam maior concentração de carboidratos não fibrosos, maior fermentabilidade, e favorecem o aumento das concentrações dos AGCC muito rapidamente no rúmen (Owens e Goetsch, 1993; Pacheco e Cruz, 2015). Quando o acúmulo desses ácidos no rúmen excede a taxa de remoção (absorção pelo epitélio ruminal e passagem com a fase líquida), ocorre queda acentuada do pH ruminal, diminuindo, simultaneamente, a capacidade de tamponamento do rúmen, reduzindo a eficiência da flora microbiana e, conseqüentemente, do processo de fermentação ruminal. Tais mudanças têm impactos muito negativos no desempenho produtivo do animal (Kleen et al., 2003; Krause e Oetzel, 2006; Fernando et al., 2010).

A acidose ruminal aguda e a subaguda são dois distúrbios com etiologia semelhante, mas são clinicamente diferentes. Durante a acidose ruminal aguda, frequentemente, as conseqüências são fatais quando o pH ruminal cai abaixo de 5,0. Os animais não adaptados às dietas à base de grãos, particularmente, são os mais suscetíveis à acidose ruminal de tipo agudo. Provavelmente devido à falta de desenvolvimento das papilas ruminais, que permitam maior absorção dos AGCC, e à escassez de bactérias utilizadoras de lactato no meio ambiente ruminal (Enemark et al., 2002; Krause e Oetzel, 2006).

A progressão patológica da acidose ruminal aguda inclui altas concentrações de ácido láctico no rúmen, desidratação, rumenite e acidose metabólica (Owens et al., 1998). Nesse caso, os animais apresentam sinais clínicos como anorexia, dor abdominal, taquicardia, taquipnéia, diarreia, letargia, distensão abdominal, andar cambaleante, decúbito e morte (Krause e Oetzel, 2006).

No caso de acidose ruminal subaguda os valores de pH normalmente observados ficam abaixo de 5,8 por períodos superiores a 5,4 h dia⁻¹ (Zebeli et al., 2008). Os impactos negativos da acidose subaguda em bovinos confinados estão relacionados aos seus efeitos sobre o consumo, o metabolismo dos nutrientes e saúde animal (Gómez et al., 2014).

O controle do pH ruminal tem um papel primordial no processo de fermentação no rúmen, o qual depende de quatro fatores fundamentais, a produção de AGCC, a eliminação dos mesmos por meio da absorção pela parede ruminal, o fluxo com a fase

líquida para o omaso e a capacidade de tamponamento do meio (Calsamiglia et al., 2012).

Os AGCC podem ser absorvidos de forma passiva ou ativa através da parede ruminal e a taxa de absorção depende da concentração, do pK_a e do tamanho da molécula (Kozloski, 2011). Quando os AGCC estão na forma ionizada, são absorvidos como ânion por difusão facilitada na troca por íons bicarbonato com o fluido ruminal. Por outro lado, quando os AGCC se encontram no estado não ionizados são absorvidos por difusão passiva, sem gasto de energia. O pK_a dos AGCC é superior a 4,7 e, a medida que o pH do rúmen se aproxima desse valor (pK_a 4,7), aumenta a proporção de AGCC na forma não ionizada, aumentando sua taxa de absorção (Enemark et al., 2002; Kozloski, 2011).

A absorção dos AGCC contribui para a manutenção do pH perto da neutralidade devido a secreção de bicarbonato no rúmen. Cerca de 50% do bicarbonato presente no rúmen vêm da saliva, durante a alimentação e ruminação, enquanto que os outros 50% vêm da absorção ativa dos AGCC (Owens et al., 1998). No entanto, dietas ricas em concentrado, tendem a reduzir a produção de saliva e bicarbonato que tamponam o rúmen. Assim, com a capacidade de tamponamento reduzida, combinada com um aumento da produção de AGCC, aumenta a incidência de acidose ruminal (Krause e Oetzel, 2006).

Da mesma forma, se a mucosa ruminal não está adaptada e a superfície de absorção é menor, ocorrerá dificuldade para absorver a alta concentração de AGCC no meio ruminal, favorecendo a queda do pH (Nordlund et al., 1995). A queda no pH ruminal implica em intensas modificações no ecossistema microbiano, tais como a redução na população de bactérias celulolíticas, com a conseqüente redução da degradação dos carboidratos estruturais, e morte de bactérias Gram-negativas, mudanças que podem ocorrer em menos de 24 horas. Além disso, o ambiente ácido do rúmen favorece o crescimento de bactérias amilolíticas como a *Streptococcus bovis*, a qual libera ácido lático como produto final de fermentação (Calsamiglia et al., 2012). Concomitantemente, há inibição dos microrganismos consumidores de lactato como *Megaspera elsdenii* e *Selenomonas ruminantium*, bactérias chave no controle do ácido lático produzido no rúmen (Fernando et al., 2010).

O ácido lático pode causar redução muito mais acentuada do pH ruminal ($\leq 5,0$) devido ao seu pK_a inferior (3,08) em comparação com o pK_a dos AGCC ($>4,7$) (Krause e Oetzel, 2006). Não obstante, se houver um período de adaptação, além de um

equilíbrio entre as bactérias produtoras e utilizadoras de ácido lático, é possível que a concentração deste ácido no rúmen permaneça baixa (acidose ruminal subaguda) (Gozho et al., 2005; Calsamiglia et al., 2012).

A morte de bactérias sensíveis ao baixo pH pode desencadear a liberação de componentes da parede celular, presente nas bactérias Gram-negativas, como os lipopolissacarídeos (LPS) ou endotoxinas, compostos tóxicos para o hospedeiro (Andersen, 2003; Gómez, et al., 2014; Chang et al., 2015). De forma geral, os LPS são moléculas de grandes dimensões constituídas de um lipídio A, um polissacarídeo (antígeno O) e um núcleo. A passagem dos LPS para a corrente sanguínea provoca um forte estímulo ao sistema imunitário dos animais, promovendo uma resposta inflamatória, que têm efeitos sistêmicos e afetam o desempenho produtivo do animal (Andersen, 2003; Gozho et al., 2005; Khafipour et al., 2009; Gómez et al., 2014).

O mecanismo de translocação dos LPS do rúmen para a circulação periférica ainda não está completamente esclarecido. Mas, tem sido sugerido que a translocação acontece através da mucosa ruminal, causada pela alta osmolaridade (255 a 402 mOsm L⁻¹) e pela ruminitis, inflamação e ruptura das papilas ruminais ocasionada pelos ácidos orgânicos (Gómez et al., 2014). Porém, Khafipour et al. (2009) demonstraram que não há correlação entre a concentração de LPS no rúmen e a severidade da acidose ruminal, assim como, do grau de inflamação em bovinos da raça Holandesa. Além disso, estes autores justificam que o rúmen apresenta uma estrutura histológica complexa, pelo que pode ser impermeável aos LPS em condições fisiológicas, a menos que sofra uma considerável lesão na integridade do tecido.

Chin et al. (2006) observaram que a presença dos LPS no lúmen intestinal pode induzir a apoptose das células, resultando em ruptura e inflamação do epitélio (Chang et al., 2015). Além disso, há aumento na produção de óxido nítrico, ocasionando aumento da permeabilidade da mucosa e o fluxo sanguíneo com entrada de células inflamatórias (Chaucheyras-Durand et al., 2012; Gómez, et al., 2014). Também têm sugerido que a translocação dos LPS ocorre principalmente no intestino (Gomez et al., 2014).

Os LPS também podem ser transportados para a circulação sanguínea através de um mecanismo facilitado por ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (por exemplo, ácido oleico) na formação de quilomícrom pelas células epiteliais intestinais (Goshal et al., 2009).

Quando os LPS atingem a circulação sanguínea desencadeiam a produção de proteínas de fase aguda (PFA), sendo as mais importantes a proteína de ligação a

lipopolisacarídeos (LBP), haptoglobina (Hp), soro amilóide A (SAA) e a proteína C reativa (CRP) (Gozho et al., 2005; Chang et al., 2015). As PFA são formadas no fígado como resposta do animal a perturbações na homeostase causada por infecção, lesão de tecidos, crescimento neoplásico ou distúrbios imunológicos (Andersen, 2003; Gómez, et al., 2014).

A função da LBP é facilitar a remoção de endotoxinas (LPS) do sangue, transportando-as para os macrófagos quando as toxinas estão em baixa concentração. Desta forma, os LPS se ligam às LBP, para serem transportados para o fígado, onde são detectados pelos receptores, *Toll*-receptor tipo 4 (TLR -4) e o grupamento de diferenciação 14 (CD14 - *cluster of differentiation*) (Dobrovolskaia e Vogel, 2002). A união com estes receptores estimula os macrófagos hepáticos (células de *Kupffer*) e outras células fagocíticas a enviar sinais que ativam a liberação de citocinas, tais como, o óxido nítrico (NO), fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-1 (IL-1) (Elsasser et al., 2008). Estas citocinas são importantes nas fases iniciais porque ajudam a mediar a reparação dos tecidos e à resolução da infecção, além de estimular a produção das mencionadas, proteínas da fase aguda (Andersen, 2003).

A Hp é uma glicoproteína plasmática que ocorre durante a fase aguda da inflamação e, sua principal função é ligar-se à hemoglobina (Hb) livre no plasma, evitando que as bactérias translocadas à circulação, utilizem o ferro ligado à hemoglobina (González et al., 2010).

A CRP é parte do sistema imune inato e pertence à família das pentraxinas. Sua principal função é de se ligar à fosfocolina, permitindo o reconhecimento de patógenos ou constituintes fosfolipídicos de células danificadas. Já a SAA, é uma apolipoproteína de alta densidade (HDL), sintetizadas pelo fígado ou mucosa intestinal e liberadas para a circulação sanguínea no curso de uma doença inflamatória crônica de qualquer etiologia infecciosa ou não infecciosa (Gómez, et al., 2014).

A SAA, a Hp e a CRP são utilizadas como indicadores de inflamação em estudos de indução a acidose ruminal subaguda, utilizando dieta à base de grãos em ruminantes (Gozho et al., 2005; Gozho et al., 2006; Lei et al., 2013). No entanto, cabe ressaltar que estas proteínas não são indicadores específicos para a acidose ruminal subaguda, podendo estar presentes em qualquer doença de tipo inflamatório (González et al., 2010).

Embora a acidose subclínica não provoque aparecimento de sinais clínicos específicos, foram demonstradas consequências clinicamente detectáveis. A variação do

consumo de matéria seca, o timpanismo e a diarreia são sinais clínicos consistentes e indicadores sensíveis da acidose ruminal subaguda (Krause e Oetzel, 2006).

Krajcarski-Hunt et al. (2002) encontraram diminuição de 25% no consumo de matéria seca, durante períodos de acidose ruminal subaguda induzida, em comparação com animais sadios, o que pode ser o resultado da motilidade ruminal reduzida, devida possivelmente, à elevada produção de AGCC no rúmen, elevada osmolaridade e à resposta inflamatória (em fase aguda) (González et al., 2012). Esses fatores acarretam piora na conversão alimentar, atraso no crescimento, baixo desempenho animal no período de confinamento e na perda da função reprodutiva, além de poder resultar em hiperqueratose e paraqueratose ruminal (Gómez et al., 2014).

Com o desenvolvimento de hiperqueratose e paraqueratose ruminal, a função da mucosa como barreira seletiva entre o ambiente ruminal e a corrente sanguínea é prejudicada, permitindo a invasão de bactérias oportunistas (*Actinomyces pyogenes*, *Clostridium spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Fusobacterium necrophorum*), que podem alcançar o fígado e outros tecidos através da corrente sanguínea, onde é possível estabelecer focos infecciosos (Kleen et al., 2003).

Segundo Krause et al. (2006), os animais acometidos com abscessos hepáticos têm sua taxa de crescimento diminuída, causando significativa perda produtiva e econômica. Além disso, a presença de abscessos hepáticos causa redução de até 11% no ganho de peso diário e de 9,7% na eficiência alimentar (Brink et al., 1990).

Somado a isto, a frequência, a intensidade e a duração dos episódios acidóticos sistêmicos são os mecanismos responsáveis pela liberação de substâncias vasoativas, como endotoxinas e histamina, as quais estão claramente implicadas no aparecimento de laminite e síndrome de depressão gordurosa no leite (MDF) (Chaucheyras-Durand et al., 2012).

Cabe ressaltar que a acidose subclínica é uma doença associada ao rebanho e não ao indivíduo, com consequências que representam grandes prejuízos em toda cadeia de produção (Enemark et al., 2002). Para animais confinados, a ocorrência da acidose é da ordem de 3 a 7%, e cerca de um terço da mortalidade apresentada em confinamento podem ser devidas a este distúrbio digestivo (Pacheco e Cruz, 2015).

2. Aditivos alimentares para a prevenção de acidose ruminal subaguda

Os problemas causados pela acidose ruminal subaguda normalmente são de difícil tratamento, e na maioria das vezes, estes são pouco eficazes. Dessa forma, torna-se necessário estabelecer estratégias que permitam prevenir esse distúrbio digestivo. Nesse contexto, a mistura uniforme da ração, a formulação adequada da ração, o manejo de cocho e a inclusão de aditivos na dieta são pontos-chaves para minimizar ou eliminar os efeitos negativos da acidose (Calsamiglia et al., 2012; Pinloche et al., 2013).

A utilização de aditivos alimentares permite melhorar a eficiência alimentar, estimular o crescimento e o ganho de peso, e ao mesmo tempo, beneficiar a saúde e o metabolismo dos animais, principalmente em condições onde a exigência do desempenho é maior, como acontece nos sistemas intensivos de produção (Rai et al., 2013).

Aditivos como os antibióticos ionóforos, por exemplo, tem contribuído para uma produção mais eficiente e rentável, assim como para o controle da acidose ruminal (Pacheco e Cruz, 2015). Contudo, em função de movimentos contra o uso de antibióticos como promotores do crescimento, pesquisadores tem trabalhado na busca por aditivos naturais (probióticos e prebióticos), que além de melhorar a eficiência produtiva, promovam a saúde animal sem deixar resíduos na carcaça, permitindo aos animais responder positivamente aos desafios que lhes são impostos (Krause e Oetzel, 2006; González et al. 2012).

2.1. Probióticos: Leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae*

O probióticos, também conhecidos como *direct-fed microbials* (DFM), são definidos como suplementos alimentares à base de microrganismos vivos, que adicionados na alimentação dos animais em pequenas doses, causam efeitos benéficos, como a estabilidade da microflora intestinal (Fuller, 1989; Uyeno et al., 2015). Particularmente para os ruminantes, os probióticos podem melhorar a função ruminal, uma vez que, esses microrganismos podem sobreviver e permanecer metabolicamente ativos no rúmen, interagindo com as espécies microbianas responsáveis pela digestão dos alimentos. Os probióticos favorecem a digestão e o aproveitamento dos nutrientes, principalmente da proteína e da hemicelulose, assim como, a redução das concentrações

de ácido láctico ruminal, o aumento das concentrações de propionato ruminal e a estabilização do pH do rúmen, entre outras (Callaway e Martin, 1997; Vyas et al., 2014).

Atualmente, uma grande variedade de DFM encontram-se disponíveis comercialmente, alguns como bactérias dos gêneros *Lactobacillus sp.*, *Bifidobacterim sp.*, *Streptococcus sp.* e fungos como a *Saccharomyces sp.* (Uyeno et al., 2015).

Entre os fungos, as leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae*, têm sido amplamente exploradas na nutrição de ruminantes por seus efeitos benéficos sobre a eficiência alimentar e o desempenho dos ruminantes, sendo considerada como aditivo alternativo ao uso de antibióticos (Beauchemin et al, 2003; Fonty e Chaucheyras-Durand; 2006; Broadway et al., 2015).

Cabe ressaltar, no entanto, que as leveduras vivas como a *Saccharomyces cerevisiae* não crescem naturalmente no ecossistema ruminal, devido a que as características de temperatura e pH do rúmen, não favorecem seu desenvolvimento. A temperatura ideal para o desenvolvimento da levedura fica ao redor de 27°C e o pH de 3,5 a 5,0, tornando-se necessária a suplementação contínua na dieta dos animais (Chaucheyras-Durand et al., 2012).

Estudos que envolveram o uso de leveduras vivas na nutrição de ruminantes mostraram maior ganho de peso e melhoria geral da saúde e bem-estar dos animais (Callaway e Martin, 1997; Ding et al., 2008; Silberberg et al., 2013). No entanto, os mecanismos de ação da *Saccharomyces cerevisiae* quando incluídas na dieta de ruminantes ainda não foram totalmente esclarecidos, porém, considera-se que estão associados a mudanças no ecossistema ruminal (Kowalik et al., 2011).

Estudos *in vitro* (Newbold et al., 1995) mostraram que o modo de ação de *Saccharomyces cerevisiae* em ruminantes está relacionado à capacidade da célula da levedura em captar oxigênio, favorecendo a anaerobiose, pois consomem oxigênio no rúmen. Embora o rúmen seja conhecido por ser ambiente anaeróbico, existe entrada de oxigênio por meio da ruminação, da ingestão de água e de alimentos, prejudicando a maioria das bactérias ruminais, principalmente as celulolíticas, reduzindo sua adsorção às fibras da dieta e comprometendo a digestão do alimento (Chaucheyras-Durand et al., 2012).

Segundo Barford e Hall (1979), a taxa respiratória da *Saccharomyces cerevisiae* varia em níveis superiores à concentração de oxigênio observada no fluido ruminal. A atividade respiratória da *Saccharomyces cerevisiae* varia de 200 a 300 mmol min⁻¹ g⁻¹

(Newbold, 1996). Assim, mesmo nas baixas inclusões utilizadas na alimentação de ruminantes, as leveduras vivas podem contribuir com o ambiente anaeróbio do rúmen, criando um ambiente favorável para o crescimento das bactérias ruminais (Newbold et al., 1995; Fonty e Chaucheyras-Durand, 2006).

O aumento do número de bactérias celulolíticas no rúmen, principalmente *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens*, na presença de leveduras vivas, confirmam seu efeito benéfico no crescimento e/ou atividades dessas bactérias (Chaucheyras-Durand e Fonty, 2002; Pinloche et al., 2013). Com o aumento do número de bactérias celulolíticas no rúmen, alguns pesquisadores observaram aumento na degradação ruminal da fibra (celulose e hemicelulose), assim como, maior fluxo de proteína microbiana para o intestino delgado (Newbold et al., 1995; Chaucheyras-Durand et al., 2012; Pinloche et al., 2013; Ding et al., 2014). No entanto, esses resultados foram descritos com maior frequência em estudos *in vitro* (Lila et al., 2004), já em trabalhos *in vivo*, os resultados são variados e nem sempre evidenciam efeito sobre a digestão da fibra (Silberberg et al., 2013).

A habilidade específica das leveduras vivas para estimular o crescimento ou a atividade metabólica de bactérias ruminais, como por exemplo, *Megasphaera elsdenii* e a *Selenomonas ruminantium*, principais bactérias utilizadoras do lactato como substrato energético, tem sido bem documentada (Chaucheyras et al., 1996; Callaway e Martin, 1997; Pinloche et al., 2013; Ding et al., 2014). A presença de um maior número de bactérias utilizadoras de lactato no rúmen contribui para a redução desse ácido orgânico, o que favorece a regulação do pH ruminal (Lila et al., 2004; Chaucheyras-Durand et al., 2008).

Bach et al. (2007) verificaram que a suplementação com leveduras vivas estabiliza o pH ruminal máximo de 0,5 unidades e mínimo de 0,3 unidades em vacas em lactação. Estes efeitos sugerem que as leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* podem ser utilizadas na prevenção de distúrbios digestivos associados ao consumo de alimentos concentrados (acidose ruminal).

Posteriormente, Ding et al. (2008), Chung et al. (2011) e Silberberg et al. (2013) constataram que a suplementação com leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*), em dietas à base de grãos, para ruminantes, estabiliza o pH ruminal dos animais, reduzindo as variações drásticas de pH, o que resulta em maior estabilidade do ambiente ruminal ao longo do dia.

O impacto das leveduras vivas sobre a acidose ruminal subaguda ainda não está bem estudado, mas é provável que a capacidade desses microrganismos em utilizar o amido e os açúcares solúveis (maltose e maltotriose), como substrato para seu crescimento, desempenhe um papel importante na redução da taxa de produção de ácidos orgânicos no rúmen (Lynch e Martin, 2002; Fonty e Chaucheyras-Durand; 2006). Esse efeito foi demonstrado em um estudo *in vitro*, onde a levedura viva *Saccharomyces cerevisiae* foi capaz de superar a bactéria *Streptococcus bovis*, ao competir pela utilização de açúcares, limitando a quantidade do lactato produzido pela última (Chaucheyras et al., 1996).

Brossard et al. (2006) alimentaram ovinos com uma dieta contendo 600 g kg⁻¹ de grão de trigo, e ao utilizar leveduras vivas observaram aumento no crescimento de protozoários ciliados do gênero *Entodiniomorphid sp.*, além da estabilização do pH no fluido ruminal. Posteriormente, Kowalik et al. (2011) também observaram aumento no número total de protozoários ciliados, principalmente do gênero *Diplodiniu sp.* no rúmen de cabras adultas suplementadas com *Saccharomyces cerevisiae* (CNCM I-1077).

Os grânulos de amido são degradados por protozoários a uma taxa mais lenta do que a taxa de degradação das bactérias amilolíticas, liberando AGCC como produto da fermentação, em vez de lactato (Kurihara et al., 1968). De acordo com Michałowski (1987), a manutenção dos protozoários ciliados no rúmen é fundamental, pois produzem principalmente ácido acético e butírico, que contribuíram com 52,9 e 41,3%, respectivamente, do total de AGCC, produzidos no rúmen dos carneiros. Somado a isso, protozoários do gênero *Entodiniomorphs* também são capazes de utilizar o lactato e, portanto, podem evitar sua acumulação no rúmen (Chaucheyras-Durand et al., 2008).

Beauchemin et al. (2003) e Brossard et al. (2006), não verificaram mudanças na produção total de AGCC em bovinos suplementados com leveduras vivas. Porém, pode ocorrer mudanças em suas proporções, com aumento na concentração de propionato e redução na concentração de butirato (Beauchemin et al., 2003; Chung et al., 2011). Mais recentemente, Pinloche et al. (2013) observou aumento da quantidade e da atividade dos microrganismos anaeróbios, bactérias e protozoários presentes no rúmen, e aumento na concentração de AGCC no rúmen de animais suplementados com leveduras vivas.

Estudos realizados *in vitro* e *in vivo* comprovaram uma redução na produção de amônia (NH₃) na presença de cepas de leveduras vivas (Williams et al, 1991;

Chaucheyras-Durand e Fonty, 2002). A diminuição na concentração de NH_3 no rúmen deve-se à estimulação do crescimento da população de bactérias que utilizam peptídeos e aminoácidos como fonte de energia para a produção de proteína microbiana.

Outro efeito interessante descrito por Bach et al. (2007), é uma mudança no comportamento alimentar das vacas leiteiras suplementadas com leveduras vivas, uma vez que, os animais suplementados apresentaram um intervalo entre refeição mais curto (3,32 h), quando comparados com vacas não suplementadas (4,32 h). A mudança no comportamento alimentar também pode ser responsável pelas mudanças no pH ruminal, mas o controle da acidez ruminal pela adição de leveduras vivas na dieta de bovinos, é evidenciada após uma semana de suplementação (Chaucheyras-Durand et al., 2008).

O aumento no consumo de matéria seca com a adição de probióticos como as leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* na dieta pode ser atribuído ao aumento na taxa de digestão da fibra e na taxa de passagem (Wallace e Newbold, 1993). O aumento do consumo de matéria seca pela suplementação de leveduras vivas deve-se ao controle do pH ruminal, uma vez que o baixo pH é um fator limitante do apetite (Chaucheyras-Durand et al., 2012).

A adição de leveduras vivas na dieta de bezerros resultou em respostas positivas no desempenho, com aumento no consumo de matéria seca e ganho de peso diário, o que poderia estar relacionado com uma melhora nos parâmetros de desenvolvimento do rúmen, tais como o comprimento e largura das papilas e a espessura da parede do rúmen (Lesmeister et al., 2004).

Além de todos os efeitos benéficos sobre o ambiente ruminal e a produção animal, o uso das leveduras vivas exerce efeitos positivos sobre o sistema imunológico, uma vez que os componentes da parede celular das leveduras são responsáveis em ativar as respostas de defesa locais e sistêmicas nos animais, devido à presença de mananoligossacarídeos (MOS) na superfície externa da parede celular da levedura (Vyas et al., 2014; Broadway et al., 2015).

Embora os estudos sejam numerosos, os resultados publicados sobre a utilização de leveduras vivas na dieta de ruminantes ainda são bastante controversos. A resposta à suplementação com leveduras vivas é variável e parece ser influenciada por fatores relacionados ao animal (estado fisiológico, dias em lactação, espécies), à dieta (tipo e porcentagem de concentrado, modo de distribuição) e à levedura viva (estirpe, a dose e modo de distribuição; Brossard, 2006).

2.2. Prebiótico: Mananoligossacarídeos (MOS)

Os prebióticos são definidos como ingredientes alimentares, constituídos basicamente por polissacarídeos e oligossacarídeos, que não são digeridos na porção proximal do trato gastrointestinal, principalmente de animais monogástricos (Rai et al., 2013). Assim é possível que esses ingredientes atinjam o intestino grosso de forma intacta e atuem favorecendo a multiplicação de bactérias benéficas, com a promoção da saúde do hospedeiro. Já nos ruminantes, os prebióticos estimulam o crescimento de diversas bactérias ruminais e intestinais benéficas, cujos metabólitos atuam melhorando o aproveitamento e a digestibilidade dos alimentos (Uyeno et al., 2015).

Além disso, outros efeitos benéficos dos prebióticos, como agentes que atuam contra tumores, anti-inflamatórios, anti-mutagênicos, hipocolesterolêmico, hipoglicêmico e proteção contra infecções vem sendo estudados e comprovados (Kim et al., 2006).

Os compostos mais utilizados como aditivos prebióticos são os frutoligossacarídeos (FOS), encontrados em plantas como a cebola, alho, espargos, banana e alcachofra, e os mananoligossacarídeos (MOS) (Li et al., 2011).

Os MOS são moléculas de carboidratos complexos (oligossacarídeos), derivados da parede celular externa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Klis et al., 2002). Os MOS são formados principalmente por uma estrutura complexa de manose fosforilada (mananoproteínas), β -glucanos e proteínas, todas substâncias biológicas naturais, capazes de atuar como imunoestimulantes, ativando mecanismos inespecíficos de defesa nos animais (Klis et al., 2002; Li et al., 2011). Além disso, tem sido demonstrado que os componentes de parede de células de levedura podem ligar-se de forma competitiva a bactérias Gram-negativas tais como *Escherichia coli* e *Salmonella spp.* (Heinrichs et al., 2003), evitando a colonização destas bactérias no trato digestório dos animais.

Prebióticos como os MOS têm sido utilizados como aditivos na produção animal, especialmente para aves, suínos e equinos, por melhorar o desempenho dos animais e o escore fecal (Ferket et al., 2002; Kogan e Kocher, 2007). Em ruminantes, os efeitos dos MOS têm sido estudados principalmente em bezerros, sendo observados resultados benéficos sobre o desempenho, redução da colonização de bactérias patogênicas na parede intestinal dos animais (Heinrichs et al., 2003) e aumento da produção de

proteínas séricas relacionadas com imunidade, sugerindo uma melhor imunocompetência contra doenças infecciosas (Kettunen et al., 2015).

O modo de ação dos MOS no trato digestório dos animais, ainda não está totalmente elucidado. Contudo, sabe-se que as mananoproteínas tem elevada afinidade por se ligar às lectinas, presentes nas fimbrias Tipo 1, encontradas na superfície de bactérias patogênicas, permitindo que os MOS, se liguem a uma ampla variedade de microrganismos de forma competitiva, bloqueando a colonização destes patógenos no trato digestório (Heinrichs et al., 2003).

Dessa forma, bactérias patogênicas como *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* e *Escherichia coli*, portadoras de fímbria tipo 1, podem se ligar aos MOS no trato digestório, evitando sua adesão à parede do intestino. Uma vez que ocorre a ligação bactéria-MOS, as bactérias são eliminadas do organismo nas fezes (Klis et al., 2002). Este mecanismo de ação ajuda a preservar a integridade do epitélio intestinal (Heinrichs et al., 2003).

Os MOS também são conhecidos por sua capacidade de "amarrar" ou "ligar" toxinas, permitindo que essas substâncias passem pelo trato digestório do animal sem serem absorvidas (Johnson et al., 1997). A capacidade de ligação dos MOS às toxinas depende das cargas positivas dos ligantes presentes em sua estrutura, sendo que, por força eletrostática, são capazes de absorver endotoxinas (lipopolisacarídeos) e micotoxinas, visto que essas substâncias químicas tóxicas apresentam carga negativa (Johnson et al., 1997; Lei et al., 2013).

Adicionalmente, os β -glucanos apresentam efeitos imunomoduladores, dado que são capazes de ativar mecanismos de defesa e desencadear uma resposta imune no hospedeiro (Kim et al., 2006), motivo pelo qual o β -glucano é conhecido como um modificador da resposta biológica (Broadway et al., 2015).

O β -glucano é um promotor da ativação do sistema imune inato, favorecendo a prevenção de infecções através da estimulação de macrófagos e neutrófilos (Kim et al., 2006). Estudos de citometria de fluxo, desenvolvidos por Rice et al. (2005), mostraram que o β -glucano pode ser absorvido através das células M do epitélio intestinal, atingindo a circulação sanguínea. As células M são massas de linfócitos dispostos em folículos e cobertas por células epiteliais especializadas, também conhecidas como placas de Peyer.

A modulação da atividade celular dos β -glucanos nos animais, têm início com o reconhecimento de receptores como o dectin-1 e o receptor do sistema de complemento

3 (CR3), presentes na superfície de células imunes como macrófagos/monócitos, neutrófilos e células natural *killer* (NK) (Brown et al., 2006). O reconhecimento do β -glucano por Dectin-1 conduz à ativação celular que pode deprimir a resposta imunológica pró-inflamatória, através da produção de citocinas anti-inflamatórias, como as interleucinas 4 (IL-4), 10 (IL-10) e 13 (IL-13), as quais atuam sobre macrófagos ativados, reduzindo os efeitos das citocinas IL-1, IL-6, TNF- α e o óxido nítrico (NO). Assim, os β -glucanos podem ser relevantes para doenças inflamatórias, incluindo a endotoxemia ou sepse (Luhm et al., 2006).

Por outro lado, Singbootra et al. (2006) descobriram que a expressão reduzida de IL-6 por ação das mananas presentes na parede celular da levedura (MOS), foi mediada através da diminuição transitória na expressão do receptor *Toll* – receptor tipo 4 (TLR-4). Esse receptor, quando ativado, desencadeia uma cascata de produção de citocinas inflamatórias e de proteínas de fase aguda.

Esses mecanismos de ação tornam-se importantes na nutrição de ruminantes, pois ajudam a mitigar os efeitos negativos do uso de dietas contendo alta inclusão de grãos e o desenvolvimento de distúrbios digestivos como a acidose ruminal (Lei et al., 2013). Burdick-Sánchez et al. (2013) observaram que a suplementação com 2,5 g dia⁻¹ de MOS, melhorou o estado de saúde de novilhas, reduzindo as respostas fisiológicas de fase aguda (especificamente a IL-6 e cortisol), quando expostas a um desafio com endotoxinas.

Em outro estudo, Lei et al. (2013) observaram redução dos lipopolissacarídeos (endotoxinas) livres na digesta do intestino delgado e no plasma, em novilhas alimentadas com dieta à base de grãos e suplementadas com 2 g kg⁻¹ de MOS. Além disso, essa dose foi eficaz na redução dos níveis de proteínas de fase aguda como, soro amiloide A (SAA), haptoglobina (Hp), proteína-C reativa (CRP) e proteína ligante de LPS (LBP). Este efeito é importante, uma vez que as proteínas pró-inflamatórias promovem o catabolismo muscular esquelético para fornecer substratos de energia para os tecidos imunes (Gifford et al., 2012), o que prejudica a produção.

Além de todos os efeitos benéficos sobre a imunidade, Shibata (1985) e Li et al. (2007) observaram melhor eficiência na utilização dos nutrientes em ruminantes suplementados com MOS, decorrente da maior digestibilidade dos nutrientes da dieta. Resultados semelhantes foram encontrados por Li et al. (2011), que observaram maior fermentação ruminal e produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) com a suplementação de níveis crescentes de oligossacarídeos (0,2 a 0,8%) na dieta basal de

ovelhas. O aumento crescente na produção de propionato e a redução de amônia (NH_3) no líquido ruminal (Li et al., 2011) também foram observados em ruminantes suplementados com oligossacarídeos. Cabe ressaltar que a redução da amônia sugere que o nitrogênio foi utilizado como substrato para a síntese de proteína microbiana, diminuindo a excreção de nitrogênio e o gasto energético para síntese e excreção de ureia (Sniffen et al., 1992).

Finck et al. (2014) verificaram aumento no consumo de matéria de seca e do ganho médio diário de novilhos confinados, submetidos a um desafio com lipopolissacarídeos e suplementados com 5 g dia⁻¹ de MOS. Em um experimento durante 50 dias, Lei et al. (2013) observaram um aumento do ganho de peso diário em novilhos confinados e suplementados com 2 g dia⁻¹ de MOS. Nesse contexto, Newman et al. (1993) já haviam observado que ganho de peso de bezerros suplementados com MOS superou em aproximadamente 6,5% o peso do grupo controle.

Embora os efeitos benéficos da inclusão dos MOS na dieta de animais não-ruminantes estejam bem documentados, os resultados em animais ruminantes ainda são contraditórios. Além disso, poucas pesquisas têm sido realizadas para confirmar esses efeitos, possivelmente devido às especulações difundidas sobre os MOS sem confirmação científica, visto que os MOS podem ser intensamente degradados pela microflora ruminal e, deste modo, poderiam não proporcionar um efeito benéfico ao hospedeiro. No entanto, Li et al. (2011) afirmaram que a presença dos MOS no rúmen mesmo sendo degradados, modificam o ecossistema microbiano ruminal, melhorando a eficiência produtiva dos ruminantes.

2.3. Associação de aditivos (leveduras vivas e MOS)

A utilização de uma combinação de prebiótico e probiótico na dieta dos animais é uma relação simbiótica, e constitui um novo conceito na utilização de aditivos. Esta associação é uma alternativa interessante no sentido de melhorar a sanidade do rebanho, por meio dos mecanismos fisiológicos e microbiológicos (Hady et al., 2012). No geral, as ações de suplementos que contêm leveduras vivas podem melhorar a fermentação ruminal e a saúde do trato digestivo (Mohammed et al., 2013).

O mecanismo de ação dos MOS e as leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* sobre o metabolismo dos ruminantes precisa ser melhor elucidado. Mais estudos sobre

os efeitos no sistema imune dos animais, assim como na modificação da microflora ruminal, o desempenho e a estimulação do sistema imune são necessários. A inclusão destes aditivos na dieta dos ruminantes, podem ser uma estratégia nutricional que poderia ser adotada pelos produtores e indústria visando a prevenção de distúrbios digestivos como a acidose ruminal subaguda.

II. Referências Bibliográficas

- Andersen, P.H. 2003. Bovine Endotoxycosis– Some Aspects of Relevance to Production Diseases. A Review. *Acta veterinary scand* 98: 141-155.
- Bach, A.; Iglesias, C.; Devant, M. 2007. Daily rumen pH pattern of loose-housed dairy cattle as affected by feeding pattern and live yeast supplementation. *Animal Feed Science and Technology* 136: 156–163.
- Barford, J.P; and Hall, R.J. 1979. An Examination of the Crabtree Effect in *Saccharomyces cerevisiae*: The Role of Respiratory Adaptation. *Journal of General Microbiology* 114: 267-275.
- Beauchemin, K. A.; Yang, W. Z.; Morgavi, D. P.; Ghorbani, G. R.; Kautz, W.; Leedle, J. A. Z. 2003. Effects of bacterial direct-fed microbial and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. *Journal Animal Science* 81: 1628–1640.
- Brink, D. R., S. R. Lowry, R. A. Stock, and J. C. Parrott. 1990. Severity of liver abscesses and efficiency of feed utilization of feedlot cattle. *Journal Animal Science* 68:1201–1207.
- Broadway, P. R.; Carroll, J.A.; Sánchez, N.C.B. 2015. Live Yeast and Yeast Cell Wall Supplements Enhance Immune Function and Performance in Food-Producing Livestock: A Review. *Microorganisms* 3: 417-427.
- Brossard, L.; Chaucheyras-Durand, F.; Doreau, B.M.; Martin, C. 2006. Dose effect of live yeasts on rumen microbial communities and fermentations during butyric latent acidosis in sheep: new type interaction. *Animal Science* 82: 829-836.
- Brown, G.D. 2006. Dectin-1: A signalling non-tlr pattern-recognition receptor. *Nature Reviews Immunology* 6: 33–43.
- Burdick-Sánchez, N.C.; Young, T.R.; Carroll, J.A.; Corley, J.R.; Rathmann, R.J.; Johnson, B.J. 2013. Yeast cell wall supplementation alters aspects of the physiological and acute phase responses of crossbred heifers to an endotoxin challenge. *Innate Immune* 19: 411–419.
- Calsamiglia, S.; Blanch, M.; Ferret, A.; Moya. D. 2012. Is subacute ruminal acidosis a pH related problem? Causes and tools for its control. *Animal Feed Science and Technology* 172: 42– 50.
- Callaway, E. and Martin, S. 1997. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *Journal Dairy Science* 80: 2035–2044.
- Chang, G.; Kai, Z.; Tianle, X.; Di, J.; Hans-Martin, S.; Xiangzhen, S.; Zhuang, S. 2015. Feeding a high-grain diet reduces the percentage of LPS clearance and enhances immune gene expression in goat liver. *BMC Veterinary Research* 67: 1-11.
- Chaucheyras-Durand, F.; Chevaux, E.; Martin, C.; Forano, E. 2012. Use of yeast probiotics in ruminants: Effects and mechanisms of action on rumen pH, fiber degradation, and microbiota according to the diet. p. 119-152. In: *Probiotic in Animals*. Rigobelo, E. ed. License InTech.
- Chaucheyras-Durand, F., Madic, J., Doudin, F. and Martin, C., 2006. Biotic and abiotic factors influencing *in vitro* growth of *E. coli* O157:H7 in ruminant digestive contents. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 4136-4142.
- Chaucheyras, F.; Fonty, G.; Bertin, G.; Salmon, J.M.; Gouet, P. 1996. Effects of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* (Levucell SC), a microbial additive for ruminants, on lactate metabolism *in vitro*. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 927-933.
- Chaucheyras-Durand, F. and Fonty, G., 2002. Influence of a probiotic yeast (*Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077) on microbial colonization and

- fermentation in the rumen of newborn lambs. *Microbial Ecology in Health and Disease* 14: 30-36.
- Chaucheyras-Durand, F.; Walker, N.D.; Bach, A. 2008. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. *Animal Feed Science and Technology* 145: 5–26.
- Chin, A.C.; Flynn, A.N.; Fedwick, J.P.; Buret, A. G. 2006. The role of caspase-3 in lipopolysaccharide-mediated disruption of intestinal tight junctions. *Canadian Journal Physiol Pharmacol* 84: 1043-1050.
- Chung, Y. H. Walker, N. D.; McGinn, S. M. Beauchemin, K. A. 2011. Differing effects of 2 active dried yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strains on ruminal acidosis and methane production in nonlactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 94: 2431-2439.
- Claudino, L.; Gédouin, M.; Poccad-Chapuis, R.; Darnet, L.F.; Waquil, P.; Tourrand, J. F. 2013. Transformações nos territórios de produção bovina pelo desenvolvimento do setor agropecuário: estudo comparativo entre Brasil e Uruguai. *Interfaces em Desenvolvimento, Agricultura e Sociedade* 7: 8-42.
- Dobrovolskaia, M. A. and Vogel, S.N. 2002. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes and Infection* 4: 903–914.
- Ding, J.; Zhou, Z.M.; Ren, L.P.; Meng, Q.X. 2008. Effect of monensin and live yeast supplementation on growth performance, nutrient digestibility, carcass characteristics and ruminal fermentation parameters in lambs fed steam-flaked corn-based diets. *Asian- Australasian Journal Animal Science* 21: 547 – 554.
- Ding, G.; Chang, Y.; Zhao, L.; Zhou, Z.; Ren, L.P.; meng, Q.X. 2014. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* on alfalfa nutrients degradation characteristics and rumen microbial populations of steers fed diets with different concentrate-to-forage ratios. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 5: 1-9.
- Elsasser, T.H.; Caperna, T.J.; LI, C.J.; Kahl, S.; Sartin, J.L. 2008. Critical control points in the impact of the proinflammatory immune response on growth and metabolism. *Journal Animal Science* 86: 105-25.
- Enemark, J.M.D.; Jørgensen, R.J.; Enemark, P.S. 2002. Rumen acidosis with special emphasis on diagnostic aspects of subclinical rumen acidosis: a review. *Veterinarija ir zootechnika* 20: 16-29.
- Ferket, P. R.; Parks, C. W.; Grimes, J. L. 2002. Benefits of dietary antibiotic and mannanoligosaccharide supplementation for poultry. *Multi-State Poultry Meeting* 14-16.
- Fernando, S. C.; Purvis, H. T.; Najar, F. Z.; Sukharnikov, L. O.; Krehbiel, C. R.; Nagaraja, T. G.; Roe, B. A.; De Silva, U. 2010. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 7482-7490.
- Finck, D.; Ribeiro, F.; Burdick, N.; Parr, S.; Carroll, J.; Young, T.; Bernhard, B. C.; Corley, J.R.; Estefan, A.G.; Rathmann, R.J.; Johnson, B.J. 2014. Yeast supplementation alters the performance and health status of receiving cattle. *The Professional Animal Scientist* 30: 333–341.
- Fonty, G. and Chaucheyras-Durand, F. 2006. Effects and modes of action of live yeasts in the rumen. *Biology* 61: 741—750.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66: 365-378.
- Gifford, C.A.; Holland, B.P.; Mills, R.L.; Maxwell, C.L.; Farney, J.K.; Terrill, S.J.; Step, D.L.; Richards, C.J.; Robles, L.O.B.; Krehbiel, C.R. 2012. Growth and

- development symposium: impacts of inflammation on cattle growth and carcass merit. *Journal of Animal Science* 90: 1438–1451.
- Gómez, L.M.; Posada, S.L.; Olivera, M. 2014. Sub-Acute Ruminant Acidosis and non-structural carbohydrates: a study model in nutritional immunology. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 9: 295-306.
- González, L.A.; Mantecab, X.; Calsamigliab, S.; Schwartzkopf-Gensweinc, K.S.; Ferretb, A. 2012. Ruminant acidosis in feedlot cattle: Interplay between feed ingredients, rumen function and feeding behavior (a review). *Animal Feed Science and Technology* 172: 66– 79.
- González, F.H.D. Ruipérez, F.H.; Sánchez, J.M.; Souza, J.C. Martínez-Subiela, S.; Cerón, J.J. 2010. Haptoglobin and serum amyloid A in subacute ruminant acidosis in goats. *La revista de la facultad de medicina veterinaria y de zootecnia* 57:159-167.
- Goshal, S.; Witta, J.; Zhong, W.; Villiers, W.; Eckhardt, E. 2009. Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *The Journal of Lipid Research* 50: 90-97.
- Gozho, G. N.; Plaizier, J. C.; Rause, D. O. K.; Kennedy, A. D.; Wittenberg, M. 2005. Sub-acute Ruminant Acidosis Induces Ruminant Lipopolysaccharide Endotoxin Release and Triggers an Inflammatory Response. *Journal Dairy Science* 88: 1399–1403.
- Gozho, G. N.; Krause, D. O.; Plaizier, J. C. 2006. Rumen lipopolysaccharide and inflammation during grain adaptation and sub-acute ruminant acidosis in steers. *Journal Dairy Science* 89: 404–4413.
- Hady, M.M.; El-Banna, R. A. Teleb, H. M.; Shima, R. A. 2012. Impact of Manna Oligosaccharide (Bio-Mos®) and Esterified Glucomannan (MTB-100 ®) Dietary Supplementation on Performance and Health Status of Barki lambs Under Egyptian Conditions. *International Journal of Chemical Engineering and Applications* 3: 264-268.
- Heinrichs, A.J.; Jones, C.M.; Heinrichs, B.S. 2003. Effects of Mannan oligosaccharides or antibiotics in neonatal diets on health and growth of dairy calves. *Journal Dairy Science* 86: 4064-4069.
- Johnson, P.J.; Casteel, S.W.; Messer, N. T. 1997. Effect of feeding deoxynivalenol (vomitoxin) - contaminated barley to horses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 9: 219–221.
- Khafipour, E.; Krause, D. O.; Plaizier, J. C. 2009. A grain-based subacute ruminant acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation. *Journal Dairy Science* 92: 1060–1070.
- Kim, S. Y.; Song, H. J.; Lee, Y. Y.; Cho, K.H.; Roh, Y. K. 2006. Biomedical issues of dietary fiber β -glucan. *Journal Korean of Medical Science* 21: 781-789.
- Kleen, J. L.; Hooijer, G.A. Rehage, J.; Noordhuizen, J. P. T. M. 2003. Sub-acute Ruminant Acidosis (SARA): a Review. *Journal of Veterinary Medicine* 50: 406–414.
- Klis, F. M.; Mol, P.; Hellingwerf, K.; Brul, S. 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* 26: 239-256.
- Kogan, G. and Kocher, A. 2007. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. *Livestock Science* 109: 161–165.
- Kowalik, B.; Michałowski, T.; Pająk, J.J.; taciak, M.; Zalewska, M. 2011. The effect of live yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, and their metabolites on ciliate fauna, fibrolytic and amylolytic activity, carbohydrate digestion and fermentation in the rumen of goats. *Journal of Animal and Feed Sciences* 20: 526–536.

- Kozloski, G.V. 2011. Bioquímica dos ruminantes. 3ed. Santa María: UFSM.
- Krause, K.M. and Oetzel, G.R. 2006. Understanding and preventing sub-acute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Animal Feed Science and Technology* 126: 215–236.
- Krajcarski-Hunt, H.; Plaizir J. C.; Walton, J. P.; Spratt, R.; McBride, B. W. 2002. Effect of sub-acute ruminal acidosis on in situ fiber digestion in lactating dairy cows. *Journal Dairy Science* 85: 570–573.
- Kurihara, Y.; Eadie, J. M.; Hobson, P.N.; Mann, S.O. 1968. Relationship between band ciliate Protozoa in the sheep rumen. *Journal of general microbiology* 51, 267-288.
- Lei, C.L.; Dong, G.Z.; Jin, L.; Zhang, S.; Zhou, J. 2013. Effects of dietary supplementation of montmorillonite and east cell wall on lipopolysaccharide adsorption, nutrient digestibility and growth performance in beef cattle C.L. *Livestock Science*, 158: 57-63.
- Lesmeister, K. E.; Heinrichs, A. J.; Gabler, M. T. 2004. Effect of supplemental yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture on rumen development, growth characteristics, and blood parameters in neonatal dairy calves. *Journal Dairy Science* 87: 1832–1839.
- Li, G.-H.; Ling, B.M.; Qu, M.R.; You, J.M.; Song, X.Z. 2011. Effects of several oligosaccharides on ruminal fermentation in sheep: an in vitro. *Revue Médecine Vétérinaire* 162: 192-197.
- Li, G.H.; Liu, B.; Qu, M.R.; Zhang, X.F.; Liu, G.B.; Gao, M. Zhang, A.Z. 2007. Effects of soybean oligosaccharides infusion in different parts of the gastrointestinal tract on several immune indices in sheep. *Chinese Journal Animal Science* 19: 1-7.
- Lila, Z.A.; Mohammed, N.; Yasui, T.; Kurokawa, Y.; Kanda, S.; Itabashi, H. 2004. Effects of a twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cells on mixed ruminal microorganism fermentation *in vitro*. *Journal Animal Science* 82: 1847-1854.
- Luhm, J.; Langenkamp, U.; Hensel, J.; Frohn, C.; Brand, J. M.; Hennig, H.; Rink, L.; Koritke, P.; Wittkopf, N. Williams, D.L; Muelle, A. 2006. β - (1→3)-D-glucan modulates DNA binding of nuclear factors κ B, AT and IL-6 leading to an anti-inflammatory shift of the IL-1 β /IL-1 receptor antagonist ratio. *BMC Immunology* 7: 1-5.
- Lynch, H. A. and Martin S. A. 2002. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture and *Saccharomyces cerevisiae* live cells on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. *Journal of Dairy Science* 85: 2603-2608.
- Mohammed, H. H.; El-Sayed, B. M.; Ma, A. 2013. Effects of Commercial Feed Additives on Performance, Economic Efficiency, Blood Metabolites and Some Maintenance Behaviour in Goats, *Journal of Veterinary Science & Medicine Diagnosis* 2:2-7.
- Newbold, C.J. 1996. Probiotics for ruminants. *Annales de zootechnie* 45: 329-335.
- Newbold, C. J.; Wallace, R. J.; Chen, X. B.; McIntosh, F. M. 1995. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers *in vitro* and in sheep. *Journal Animal Science* 73: 1811–1818.
- Newman, K. E.; Jacques, K.; Buede, R. P. 1993. Effect of mannanoligosaccharides on performance of calves fed acidified and non-acidified milk replacer. *Journal Animal Science* 71: 271.
- Nordlund, K. V.; Garrett, E. F.; Oetzel, G. R. 1995. Herd-based rumenocentesis: a clinical approach to the diagnosis of subacute rumen acidosis. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian* 17: 48-56.

- Owens, F.N. and Goetsch, A.L. 1993. Fermentación ruminal. p. 159-190. In: El rumiante fisiología digestiva y nutrición. Church, D.C., Acribia, Zaragoza.
- Owens, F. N.; Secrist, D. S.; Hill, W. J.; Gill, D. R. 1998. Acidosis in cattle: a review. *Journal Animal Science* 76: 275–286.
- Pacheco, R.D.L and Cruz, G.D. 2015. Acidosis in cattle. p. 315-328. In: *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. 1era ed. Puniya, A.K., ed Springer, India.
- Pinloche, E.; Mcewan, N.; Marden, J.; Bayourthe, C.; Auclair, E.; Newbold, C.J. 2013. The Effects of a Probiotic Yeast on the Bacterial Diversity and Population Structure in the Rumen of Cattle, *PLoS ONE*, 8: e67824.
- Rice, P. J.; Adams, E.L.; Ozment-Skelton, T.; Gonzalez, A.J.; Goldman, M.P.; Lockhart, B.E.; Barker, L.A.; Breuel, K.F.; Ponti, W.k.; Kalbfleisch, J.H.; Ensley, H.E.; Brown, G.D.; Gordon, S.; Wiliam, D.L. 2005. Oral delivery and gastrointestinal absorption of soluble glucans stimulate increased resistance to infectious challenge. *Journal of Pharmacology Ad Experimental Therapeutics* 314: 1079-1086.
- Rai, V.; Yadav, B.; Lakhani, G. P. 2013. Application of Probiotic and Prebiotic in Animals Production: A Review. *Environment & Ecology* 31: 873 - 876.
- Shibata, T.H. 1985. Studies on the utilization of pasture herbage nitrogen by rumen microorganisms 2. Effects of carbohydrate and lipid material on the microbial utilization of rumen ammonia *in vitro*. *Grassland Science* 31: 322-331.
- Silberberg, M.; Chaucheyras-Durand, F.; Commun, L. 2013. Repeated acidosis challenges and live yeast supplementation shape rumen microbiota and fermentations and modulate inflammatory status in sheep. *Animal* 7: 1910–1920.
- Singhbootra, P., F. W. Edens, and A. Kocher. 2006. Mannan induced changes in cytokine expression and growth of enteropathogenic *E. coli*-challenged broilers. *Reproduction Nutrition Development* 46:134.
- Sniffen, C.J.; O’connor, J.D.; Van Soest, P.J.; Fox, D.G.; Russell, J.B. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal Science* 70: 3562-3577.
- Uyeno, Y.; Shigemori, S.; Shimosato, T. 2015. Effect of Probiotics/Prebiotics on Cattle Health and Productivity. *Microbes Environment* 30: 126–13.
- Vyas, D.; Uwizeye, A.; Mohammed, R.; Yang, W. Z.; Walker, N. D.; Beauchemin, K. A. 2014. The effects of active dried and killed dried yeast on sub-acute ruminal acidosis, ruminal fermentation, and nutrient digestibility in beef heifers. *Journal animal science* 92:724-732.
- Wallace, R.J.; Newbold, C.J. 1993. Rumen fermentation and its manipulation: the development of yeast cultures as feed additives. *Biotechnology in the Feed Industry* Ed.
- Williams, P.E.; Tait, C.A.; Innes, G.M.; Newbold, J.C. 1991. Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. *Journal Animal Science* 69: 3016–3026.
- Zebeli, Q.; Dijkstra, J.; Tafaj, M.; Steingass, H.; Ametaj, B.N.; Drochner, W. 2008. Modeling the adequacy of dietary fiber in dairy cows, based on the responses of ruminal pH and milk fat production to composition of the diet. *Journal Dairy Science* 91, 2046-2066.

III- OBJETIVO GERAL

Objetivou-se estudar os efeitos da suplementação com leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*) e parede celular de leveduras (mananoligossacarídeos, MOS) em bovinos e ovinos alimentados com dietas contendo alto teor de grãos.

3.1 Objetivos específicos

- 3.1.1. Estudar os efeitos das leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* e dos MOS sobre a digestibilidade aparente no rúmen, intestino e total dos nutrientes em bovinos alimentados com dieta à base de grãos (Capítulo IV);
- 3.1.2. Estudar os efeitos das leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* e dos MOS sobre o processo fermentativo ruminal em bovinos e ovinos alimentados com dieta à base de grãos (Capítulo IV e V);
- 3.1.3. Avaliar o desempenho de ovinos recebendo dietas de alto grão contendo leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*), MOS e uma associação destes aditivos (Capítulo V);
- 3.1.4. Estudar os efeitos das leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*) e dos MOS sobre a resposta inflamatória de bovinos e ovinos alimentados com dietas de alto grão (Capítulo IV e V);
- 3.1.5. Estudar os efeitos das leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*) e dos MOS sobre a morfologia ruminal de ovinos alimentados com dietas de alto grão (Capítulo V);
- 3.1.6. Avaliar a incidência dos abscessos hepáticos nos ovinos alimentados com dietas de alto grão (Capítulo V);

IV- Inclusão de leveduras vivas e mananoligossacarídeos em dietas à base de grãos para bovinos: parâmetros ruminais, digestibilidade dos nutrientes e resposta inflamatória

RESUMO - Objetivou-se estudar os efeitos da suplementação com leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* e de sua parede celular (mananoligossacarídeos) sobre os parâmetros ruminais, digestibilidade dos nutrientes e a resposta inflamatória de bovinos alimentados com dietas à base de grãos. Foram utilizados três bovinos machos castrados, da raça Holandesa, com peso corporal médio de 497 ± 3 kg, providos de cânula ruminal e duodenal. O delineamento experimental foi Quadrado Latino 3x3. Os animais foram mantidos em sistema de confinamento, recebendo dieta *ad libitum*, constituída por 5% de bagaço de cana e 95% de ração concentrada. Os tratamentos estudados foram: Controle (sem aditivo); $1,5 \text{ g kg}^{-1}$ MS Leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae* – NCYC 996 – 10^{10} UFC g^{-1}) e $1,5 \text{ g kg}^{-1}$ MS de mananoligossacarídeos (MOS, 460 g kg^{-1} parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*). O consumo de MS, os coeficientes de digestibilidade aparente ruminal, intestinal e total da MS, MO, PB, FDNcp, EE e CNF não foram influenciados ($P > 0,05$) pelos tratamentos. As concentrações ruminais de ácido isobutírico aumentaram ($P \leq 0,05$) com a adição das leveduras vivas e MOS na dieta, enquanto o ácido isovalérico aumentou ($P \leq 0,05$) com a adição de leveduras vivas e reduziu ($P \leq 0,05$) com os MOS. A adição de leveduras vivas e MOS na dieta dos animais aumentou ($P \leq 0,05$) o pH ruminal e reduziu ($P \leq 0,05$) as concentrações médias de amônia (NH_3) de 16,47 para 14,47 e 13,43 mg dL^{-1} , respectivamente. As concentrações de lipopolisacarídeos (LPS) livres no rúmen e no fluido duodenal não foram influenciadas ($P \leq 0,05$) pela adição dos tratamentos na dieta. Mas, os aditivos reduziram ($P \leq 0,05$) as concentrações plasmáticas de LPS e soro amiloide A (SAA). O eritograma estava dentro dos valores normais, no entanto, no leucograma, foi observada leucocitose e linfocitose, porém, sem efeito dos tratamentos ($P > 0,05$). A suplementação de leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* e mananoligossacarídeos, na dieta à base de grãos aumentam os valores de pH ruminal e reduzem as concentrações de amônia, além de diminuir a intensidade da acidose ruminal subaguda, reduzindo, principalmente a translocação de lipopolisacarídeos à corrente sanguínea.

Palavras-chave: acidose, fermentação ruminal, lipopolisacarídeos, prebióticos, probióticos

IV- Inclusion of live yeasts and mannanoligosaccharides in grain-based diets for cattle: ruminal parameters, nutrient digestibility and inflammatory response

ABSTRACT - The aim of this study was to evaluate the effects of supplementation of live yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its cell wall (mannanoligosaccharides-MOS) on ruminal fermentation, nutrient digestibility and inflammatory response of cattle fed grain-based diets. Three Holstein steers with mean body weight of 497±3 kg and ruminal and duodenal cannulas were used. The experimental design was a 3x3 Latin square. The animals were housed in individual pens system, receiving diet *ad libitum* contained 5% forage and 95% concentrate. The treatments were control (no additive), 1.5 g kg⁻¹ DM live yeast (*Saccharomyces cerevisiae* - NCYC 996-10¹⁰ CFU g) and 1.5 g kg⁻¹ DM MOS (460 g kg⁻¹ yeast cell wall *Saccharomyces cerevisiae*). The DM intake, ruminal, intestinal and total apparent digestibility of DM, OM, CP, NDFcp, EE and NFC were not influenced (P>0.05) by treatments. The ruminal concentrations of isobutyric acid increased (P≤0.05) with the addition of live yeasts and MOS in diet, whereas isovaleric acid increased (P≤0.05) with the addition of live yeasts and reduced (P≤0.05) with the MOS. The addition of live yeasts and MOS in the animals' diet increased (P≤0.05) the ruminal pH and reduced (P≤0.05) the mean concentrations of NH₃ from 16.47 to 14.47 and 13.43 mg dL⁻¹, respectively. The concentrations of free lipopolysaccharide (LPS) in rumen and duodenal fluid were not influenced (P>0.05) by addition of dietary treatments. However, the additives reduced (P≤0.05) the plasma concentrations of LPS and serum amyloid A (SAA). The erythrogram was within normal values, however, in the leukogram, leukocytosis and lymphocytosis were observed, but without effect of the treatments (P>0.05). The supplementation of live yeast *Saccharomyces cerevisiae* and mannanoligosaccharides in the grain-based diets increase ruminal pH values and reduce ammonia concentrations, as well as reducing the intensity of subacute ruminal acidosis, mainly reducing lipopolysaccharide translocation into the bloodstream.

Key words: acidosis, prebiotic, probiotic, lipopolysaccharide, ruminal fermentation

Introdução

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos, que possuem efeito benéfico no hospedeiro, melhorando o equilíbrio da microbiota gastrointestinal (Fuller, 1989; Uyeno et al., 2015). Dentre os probióticos destacam-se, as culturas de leveduras vivas como a *Saccharomyces cerevisiae*, que são conhecidas por serem fonte de enzimas, vitaminas, nutrientes e outros cofatores importantes, capazes de melhorar o desempenho e causar impacto positivo na saúde e no bem-estar dos animais (Hady et al., 2012; Broadway et al., 2015). Já os prebióticos, como os mananoligossacarídeos (MOS), são moléculas de carboidratos complexos, derivados da parede celular externa da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, e formados principalmente por β -glucanos, mananoproteínas, conhecidos como elementos capazes de ativar o sistema imunológico dos animais (Hady et al., 2012; Ding et al., 2014; Broadway et al., 2015).

Entre os principais benefícios mencionados na literatura em relação aos probióticos e os prebióticos, destacam-se o potencial para melhorar o desempenho, alterar o metabolismo, inibir bactérias produtoras de lactato (Chaucheyras-Durand et al., 2008), favorecer a estabilidade do pH ruminal e ativar o sistema imunológico dos animais (Lei et al., 2013), além de promover a remoção de moléculas tóxicas, evitando lesões da mucosa gastrointestinal. Assim, estes aditivos podem contribuir a melhorar o desempenho e a saúde do animal (Ding et al., 2014; Uyeno et al., 2015).

Em virtude disso, tanto os probióticos como os prebióticos têm sido utilizados na alimentação de ruminantes visando evitar distúrbios digestivos, especialmente, os relacionados com o alto consumo de energia em dieta à base de grãos na fase de engorda de bovinos de corte (acidose ruminal subaguda) (Vyas et al., 2014; Chang et al., 2015).

No entanto, os resultados encontrados ainda mostram inconsistências que precisam ser esclarecidas, exigindo mais pesquisas para avaliar o potencial destes produtos como aditivos zootécnicos, visando animais mais produtivos e saudáveis, sem comprometer a eficiência e o custo-benefício na produção animal. Deste modo, objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação com leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* e parede celular de levedura (mananoligossacarídeos) sobre os parâmetros ruminais, digestibilidade dos nutrientes da dieta e a resposta inflamatória de bovinos alimentados com dieta de alto grão.

Material e métodos

O experimento foi conduzido no setor de Avaliação de Alimentos para Animais Ruminantes da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) e no Laboratório de Análises de Alimentos e Nutrição Animal (LANA), ambos da Universidade Estadual de Maringá durante os meses de outubro a dezembro de 2014.

Foram utilizados três bovinos machos castrados, da raça Holandesa, com peso corporal médio de 497 ± 3 kg, providos de cânula ruminal e duodenal. Os animais foram distribuídos em delineamento experimental Quadrado latino 3x3, com duração de 21 dias cada período. Os animais permaneceram em instalações cobertas com piso de concreto e área útil de $8,75 \text{ m}^2$ (2,5 x 3,5 m), dotadas de comedouro de polietileno individual e bebedouro automático. Foi realizado manejo higiênico e sanitário rigoroso das instalações para garantir o conforto dos animais e a durabilidade das cânulas.

As dietas foram constituídas por 5% de bagaço de cana e 95% de ração concentrada, elaborada com grão de milho moído, ureia e mistura mineral (Tabelas 1).

Tabela 1. Composição das dietas experimentais (g kg^{-1} de matéria seca)

Item	Controle	Leveduras	MOS
Ingrediente (g kg^{-1})			
Bagaço de cana	50,0	50,0	50,0
Milho moído	906,5	906,5	906,5
Suplemento mineral ¹	9,0	9,0	9,0
Ureia	18,0	18,0	18,0
Sal comum	2,0	2,0	2,0
Calcário	13,0	13,0	13,0
Mananoligossacarídeos (MOS)	-	-	1,5
Leveduras vivas <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	1,5	-
Inerte (caulim)	1,5	-	-
Composição química (g kg^{-1})			
MS ²		819	
PB ³		133	
FDN _{cp} ⁴		149	
FDA ⁵		66	
CNF ⁶		697	
NDT ⁷		825	
Amido ⁸		569	

¹Suplemento mineral: Enxofre: $141,2 \text{ mg kg}^{-1}$; Iodato de cálcio: $0,484 \text{ mg kg}^{-1}$; Óxido de magnésio: $320,2 \text{ mg kg}^{-1}$; Selenito de sódio: $0,105 \text{ mg kg}^{-1}$; Sulfato de cobalto: $0,400 \text{ mg kg}^{-1}$; Sulfato de cobre: $19,64 \text{ mg kg}^{-1}$; Sulfato de manganês $10,76 \text{ mg kg}^{-1}$; Sulfato de zinco: $13,75 \text{ mg kg}^{-1}$. ²Matéria seca (MS), ³proteína bruta (PB), ⁴Fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína (FDN_{cp}), ⁵fibra em detergente ácido (FDA), ⁶carboidratos não fibrosos (CNF), ⁷NDT: Nutrientes digestíveis totais segundo Sniffen et al. (1992), ⁸ Valor estimado a partir do % de amido no milho descrito por Valadares Filho et al., 2015.

Os tratamentos estudados foram: Dieta controle (sem aditivo); $1,5 \text{ g kg}^{-1}$ MS leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae* – NCYC 996 – 10^{10} UFC g^{-1}) e $1,5 \text{ g kg}^{-1}$

MS de mananoligossacarídeos (MOS: mínimo 460,0 g kg⁻¹, 22 g kg⁻¹ de mananos e 24g kg⁻¹ de β-glucanos).

Antes do início do experimento, foi realizada a adaptação dos animais à dieta controle no sistema de escada (*Step up*) durante 15 dias. A adaptação consistiu no fornecimento de dietas com consumo *ad libitum* e níveis crescentes de concentrado (55; 65 e 75%), com aumento a cada 5 dias, e no 16º dia adotou-se o percentual de concentrado definido (95%). Os períodos experimentais tiveram duração de 21 dias, com 14 dias de adaptação e 7 dias de coleta de amostras em cada período experimental.

A alimentação dos animais foi realizada na forma de mistura completa, à vontade, em duas refeições diárias, às 08h00min e às 16h00min, em quantidade suficiente para garantir diariamente 10% de sobras. O consumo dos animais foi determinado subtraindo-se do alimento fornecido as sobras, sendo estas recolhidas e pesadas diariamente, antes do fornecimento do primeiro trato.

Para a determinação da digestibilidade parcial e total da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp), fibra em detergente ácido (FDA) e carboidratos não fibrosos (CNF), foram coletadas amostras de fezes (50 g) e digesta duodenal (500 mL). As amostras foram coletadas por um período total de três dias, em diferentes horários (08:00, 14:00, 20:00, 02:00, 10:00, 16:00, 22:00, 4:00, 12:00, 18:00 e 24:00 e 06:00 horas), totalizando 12 amostras de digesta duodenal e 12 amostras de fezes por animal/tratamento/período. Para a determinação do fluxo duodenal e excreção fecal foram utilizados 10 g de dióxido de titânio (TiO₂) administrados diretamente no rúmen pela manhã, como indicador externo, a partir do 7º dia de cada período experimental.

As amostras de sobras, digesta duodenal e de fezes foram acondicionadas em sacos plásticos, devidamente etiquetados e congeladas a -20° C. Ao término de cada período de coleta, as amostras foram descongeladas, homogeneizadas e secas em estufa de circulação forçada de ar a 55°C, por 72 horas. Posteriormente, as amostras foram moídas individualmente em moinho tipo Willey com peneira de 1 mm, e misturadas na mesma proporção, com base no peso seco, para formar amostras compostas de digesta duodenal e de fezes por animal/tratamento/período.

As amostras dos alimentos utilizados nas dietas experimentais, de digesta duodenal e de fezes foram analisadas para teores de MS (934,01), cinzas (942,05), PB (984,13), EE (920,39) segundo as metodologias proposta por AOAC (2002) e FDA e FDN, corrigido para cinzas e proteína, utilizando o nitrogênio insolúvel em detergente

neutro (NIDN) (sem sulfito de sódio) segundo Van Soest et al. (1991) com adição de α -amilase estável ao calor. O amido foi da deita foi estimado a partir do valor descrito nas tabelas do NRC (2001). As amostras de digesta duodenal e de fezes foram analisadas para titânio segundo Myers et al. (2004).

Os teores de Carboidratos não fibrosos (CNF) em amostras de alimentos, sobras e fezes foram estimados por meio da equação NRC (2001): $CNF = (100 - \%FDN_{CP} - \%PB - \%EE - \%CINZAS)$. Os teores de nutrientes digestíveis totais (NDT) foram calculados segundo Sniffen et al. (1992): $NDT = PBD + 2,25 \times EED + CNFD + FDND$.

A partir do 15º dia, foram coletadas, via cânula ruminal, amostras de líquido ruminal (150 mL), para determinar a concentração de amônia (NH₃) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). As coletas foram realizadas em diferentes horários 0, 3, 6, 9, 12 horas após alimentação, para determinar as concentrações total e molares dos AGCC e às 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 horas após alimentação para a determinação de NH₃.

Para a determinação de NH₃, uma alíquota de 50 mL do líquido ruminal foram acidificados com 1 mL de ácido sulfúrico (1:1) e armazenados a -20º C, para posterior análise. O líquido ruminal foi descongelado em temperatura ambiente, e posteriormente, centrifugado a 3.000 x g, durante 15 min. No fluído ruminal a concentração de NH₃ foi determinada pela técnica colorimétrica de Chaney e Marbach (1962). A determinação das concentrações dos AGCC foi realizada em Cromatógrafo Gasoso (SHIMADZU, modelo GC-2014) com injetor automático modelo AOC - 20. A temperatura do injetor foi de 200 ºC e a temperatura da coluna 80ºC/3min até 240 ºC (20 graus/min). A coluna utilizada foi HP INNOWax - 19091N (30m de comprimento; 0,32mm ID; 0,50 um de filme) e o detector utilizado foi o de Ionização de Chama.

No 15º e 17º dia de cada período experimental, foram coletados 50 mL de líquido ruminal via cânula ruminal, para determinar o pH de hora em hora até completar 24 horas de medição. O pH foi mensurado imediatamente após cada coleta do líquido ruminal utilizando-se um potenciômetro digital calibrado com padrões pH 4,0 e pH 7,0. Os seguintes parâmetros foram calculados: pH ruminal médio, mínimo, máximo, a duração do pH abaixo de 5,8 e a área sob a curva de pH (ASC). A área sob a curva foi calculada como a soma do valor absoluto dos desvios do pH sob a curva, considerando-se um limite de pH 5,8, expressado como $pH \times h \text{ d}^{-1}$ como descrito por Vyas et al. (2014). O pH de 5,8 foi escolhido como referência para acidose subaguda, uma vez que as bactérias celulolíticas reduzem o crescimento abaixo deste pH (Russell e Wilson, 1996).

Nos 18º e 20º dia de cada período experimental foram realizadas coletas de sangue em tubos vacutainer com heparina por meio de punção da veia jugular 15 minutos antes da alimentação matinal (07:45 horas) e, posteriormente, às seis e doze horas após a primeira alimentação. O sangue foi centrifugado a 3000 x g durante 10 minutos para a obtenção do plasma que foi armazenado em tubos eppendorf a -20°C para posteriores análises de lipopolissacarídeos (LPS), utilizando-se o kit comercial para determinação de endotoxinas (ToxinSensor™ chromogenic LAL Endotoxin Assay, GenScript) e análises de haptoglobinas (Hp) e soro amilóide A (SAA) realizadas com kits comerciais Tridelta PHASE Haptoglobin Multispecies Assay e Tridelta SAA Multispecies Assay. Respetivamente, nos mesmos dias e horários, foi realizada uma coleta de líquido ruminal e digesta duodenal para determinação de LPS. As amostras foram centrifugadas a 6000 x g durante 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi armazenado a -20 °C. Para utilização no ensaio, 1,5 mL do sobrenadante foi novamente centrifugado a 10000 x g durante 30 min a 4°C, assim como descrito por Emmanuel et al. (2008) e Khafipour et al. (2009).

No 21º dia de cada período experimental foi realizada coleta de sangue por punção da veia jugular, no período da manhã antes da primeira alimentação, utilizando-se tubos vacutainer contendo EDTA e enviada para um Laboratório credenciado para análise do quadro hematológico completo.

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o procedimento GLM do pacote estatístico SAS (Statistical Analysis System, versão 9.1). O modelo matemático utilizado para a análise foi:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + P_j + T_k + e_{ijk}$$

Onde, Y_{ijk} = variável dependente; μ = média geral dos tratamentos; A_i = efeito de animal (i , variando de 1 a 3); P_j = efeito de período (j , variando de 1 a 3); T_k = efeito de tratamento (k , variando de 1 a 3); e_{ijk} = erro. As médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey a $\alpha=0,05$ de probabilidade.

Resultado e Discussão

Os valores de consumo de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp), extrato etéreo (EE) e carboidratos não fibrosos (CNF), expressas em g dia⁻¹, não foram influenciados ($P>0,05$) pela adição das leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* e MOS na deita à base de grão para bovinos (Tabela 2).

Tabela 2- Consumo, fluxo duodenal, fluxo fecal, coeficiente de digestibilidade aparente ruminal (CDR), coeficiente de digestibilidade aparente intestinal (CDI) e coeficiente de digestibilidade aparente total (CDT) da MS, MO, PB, FDNcp, EE e CNF de bovinos alimentados com dieta à base de grãos suplementados com leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* e mananoligossacarídeos (MOS)

Item	Tratamentos			EPM ²	P
	Controle	Leveduras	MOS		
Consumo, g dia ⁻¹					
MS	9.648	11.039	10.580	1.180	0,92
MO	9.107	10.439	9.978	1.104	0,91
PB	1.280	1.463	1.418	157,1	0,51
FDNcp	1.424	1.585	1.532	14,5	0,09
EE	384,2	439,2	422,0	36,3	0,87
CNF	5.741	5.692	5.652	13,9	0,10
Fluxo duodenal, g dia ⁻¹					
MS	2.383	2.231	2.614	46,6	0,08
MO	2.149	2.000	2.354	229,7	0,09
PB	311,4	358,1	391,4	48,2	0,65
FDNcp	644,0	657,6	650,6	28,6	0,20
EE	100,5	104,6	125,2	5,79	0,11
CNF	1.431	1.372	1.531	26,7	0,15
Fluxo fecal, g dia ⁻¹					
MS	1.707	1.683	1.616	73,4	0,14
MO	1.581	1.559	1.497	88,2	0,21
PB	236,3	282,3	237,9	15,4	0,54
FDNcp	522,4	539,9	530,7	36,4	0,48
EE	33,9	49,3	42,0	4,71	0,28
CNF	779,6	747,0	738,1	55,9	0,60
CDR, g kg ⁻¹					
MS	750,1	795,6	751,5	27,6	0,84
MO	761,3	806,7	763,4	23,3	0,68
PB	751,9	768,8	726,3	55,8	0,77
FDNcp	546,6	574,8	567,3	27,4	0,23
EE	740,1	761,6	699,3	29,7	0,42
CNF	750,4	758,6	728,6	32,9	0,61
CDI, g kg ⁻¹					
MS	283,3	251,0	385,3	37,8	0,27
MO	269,9	227,5	370,6	38,8	0,29
PB	231,0	265,7	325,8	55,8	0,59
FDNcp	186,2	183,6	185,3	36,2	0,75
EE	634,5	537,2	635,7	47,9	0,23
CNF	453,0	455,3	525,3	70,2	0,73
CDT, g kg ⁻¹					
MS	821,9	847,3	847,9	10,3	0,32
MO	826,8	850,6	851,0	8,11	0,20
PB	814,4	804,2	832,9	22,9	0,66
FDNcp	633,4	654,3	645,6	32,8	0,46
EE	910,1	890,0	900,8	5,01	0,09
CNF	864,3	868,8	869,0	17,4	0,59
¹ NDT, g kg ⁻¹	820,1	844,8	837,4	2,89	0,94

¹ NDT: nutrientes digestíveis totais. Calculado segundo Sniffen et al. (1992); ²EPM = erro-padrão da média; Teste Tukey ($\alpha=0,05$).

Da mesma forma, a inclusão de leveduras e MOS não apresentou efeito ($P>0,05$) sobre os coeficientes de digestibilidade ruminal (CDR), intestinal (CDI) e total (CDT) de MS, MO, PB, FDN_{cp}, EE e CNF e o NDT (Tabela 2).

Os resultados observados na presente pesquisa, em relação a esses parâmetros foram semelhantes aos obtidos por Vyas et al. (2014), onde não observaram efeito da suplementação 4 g d⁻¹ de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (10^{10} UFC g⁻¹) e 4 g d⁻¹ de leveduras autolisadas em novilhas de corte alimentadas com dietas alto grão (33,8% de amido). Por outro lado, o aumento no consumo de MS foi observado por Dann et al. (2000), trabalhando com vacas primíparas e múltiparas recebendo dietas de pre-parto e pós-parto com 75 e 43,3% de volumoso, e suplementadas com 60 g d⁻¹ de leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* ($1,6 \times 10^9$ UFC g).

As respostas relativas ao uso das leveduras vivas e dos MOS na dieta de ruminantes e sua influência sobre o consumo e a digestibilidade dos nutrientes têm sido bastante variáveis. Estas discrepâncias nos resultados são decorrentes de inúmeros fatores, como o tipo de dieta e de animal e o estado fisiológico, além do tipo de cepa e doses de levedura e MOS utilizadas, os quais podem influenciar a resposta dos animais suplementados com esses aditivos (Chademana e offer, 1990; Beauchemin et al., 2003).

Em dietas à base de grão, Fereli et al. (2010), afirmam que o efeito mais consistente com o uso de *Saccharomyces cerevisiae* é o aumento da produção de massa microbiana (bactérias proteolíticas), que promove um maior fluxo de proteína microbiana disponível para o animal. Porém, mesmo que neste estudo, o fluxo duodenal da PB aumentou 46,7 g e 80 g nos tratamentos com adição das leveduras vivas e MOS, respectivamente, em relação ao controle, este aumento não foi suficiente para influenciar este parâmetro.

O consumo de quantidades elevadas de alimentos rapidamente fermentáveis (dieta à base de grãos), nesse experimento, resultou em altas concentrações de AGCC totais no líquido ruminal, em média de 116,3 mM. A suplementação com leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* ou MOS não influenciou ($P>0,05$) a concentração total de AGCC, nem as proporções molares de acetato, propionato, butirato e valerato ($P>0,05$; Tabela 3).

Semelhante ao encontrado no presente estudo, Vyas et al. (2014) observaram que a suplementação de novilhas de corte com leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* e leveduras autolisadas (parede celular de levedura) não influenciaram a concentração total de AGCC no fluido ruminal. Da mesma forma, Ding et al. (2008)

suplementaram cordeiros com leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* (20×10^9 UFC g^{-1}) em dietas à base de milho floculado e não observaram diferenças na concentração total e nas proporções molares de AGCC. Entretanto, é importante destacar que os resultados sobre o efeito desses aditivos na concentração total de AGCC são discrepantes. Andrighetto et al. (1993) e posteriormente Křížova et al. (2011), trabalhando com vacas alimentadas com dietas à base de grãos e suplementadas com uma cultura de leveduras vivas, observaram aumento significativo da concentração total de AGCC no rúmen.

Tabela 3- Concentração ruminal de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) em bovinos alimentados com dietas à base de grãos suplementados com leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* e Mananoligossacarídeos (MOS)

Item	Tratamentos			EPM ¹	P		
	Controle	Leveduras	MOS		Trat.	Hora	T x H
Total de AGCC, mM	111,20	124,30	113,50	4,33	0,10	0,02	0,94
AGCC, mM							
Acetato (A)	64,10	69,20	68,80	2,53	0,29	0,12	0,93
Propionato (P)	21,40	24,50	19,80	3,28	0,44	0,41	0,99
Butirato (B)	18,70	22,80	18,90	1,87	0,22	0,47	0,97
Isobutirato	0,90c	1,10b	1,20a	0,06	0,05	0,01	0,85
Isovalerato	4,80b	5,50a	3,40c	0,54	0,02	0,85	0,99
Valerato	1,25	1,21	1,41	0,06	0,11	0,33	0,94
Proporção A: P	3,72	3,75	3,69	0,30	0,99	0,88	0,99

¹EPM = erro-padrão da média; medias seguidas de letras diferentes na linha diferem pelo teste Tukey ($\alpha=0,05$).

Estudos *in vitro* mostraram que as respostas para a produção ruminal de AGCC e proporções molares de AGCC com a suplementação de leveduras vivas, varia de acordo com a proporção de concentrado na dieta (Zelenak et al., 1994), indicando que as discrepâncias nos resultados podem estar relacionadas às diferenças na composição química das dietas e possivelmente ao nível de consumo das mesmas.

Em relação à concentração de isobutirato no rúmen, os animais que receberam dietas com MOS apresentaram o maior valor, seguidos por aqueles que receberam leveduras vivas, e a mais baixa concentração foi observada para os animais alimentados com a dieta controle ($P \leq 0,05$). Para o isovalerato, o maior valor foi observado em animais que receberam leveduras vivas, seguidos pelos animais controle, e o menor valor foi observado nos animais que receberam MOS ($P \leq 0,05$). O isovalerato e o isobutirato são liberados durante a fermentação de aminoácidos, os quais quando em excesso, favorecem o acúmulo desses AGCC. Lascano e Heinrichs (2009) concluíram que a suplementação com leveduras vivas pode estimular o crescimento de bactérias

amilolíticas, as quais utilizam preferencialmente os peptídeos, devido a sua atividade proteolítica, resultando em maiores concentrações ruminais de isoácidos como o isovalerato e isobutirato.

O uso das leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* e dos MOS na dieta dos animais resultou em pH médio maior, quando comparado ao tratamento controle ($P \leq 0,05$; Tabela 4).

Tabela 4- Valores de pH ruminal e concentração de amônia (NH_3) em bovinos alimentados com dietas à base de grãos suplementados com leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* e mananoligossacarídeos (MOS)

Item	Tratamentos			EPM ¹	P
	Controle	Leveduras	MOS		
pH ruminal					
pH ruminal médio ²	5,90b	6,03a	6,13a	0,05	0,01
pH ruminal máximo	6,52	6,71	6,39	0,06	0,11
pH ruminal mínimo	5,21	5,62	5,56	0,08	0,10
pH $\leq 5,8$					
Duração h dia ⁻¹	10,66	5,66	5,00	2,44	0,27
ASC ³ , pH 5,8; pH x h dia ⁻¹	2,37	1,24	1,17	0,57	0,32
Amônia (NH_3)					
NH_3 médio ¹ (mg dL ⁻¹)	16,47a	14,47b	13,43b	1,82	0,01
NH_3 máximo	41,60	39,41	37,35	5,64	0,73
NH_3 mínimo	2,05	2,49	2,49	0,81	0,99

¹EPM = erro-padrão da média; ²Valor médio durante o período de 0 a 21h após a primeira alimentação; ³ASC = área sob a curva; médias seguidas de letras diferentes na mesma fila diferem pelo teste Tukey ($\alpha=0,05$).

A dieta do presente experimento foi formulada com 90,6% de milho, justamente com o objetivo de causar alterações no metabolismo ruminal e no padrão de fermentação, induzindo os animais a acidose ruminal subaguda. Estudos recentes sugerem que a ocorrência de pH ruminal abaixo de 5,8 durante mais de 5,4 h dia⁻¹ é indicador de acidose ruminal subaguda (Gozho et al., 2007; Zebeli et al., 2008).

Apesar de não ter encontrado diferença ($P > 0,05$), a suplementação com leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* e com MOS na dieta dos bovinos reduziram em 5 e 5,6 horas, respectivamente, a duração total em que o pH ficou abaixo de 5,8, indicando que a suplementação dos aditivos estudados pode prevenir a ocorrência de acidose ruminal subaguda. O valor da área sob a curva (ASC) também foi bem menor, apesar de não ter ocorrido efeito dos aditivos, o que sugere a necessidade de mais estudos nesse sentido. Bach et al. (2007) observaram aumento significativo na frequência de alimentação em animais suplementados com leveduras vivas, o que pode, em parte, explicar a estabilização do pH do rúmen e conseqüentemente o aumento do pH ruminal encontrado neste estudo em função da suplementação dos aditivos.

O efeito das leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* e do MOS sobre a estabilidade do pH do rúmen, tem sido atribuído à redução das concentrações de ácido láctico ruminal, como resultado do maior crescimento das bactérias *Megasphaera elsdenii* e a *Selenomonas ruminantium*, principais bactérias utilizadoras de lactato como substrato energético, contribuindo com a regulação do pH ruminal (Chaucheyras-Durand et al., 2008; Pinloche et al., 2013).

Animais que consumiram a dieta contendo MOS apresentaram menores concentrações médias de NH_3 no líquido do rúmen ($P \leq 0,05$) que aqueles alimentados com a dieta controle, mas não diferiram ($P > 0,05$) dos animais que receberam leveduras vivas (Tabela 4).

Sniffen et al. (1992) destacaram que a redução do nitrogênio amoniacal pode ser decorrente da maior utilização da amônia como substrato para a síntese de proteína microbiana, diminuindo a excreção de nitrogênio e o gasto energético para a síntese e excreção de ureia resultante do metabolismo. O uso de leveduras vivas e de MOS em dietas de ruminantes, pode diminuir a concentração de NH_3 no rúmen e aumentar o fluxo de nitrogênio bacteriano para o intestino delgado (Li et al., 2011), devido, possivelmente, ao maior crescimento microbiano e maior utilização da amônia ruminal (Chaucheyras-Durand et al., 2008).

As dietas com alta inclusão de grãos de cereais, ricas em carboidratos de alta fermentabilidade, produzem queda de pH abaixo de 5,8 e uma das consequências é a morte das bactérias sensíveis a pH baixo (Zebeli et al., 2008). Essa situação desencadeia a liberação de componentes da parede celular presente nas bactérias Gram-negativas, como os lipopolisacarídeos (LPS) ou endotoxinas, compostos tóxicos para os animais capazes de induzir respostas inflamatórias locais do trato digestivo, aumentando a permeabilidade da parede ruminal (Emmanuel et al., 2007; Chang et al., 2015) e provocando danos à barreira gastrointestinal, facilitando a translocação de LPS a partir do trato digestivo para a corrente sanguínea (Andersen, 2003; Gómez, et al., 2014). Li et al. (2012) e Li et al. (2013) observaram que em vacas leiteiras consumindo dietas à base de grãos ocorreu aumento significativo da concentração dos LPS no trato digestório.

As concentrações médias de LPS livres no plasma, no líquido ruminal e na digesta duodenal observadas no presente estudo foram $0,67 \text{ EU mL}^{-1}$, $52.457 \text{ EU mL}^{-1}$ e $49.035 \text{ EU mL}^{-1}$, respectivamente (Tabela 5). Resultados semelhantes foram obtidos por Lei et al. (2013) que verificaram valores de $0,77$, 42.418 e $40.509 \text{ EU mL}^{-1}$ de LPS livres em

plasma, líquido ruminal e digesta duodenal, respectivamente, em bovinos de corte alimentados com dieta à base de grãos.

Tabela 5- Lipopolissacarídeos (LPS) no rúmen, duodeno e plasma de bovinos alimentados com dietas à base de grãos suplementados com leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* e mananoligossacarídeos (MOS)

LPS, ¹ EU mL ⁻¹	Tratamentos			Média	EPM ²	P		
	Controle	Leveduras	MOS			Trat.	Hora	T x H
Rúmen								
0 h	55.118	57.998	54.806	55.974				
6 h	52.566	52.650	53.025	52.747	1.244	0,54	0,10	0,82
12 h	50.635	51.250	44.063	48.649				
Média	52.773	53.966	50.637					
Duodeno								
0 h	51.283	53.551	41.390	48.741				
6 h	55.130	51.110	45.820	50.686	2.383	0,28	0,88	0,97
12 h	52.635	46.913	43.490	47.679				
Média	53.016	50.524	43.566					
Plasma								
0 h	0,77	0,63	0,62	0,67				
6 h	0,73	0,71	0,64	0,69	0,017	0,01	0,29	0,56
12 h	0,75	0,61	0,54	0,63				
Média	0,75a	0,65b	0,60b					

¹EU: Unidade de endotoxinas; ²EPM – erro padrão da média dos tratamentos; Médias seguidas de letras diferentes na mesma fila diferem pelo teste Tukey ($\alpha=0,05$).

Em vacas leiteiras induzidas a acidose ruminal, Khafipour et al. (2009) observaram que 12 horas após a alimentação, ocorreu aumento de LPS livres no rúmen, de 28.184 para 107.152 EU mL⁻¹, e no plasma, de 0,05 para 0,81 EU mL⁻¹, ou seja, uma resposta de maior magnitude que a encontrada neste trabalho, devido possivelmente ao maior consumo de MS (16 kg dia⁻¹), e à substituição de 21% de MS da dieta por trigo e cevada moídas. Segundo Gozho et al. (2007), o alto consumo de alimentos concentrados ricos em grãos aumenta a concentração de LPS no rúmen e sua translocação para o plasma. A magnitude da resposta depende do nível de concentrado na dieta e, provavelmente, do tempo que os animais consomem a dieta.

Os aditivos estudados não influenciaram ($P>0,05$) as concentrações de LPS livres no rúmen e na digesta duodenal (Tabela 5). No entanto, reduziram drasticamente ($P\leq 0,05$) as concentrações de LPS no plasma quando comparados com os animais alimentados com a dieta controle (Tabela 5). Este efeito pode estar relacionado com a habilidade das leveduras vivas e dos MOS em “ligar” toxinas, permitindo que essas substâncias tóxicas passem pelo trato digestório sem serem absorvidas (Lei et al., 2013). Essa habilidade deve-se à presença de β -D-glucanas na parede celular da levedura, que

além de reconhecer e ligar toxinas bacterianas, são responsáveis por dar estrutura à levedura (Andersen et al., 2003).

Após avaliar os efeitos da suplementação dietética com MOS sobre os LPS em bovinos, Lei et al. (2013) encontraram menores concentrações de LPS no plasma com o aditivo, que reduziu os níveis de 0,96 (controle) para 0,66 EU mL⁻¹ (com MOS), valores similares aos descritos neste trabalho. A ligação MOS-LPS dá-se pela carga positiva da parede celular das leveduras, que absorve os ligantes negativos presentes nas endotoxinas, visto que os mesmos são atraídos por forças eletrostáticas (Lei et al., 2013).

Lynch e Martin (2002) verificaram que as leveduras vivas e os MOS têm efeito regulador de pH ruminal, reduzindo a morte de bactérias Gram-negativas no rúmen. Portanto, pode-se sugerir um papel duplo para estes aditivos, ou seja, ligantes de LPS livres e redução da liberação dos mesmos no rúmen. No entanto, no presente estudo, apesar de ter ocorrido aumento no pH ruminal (Tabela 4), as concentrações de LPS livres no rúmen não foram reduzidas ($P > 0,05$) com a suplementação dos aditivos (Tabela 5).

Os níveis sanguíneos das proteínas de fase aguda (PFA), soro amiloide A (SAA) e haptoglobina (Hp) observados foram consistentes aos valores que ocorrem em animais que desenvolvem acidose ruminal subaguda em consequência de alta ingestão de grãos (Andersen, 2003; Lei et al., 2013; Gómez, et al., 2014). Os níveis basais de SAA e Hp em bovinos são de <25 e <50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (Humblet et al., 2006; Tabela 6), indicando que os valores encontrados nesse estudo estão acima da normalidade (resposta inflamatória aguda).

O aumento das PFA está relacionado com a presença de LPS na circulação sistêmica, os quais estimulam a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral (α -TNF), interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) pelos macrófagos do fígado. Por sua vez, estes macrófagos ativam receptores hepáticos e iniciam a síntese de proteínas de fase aguda como, SAA e Hp, utilizadas como marcadores de resposta inflamatória do tipo agudo (Zebeli e Ametaj, 2009; Dong et al., 2011).

As concentrações plasmáticas de SAA foram menores nos animais ($P \leq 0,05$) que receberam adição de leveduras vivas e MOS, quando comparados aos animais que receberam a dieta controle. Na dieta controle, foi observado um aumento ($P \leq 0,05$) das concentrações de SAA, seis horas após a primeira alimentação, mas, nos tratamentos que continham leveduras vivas e MOS, as concentrações dessas proteínas foram

reduzidas conforme avançaram os horários de coleta ($P \leq 0,05$; Tabela 6). Este resultado possivelmente foi observado como consequência da presença de β -glucanas e mananas na parede celular das leveduras (MOS), as quais podem deprimir a resposta imunológica pró-inflamatória, através da produção de citocinas anti-inflamatórias, e à diminuição transitória na expressão do receptor *Toll*-receptor tipo 4 (TLR-4), envolvidos na produção de citocinas pró-inflamatórias e as proteínas de fase aguda (Luhm et al., 2006).

Tabela 6- Soro amiloide A (SAA) e haptoglobina (Hp) plasmáticas de bovinos alimentados com dietas à base de grãos suplementados com leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* e mananoligossacarídeos (MOS)

Item	Tratamentos			EPM ¹	P		
	Controle	Leveduras	MOS		Trat.	Hora	T x H
SAA $\mu\text{g mL}^{-1}$				Média			
0 h	32,77	33,44	29,61	31,94a			
6 h	36,22	30,39	28,38	31,66a	0,86	0,01	0,02
12 h	31,39	25,05	25,22	27,22b			
Média	33,46a	29,63b	27,74b				
Hp $\mu\text{g mL}^{-1}$							
0 h	350,8	323,8	312,6	329,1			
6 h	302,4	357,7	323,9	328,0	8,77	0,83	0,34
12 h	325,0	258,0	321,3	301,4			
Média	326,1	313,2	319,3				

Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste Tukey ($\alpha=0,05$); ¹EPM – erro padrão da média dos tratamentos.

Do mesmo modo, a redução das concentrações de SAA pela suplementação das leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* pode ser devida ao seu efeito estabilizador do pH ruminal (Tabela 4), pois esse parâmetro tem uma relação direta com a liberação de LPS. Conforme aumentou o pH ruminal foram reduzidas as concentrações plasmáticas de LPS (Tabela 5), o que pode ter diminuído as concentrações sanguíneas de SAA. Por outro lado, não foi observado efeito ($P > 0,05$) nas concentrações de Hp no sangue dos tratamentos, horários de coleta, nem a interação entre estes fatores.

Os valores do eritrograma mantiveram-se dentro dos valores normais para espécie, sem mostrar diferenças ($P > 0,05$) com a adição dos aditivos na dieta. No leucograma, foi observado aumento na contagem total de leucócitos e linfócitos acima dos valores de referência (Tabela 7), sendo estes de 4.000 - 12.000 μL e 2.500-7.500 μL , respectivamente, para a espécie estudada. Da mesma forma, os valores dos neutrófilos segmentados ficaram um pouco acima do valor de referência de 600 – 4.000 μL , principalmente nos animais que receberam leveduras vivas e MOS na dieta.

Tabela 7- Quadro hematológico de bovinos alimentados com dietas à base de grãos com inclusão de suplementados com leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* e mananoligossacarídeos (MOS)

Item	Tratamentos			EPM ¹	P
	Controle	Leveduras	MOS		
Eritrograma					
Eritrócitos (milh/ μ L)	6,9	7,0	6,7	0,28	0,93
Hemoglobina (g/dL)	9,8	10,4	9,8	0,25	0,62
Hematócrito (%)	26,3	27,6	26,0	0,68	0,64
V.C.M ² (fL)	38,2	39,3	38,7	1,28	0,95
C.H.C.M ³ (%)	37,2	37,8	37,6	0,12	0,12
Plaquetas (μ /L)	595,6	421,0	469,6	39,3	0,17
Leucograma					
Leucócitos (μ L/L)	15.260	16.060	15.293	612,1	0,86
Neutrófilos segmentados (μ /L)	4.105	4.406	4.246	652,3	0,56
Linfócitos (μ /L)	9.341	8.960	10.377	516,9	0,57
Monócitos (μ /L)	593	686	933	136,4	0,43
Eosinófilos (μ /L)	938	1.608	666	307,2	0,49

¹EPM – erro padrão da média dos tratamentos. ²V.C.M: Volume Corpuscular Médio; ³C.H.C.M: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média; Teste Tukey ($\alpha=0,05$).

A leucocitose e linfocitose observadas, possivelmente tenham ocorrido devido à liberação de LPS no rúmen e à translocação destes para a corrente sanguínea, causando estímulo inflamatório (Gozho et al. 2007), corroborando para o aumento nos níveis das proteínas de fase aguda (SAA e Hp) nos tratamentos, em relação aos valores de referência da espécie bovina. Da mesma forma, os neutrófilos são células de defesa do organismo, responsáveis pela fagocitose de agentes patógenos, os neutrófilos estão envolvidos na síntese e liberação de citocinas, portanto, protegendo o organismo dos desafios bacterianos. Aumento nas concentrações dos neutrófilos segmentados também podem ser observados durante processos inflamatórios (Murphy et al., 2007; Sanchez et al., 2013).

Os MOS são conhecidos por sua habilidade de estimular células do sistema imunitário, como neutrófilos e macrófagos (Williams et al., 1991). Estas células contêm receptores, que quando se ligam às β -glucanas dos MOS, aumentam sua atividade imunológica. Ao influenciarem diferentes funções dos macrófagos, desta forma, os MOS promovem uma rápida resposta de defesa local ou sistêmica (Moran, 2004; Murphy et al., 2007).

Conclusão

A inclusão de 1,5 g kg⁻¹ MS de leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*, 10¹⁰ UFC g⁻¹) e de 1,5 g kg⁻¹ MS de mananoligossacarídeos (MOS) em dietas com alta inclusão de grãos para bovinos aumenta o pH e reduz as concentrações de amônia no líquido ruminal. Os aditivos também diminuíram a absorção de LPS, contribuindo para reduzir o processo inflamatório causado pelo consumo de dietas à base de grão.

Referências bibliográficas

- Andersen, P.H. 2003. Bovine Endotoxemia— Some Aspects of Relevance to Production Diseases. A Review. *Acta Veterinaria Scandinavica* 98: 141-155.
- Andrighetto, I.; Bailoni, L.; Cozzi, G.; Berzaghi, P. 1993. Effects of yeast culture addition on digestion in sheep fed a high concentrate diet. *Small Ruminant Research* 12:27-34.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. 2002. Official Methods of Analysis. 17th ed., AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
- Bach, A.; Iglesias, C.; Devant, M.; 2007. Daily rumen pH pattern of loose-housed dairy cattle as affected by feeding pattern and live yeast supplementation. *Animal Feed Science and Technology* 136: 156–163.
- Beauchemin, K.A.; Yang, W.Z.; Morgavi, D.P.; Ghorbani, G.R.; Kautz, W.; Leedle, J.A.Z. 2003. Effects of bacterial direct-fed microbial and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. *Journal Animal Science* 81: 1628–1640.
- Broadway, P.R.; Carroll, J.A.; Sánchez, N.C.B. 2015. Live Yeast and Yeast Cell Wall Supplements Enhance Immune Function and Performance in Food-Producing Livestock: A Review. *Microorganisms* 3: 417-427.
- Chademana, I., Offer, N.W., 1990. The effect of dietary inclusion of yeast culture on digestion in the sheep. *Animal Production* 50, 483–489.
- Chaney, A.L.; Marbach, E.P. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical Chemistry* 8: 130-132.
- Chang, G.; Kai, Z.; Tianle, X.; Di, J.; Hans-Martin, S.; Xiangzhen, S.; Zhuang, S. 2015. Feeding a high-grain diet reduces the percentage of LPS clearance and enhances immune gene expression in goat liver. *BMC Veterinary Research* 67: 1-11.
- Chaucheyras-Durand, F.; Walker, N.D.; Bach, A., 2008. Effects of active dry yeast on the rumen microbial ecosystem: past, present and future. *Animal Feed Science and Technology* 145: 5–26.
- Chung, Y. H.; Walker, N. D.; Mc Ginn, S. M.; Beauchemin, K. A. 2011. Differing effects of 2 active dried yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strains on ruminal acidosis and methane production in non-lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 94: 2431-2439.
- Commun, L.; Silberberg, M.; Mialon, M. M.; Martin, C.; Veissier, I. 2012. Behavioural adaptations of sheep to repeated acidosis challenges and effect of yeast supplementation. *Animal* 6:12: 2011–2022.

- Dann, H.; Drackley, J.; McCoy, G.; Hutjens, M.; Garrett, J. 2000. Effects of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on prepartum intake and postpartum intake and milk production of jersey cows. *Journal Dairy Science* 83: 123–127.
- Ding, G.; Chang, Y.; Zhao, L.; Zhou, Z. 2014 Effect of *Saccharomyces cerevisiae* on alfalfa nutrient degradation characteristics and rumen microbial populations of steers fed diets with different concentrate-to-forage ratios. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 21: 547 – 554.
- Ding, J.; Zhou, Z.M.; Ren, L.P.; Meng, Q.X. 2008. Effect of monensin and live yeast supplementation on growth performance, nutrient digestibility, carcass characteristics and ruminal fermentation parameters in lambs fed steam-flaked corn-based diets. *Asian- Australasian Journal Animal Science* 21: 547 – 554.
- Dong, G.; Liu, S.; Wu, Y.; Lei, C.; Zhou, J.; Zhang, S. 2011. Diet-induced bacterial immunogens in the gastrointestinal tract of dairy cows: Impacts on immunity and metabolism. *Acta Veterinaria Scandinavica* 53: 2-7.
- Fereli, F.; Branco, A. F.; Jobim, C. C.; Coneglian, S. M.; Granzotto, F.; Barreto, J. C. 2010. Monensina sódica e *Saccharomyces cerevisiae* em dietas para bovinos: fermentação ruminal, digestibilidade dos nutrientes e eficiência de síntese microbiana. *Revista Brasileira de Zootecnia* 39:183-190.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66: 365-378.
- Gómez, L.M.; Posada, S.L.; Olivera, M. 2014. Sub-Acute Ruminal Acidosis and non-structural carbohydrates: a study model in nutritional immunology. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* 9: 295-306.
- Gozho, G. N.; Krause, D. O.; Plaizier, J. C. 2007. Ruminal lipopolysaccharide concentration and inflammatory response during grain-induced sub-acute Ruminal acidosis in dairy cows. *Journal Dairy Science* 90: 856–866.
- Hady, M.M.; El-Banna, R. A.; Teleb, H. M.; Shima, R. A. 2012. Impact of manna oligosaccharide (Bio-Mos®) and esterified glucomannan (MTB-100 ®) dietary supplementation on performance and health status of barki lambs under egyptian conditions. *International Journal of Chemical Engineering and Applications* 3: 264-268.
- Humblet, M.F.; Guyot, H.; Boudry, B.; Mbayahi, F.; Hanzen, C.; Rollin, F.; Godeau, J.M. 2006. Relationship between haptoglobin, serum amyloid A and clinical status in a survey of dairy herds during a 6-month period. *Veterinary Clinical Pathology* 35: 188- 193.
- Khafipour, E.; Krause, D.O.; Plaizier, J.C. 2009. A grain-based sub-acute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation. *Journal Dairy Science* 92: 1060–1070.
- Křižova, L.; Richter, M.; Trínacty, J.; Říha, J.; Kumprechtova, D. 2011. The effect of feeding live yeast cultures on ruminal pH and redox potential in dry cows as continuously measured by a new wireless device. *Czech Journal Animal Science* 56: 37–45.
- Lascano, G.J. and Heinrichs, A.J. 2009, Rumen fermentation pattern of dairy heifers fed restricted amounts of low, medium, and high concentrate diets without and with yeast culture. *Livestock Science* 124: 48-57.
- Lei, C.L.; Dong, G.Z.; Jin, L.; Zhang, S.; Zhou, J. 2013. Effects of dietary supplementation of montmorillonite and east cell wall on lipopolysaccharide adsorption, nutrient digestibility and growth performance in beef cattle C.L. *Livestock Science* 158: 57-63.

- Li, G.H.; Ling, B.M.; Qu, M.R.; You, J.M.; Song, X.Z. 2011. Effects of several oligosaccharides on ruminal fermentation in sheep: an *in vitro*. *Revue Médecine Vétérinaire* 162: 192-197.
- Li, S.; Khafipour, E.; Krause, D.O.; Kroeker, A.; Rodriguez, J.C.; Gozho, G.N. 2012. Effects of subacute ruminal acidosis challenges on fermentation and endotoxins in the rumen and hindgut of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95:294–303.
- Li, S.; Kroeker, A.; Khafipour, E.; Rodriguez, J.C.; Krause, D.O.; Plaizier, J.C. 2010. Effects of subacute ruminal acidosis challenges on lipopolysaccharide endotoxin (LPS) in the rumen, cecum, and feces of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 93:433–434.
- Luhm, J.; Langenkamp, U.; Hensel, J.; Frohn, C.; Brand, J. M.; Hennig, H.; Rink, L.; Koritke, P.; Wittkopf, N. Williams, D.L; Muelle, A. 2006. β - (1→3)-D-glucan modulates DNA binding of nuclear factors κ B, AT and IL-6 leading to an anti-inflammatory shift of the IL-1 β /IL-1 receptor antagonist ratio. *BMC Immunology* 7: 1-5.
- Lynch, H. A. and Martin. S. A. 2002. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture and *Saccharomyces cerevisiae* live cells on *in vitro* mixed ruminal microorganism fermentation. *Journal Dairy Science* 85:2603-2608.
- Murphy, E. A.; Davis, J. M.; Brown, A. S.; Carmichael, M. D.; Mayer, E. P.; Ghaffar, A. 2004. Effects of moderate exercise and oat A-glucan on lung tumor metastases and macrophage antitumor cytotoxicity. *journal applied physiology* 97:955–959.
- Myers, W.D.; Ludden, P.A.; Nayigihugu, V.; Hess, B. W. 2004. Technical note: a procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. *Journal of Animal Science* 82: 179-183.
- National Research Council - NRC. Nutrient requirements of dairy cattle. 7. Rev.ed. Washinton, D.C, 2001.
- Newman, K. E. 1994. Mannan-oligosaccharides: Natural polymers with significant impact on the gastrointestinal microflora and the immune system. p. 167–174. In *Proceedings of Alltech's 10th Annual Symposium on Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries*, Lexington, Kentucky.
- Pinloche, E.; Mcewan, N.; Marden, J.; Bayourthe, C.; Auclair, E.; Newbold, C.J. 2013. The effects of a probiotic yeast on the bacterial diversity and population structure in the rumen of cattle, *PLoS ONE* 8: e67824.
- Russell, J. B. and Wilson, D. B. 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *J. Dairy Science* 79:1503–1509.
- Sniffen, C.J.; O'connor, J.D.; Van Soest, P.J.; Fox, D.G.; Russell, J.B. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *Journal Animal Science* 70: 3562-3577.
- Uyeno, Y.; Shigemori, S.; Shimosato, T. 2015. Effect of Probiotics/Prebiotics on Cattle Health and Productivity. *Microbes Environment* 30: 126–13.
- Valadares Filho, S. C.; Machado, P. A. S.; Furtado, T.; Chzotti, M. L.; Amaral, H. F. 2015. *Tabelas Brasileiras de Composição de Alimentos para Bovinos*, CQBAL 3.0. 1ed Viçosa: UFV.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., lewis, B.A., 1991. Symposium: Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal Dairy Science* 74: 35-83.
- Vyas, D.; Uwizeye, A.; Mohammed, R.; Yang, W. Z.; Walker, N. D.; Beauchemin, K. A. 2014. The effects of active dried and killed dried yeast on sub-acute ruminal acidosis, ruminal fermentation, and nutrient digestibility in beef heifers. *Journal animal science* 92:724-732.

- Williams, P.E.; Tait, C.A.; Innes, G.M.; Newbold, J.C. 1991. Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. *Journal Animal Science* 69: 3016–3026.
- Zebeli, Q.; Dijkstra, J.; Tafaj, M.; Steingass, H.; Ametaj, B.N.; Drochner, W. 2008. Modeling the adequacy of dietary fiber in dairy cows, based on the responses of ruminal pH and milk fat production to composition of the diet. *Journal Dairy Science* 91, 2046-2066.
- Zebeli, Q. and Ametaj, B. N. 2009. Relationships between rumen lipopolysaccharide and mediators of inflammatory response with milk fat production and efficiency in dairy cows. *Journal Dairy Science* 92: 3800–3809.
- Zelenak, I.; Jal Elenak, V.; Jalč, I.; Kmet, V.; Siroka, P. 1994. Influence of diet and yeast supplement on in vitro characteristic. *Animal Feed Science and Technology* 49: 211-221.

V- Inclusão de leveduras vivas e mananoligossacarídeos em dietas à base de grãos para ovinos: desempenho, resposta inflamatória e morfologia ruminal

RESUMO – Objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação dietética de leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*), mananoligossacarídeos e a associação desses aditivos, sobre o desempenho, a resposta inflamatória e a morfologia ruminal de ovinos alimentados com dieta à base de grãos. Foram utilizados 32 ovinos mestiços Dorper x Santa Inês, com peso médio de 24 kg. Os animais foram mantidos em sistema de confinamento, recebendo ração *ad libitum*, a base de grão de milho inteiro (765 g kg⁻¹), concentrado (145 g kg⁻¹; farelo de soja, ureia, suplemento mineral) e silagem de milho (90 g kg⁻¹). Os animais foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e oito repetições. Os tratamentos utilizados foram: Dieta controle (sem aditivo); 2 g kg⁻¹ MS de leveduras vivas; 2 g kg⁻¹ MS de MOS e a associação 2 g kg⁻¹ MS de leveduras vivas + 2 g kg⁻¹ MS de MOS. A levedura viva utilizada foi a *Saccharomyces cerevisiae*-NCYC 996- 10¹⁰ UFC g⁻¹, LeSaffre® e o MOS continha 460 g kg⁻¹ MS de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*. O consumo de matéria seca (CMS), os parâmetros de desempenho e o rendimento de carcaça não apresentaram efeito (P>0,05) pelos tratamentos. A suplementação com MOS e associação dos aditivos resultaram em aumento (P≤0,05) do pH ruminal, enquanto as concentrações totais de AGCC no rúmen foram maiores (P≤0,05) apenas nas dietas que continham leveduras vivas e MOS. Foi observada redução nas concentrações de NH₃ ruminal (P≤0,05) dos animais que foram suplementados com leveduras vivas, MOS e a associação dos aditivos. O uso de leveduras vivas, MOS e a associação dos aditivos reduziu a concentração de LPS no plasma, com valores de 0,46; 0,44 e 0,04 EU mL⁻¹, respectivamente, em comparação com o controle (0,93 EU mL⁻¹). A adição de MOS na dieta resultou em menor espessura total de epitélio ruminal (P≤0,05) que as dietas suplementadas com leveduras, enquanto que a espessura da camada córnea foi menor (P≤0,05) com a adição de MOS e com a associação dos aditivos, comparado com o controle. A suplementação conjunta de leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* e MOS em dietas para ovinos com alta proporção de concentrados contribui com a estabilização do pH ruminal e reduz a translocação de LPS para a corrente sanguínea. O uso dos aditivos também reduz a incidência e severidade dos abscessos hepáticos e contribui com a saúde do epitélio ruminal.

Palavras-chave: acidose ruminal, lipopolisacarídeos, prebióticos, probióticos

V- Inclusion of live yeasts and mannanoligosaccharides in sheep fed grain-based diets: performance, inflammatory response and ruminal morphology

ABSTRACT- The aim of this study was to evaluate the effects of dietary supplementation of live yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*), mannanoligosaccharides and the association of these additives on the performance, inflammatory response and ruminal morphology of sheep fed a grain-based diet. Twenty-Two Dorper x Santa Inês crossbred sheep, with an average weight of 24 ± 2 kg, were used. The animals were kept in feedlot system, receiving the diets *ad libitum* with whole corn (765 g kg^{-1}), concentrate (145 g kg^{-1} ; soybean meal, urea, a mineral supplement) and corn silage corn (90 g kg^{-1}). The animals were distributed in a completely randomized design with four treatments and eight replications. The treatments used were: control (without additive); 2 g kg^{-1} DM of live yeasts; 2 g kg^{-1} DM of MOS and the association 2 g kg^{-1} DM of live yeasts + 2 g kg^{-1} DM of MOS. The live yeast used was *Saccharomyces cerevisiae*-NCYC 996-10¹⁰ UFC g, LeSaffre® and the MOS used contained 460 g kg^{-1} DM cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. Dry matter intake (DMI), performance parameters and carcass yield did not show effect ($P > 0.05$) by treatments. The supplementation with MOS and the combination of the additives resulted in an increase ($P \leq 0.05$) in the ruminal pH, while the total concentrations of ruminal bacteria were higher ($P \leq 0.05$) only in the diets containing live yeasts and MOS. There was a reduction in ruminal NH_3 concentrations ($P \leq 0.05$) of the animals supplemented with live yeast, MOS and the association of the additives. The use of live yeast, MOS and the combination of the additives reduced the plasma LPS concentration, with values of 0.46; 0.44 and 0.04 EU mL^{-1} , respectively, compared to the control (0.93 EU mL^{-1}). The addition of MOS in the diet resulted in a lower total ruminal epithelial thickness ($P \leq 0.05$) than diets supplemented with yeasts, whereas the thickness of the corneous layer was lower ($P \leq 0.05$) with the addition of MOS and with the association of the additives than the control. Dietary combined supplementation of live yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and MOS in sheep's fed high concentrate ratios contribute to the stabilization of ruminal pH and reduce the translocation of LPS into the bloodstream. The use of the additives also reduces the incidence and severity of hepatic abscesses and contributes to the health of the ruminal epithelium.

Key words: lipopolysaccharide, prebiotics, probiotics, ruminal acidosis

Introdução

A utilização de dietas ricas em concentrado, principalmente grãos, é uma prática cada vez mais comum na alimentação de ruminantes visando aumentar a produção de leite e o ganho de peso corporal. No entanto, essas dietas ricas em carboidratos rapidamente fermentáveis estão relacionadas com alterações metabólicas como laminite, abscessos hepáticos e deslocamento de abomaso (Commun et al., 2012) e maior ocorrência de acidose ruminal subaguda (Chang et al., 2015). Desta forma, as consequências econômicas e de saúde geradas pela acidose ruminal subaguda, pode ser considerado um dos problemas mais importantes dos sistemas intensivos de produção.

A acidose ruminal subaguda é de difícil diagnóstico, dificultando o tratamento, que na maioria das vezes, é pouco eficaz, pelo que se faz necessário estabelecer estratégias de prevenção, baseadas principalmente no manejo alimentar (Commun et al., 2012).

Uma das estratégias consiste em adicionar à dieta, aditivos probióticos, como culturas de leveduras vivas, e prebióticos, como os mananoligossacarídeos (MOS), pelos possíveis efeitos desses sobre a microbiota do trato digestório, modulação do pH ruminal e imunestimulação, fatores que contribuem para melhorar a digestibilidade, o desempenho e a saúde dos animais (Vyas et al., 2014; Broadway et al., 2015).

A associação de prebióticos e probióticos na dieta dos animais, a fim de potencializar a resposta animal, tem sido benéfica, e constitui um novo conceito na utilização de aditivos. Essa associação é uma alternativa interessante para melhorar a sanidade do rebanho, que por meio de efeitos sinérgicos, melhora o desempenho e favorece um melhor estado nutricional dos animais (Hady et al., 2012).

Embora haja alguma evidência dos benefícios do uso de leveduras vivas e dos MOS na produção de ruminantes (bovinos e ovinos), poucos estudos têm sido realizados para avaliar os efeitos dos MOS e os efeitos associativos sobre os parâmetros da fermentação ruminal, digestibilidade e o sistema imune dos ruminantes.

O presente estudo foi realizado para avaliar os efeitos da suplementação dietética com leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*), a parede celular de leveduras (mananoligossacarídeos), e a associação desses aditivos, sobre o desempenho, a resposta inflamatória, a incidência de abscessos hepáticos e a morfologia ruminal de ovinos alimentados com dieta à base de grão.

Material e métodos

O experimento foi conduzido no setor de Avaliação de Alimentos para Animais Ruminantes da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) e no Laboratório de Análises de Alimentos e Nutrição Animal (LANA), ambos da Universidade Estadual de Maringá durante um período compreendido entre março e maio de 2015.

Foram utilizados 32 cordeiros mestiços Dorper x Santa Inês, com peso corporal médio de 24 ± 2 kg, distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e oito repetições. Os tratamentos consistiram em:

Dieta controle (sem aditivo);

1. Leveduras vivas: 2 g kg^{-1} de MS de leveduras viva (*Saccharomyces cerevisiae* 10^{10} UFC g^{-1} LeSaffre®);
2. Mananoligossacarídeos: 2 g kg^{-1} de MS de mananoligossacarídeos (460 g kg^{-1} parede celular de leveduras, LeSaffre®);
3. Leveduras vivas + mananoligossacarídeos: 2 g kg^{-1} de MS de leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae* 10^{10} UFC g^{-1}) + 2 g kg^{-1} de MS de mananoligossacarídeos (460 g kg^{-1} na parede celular de leveduras).

Os animais permaneceram em baias individuais suspensas de $0,60 \times 0,90$ m, com piso ripado, dispostas em galpão de alvenaria e providas de comedouros e bebedouros individuais. Diariamente foi realizado manejo higiênico/sanitário rigoroso das instalações para garantir o conforto dos animais. Após a chegada dos animais, os mesmos foram vermifugados e vacinados contra clostridiose utilizando a vacina Sintoxan® Polivalente.

A dieta dos animais era composta por silagem de milho, grão de milho inteiro (765 g kg^{-1}) e um concentrado a base de farelo de soja, ureia, um suplemento mineral, junto com o aditivo, probióticos e/ou prebióticos (Tabela 1).

Tabela 1- Composição das dietas experimentais (g kg⁻¹ de matéria seca)

Item	Tratamentos			
	Controle	Lev ¹	MOS ²	Lev+MOS ³
Silagem de milho	90,0	90,0	90,0	90,0
Milho grão inteiro	765,0	765,0	765,0	765,0
Concentrado proteico				
Farelo de soja	100,0	100,0	100,0	100,0
Calcário	20,0	20,0	20,0	20,0
Sal comum	3,0	3,0	3,0	3,0
Ureia	7,0	7,0	7,0	7,0
Cloreto de amônia	5,0	5,0	5,0	5,0
Premix	10,0	10,0	10,0	10,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	2,0	-	2,00
Mananoligossacarídeos, MOS	-	-	2,00	2,00
Milho moído fino, mg g ⁻¹	9,99	7,98	7,98	6,03
Selenito de Sódio, mg g ⁻¹	0,002	0,002	0,002	0,002
Sulfato de Cobalto, mg g ⁻¹	0,008	0,008	0,008	0,008
Iodato de Cálcio, mg g ⁻¹	0,008	0,008	0,008	0,008
Composição química, g kg ⁻¹				
MS ⁴		770,0		
PB ⁵		140,0		
FDNcp ⁶		175,0		
FDA ⁷		75,5		
CNF ⁸		603,0		
Amido ⁹		504,1		

¹Lev: leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*); ²MOS: Mananoligossacarídeos; ³Lev+MOS: leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*) + mananoligossacarídeos; ⁴Matéria seca (MS), ⁵Proteína bruta (PB), ⁶Fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína (FDNcp), ⁷Fibra em detergente ácido (FDA), ⁸Carboidratos não fibrosos (CNF); ⁹ Valor estimado a partir do % de amido no milho descrito por Valadares Filho et al., 2015.

A dieta foi fornecida duas vezes ao dia às 08h00min e às 16h00min, em quantidade suficiente para garantir 10% de sobras. As sobras dos alimentos fornecidos foram recolhidas diariamente dos comedouros e pesadas para ajuste individual do consumo. Os bebedouros foram lavados diariamente, assegurando-se o fornecimento de água de boa qualidade.

Durante o experimento foram realizadas coletas das sobras, retirando frações de 10% do peso, na base natural. As amostras de sobras foram congeladas a -20°C. Ao término do período de coletas, as amostras foram descongeladas, homogeneizadas e pré-secas em estufa de circulação forçada de ar a 55°C, por 72 horas. Posteriormente, as amostras foram moídas em moinho tipo *Willey* com peneira de 1 mm, e posteriormente misturadas na mesma proporção, com base no peso seco, para formar amostras compostas das sobras por animal/tratamento.

As amostras dos alimentos utilizados nas dietas experimentais e as sobras foram analisadas para teores de matéria seca (MS; 934,01), cinzas (942,05), proteína bruta

(PB; 984,13), extrato etéreo (EE; 920,39) segundo AOAC (2002), fibra em detergente ácido (FDA) e fibra em detergente neutro (FDN) corrigida para cinzas e proteína (FDN_{CP}) utilizando nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN) (sem sulfito de sódio), segundo Van Soest et al. (1991) com adição de α -amilase estável ao calor.

Os teores de carboidratos não fibrosos (CNF) das amostras de alimentos, das sobras e das fezes foram estimados por meio da equação do NRC (2001): $CNF = (100 - \%FDN_{CP} - \%PB - \%EE - \%CINZAS)$.

As pesagens dos animais foram realizadas a cada 21 dias, de manhã e no dia do abate, em jejum de sólidos e recebendo água *ad libitum*. O ganho de peso médio diário (GPD) foi determinado pela diferença entre o peso vivo final (PVF) e o peso vivo inicial (PVI) dividido pelo número de dias do período experimental. Foi calculada a conversão alimentar considerando-se o consumo médio diário de matéria seca (CDMS) e o ganho de peso médio diário dos animais (GPD), conforme a equação, $CA = (CDMS/GPD)$.

A partir do 42º dia experimental, depois da segunda pesagem, os animais foram selecionados para ser abatidos semanalmente, em grupos de 8 animais (2 animais por tratamento), ao atingirem peso corporal entre 37 e 40 kg.

Os animais foram pesados no dia do abate para a obtenção do peso corporal. Antes de abate, foram colhidos 15 mL de sangue por punção da jugular, utilizando-se tubos vacutainer com heparina sódica. O sangue foi centrifugado a 3000 x g durante 15 minutos para a obtenção do plasma e armazenados em eppendorf a -20°C para posteriores análises de lipopolissacarídeos (Khafipour et al., 2009), soro amilóide A e haptoglobina (Hp), determinadas por kits comerciais, ToxinSensor™ chromogenic LAL Endotoxin Assay, GenScript, Tridelta SAA Multispecies Assay e Tridelta PHASE Haptoglobin Multispecies Assay, respectivamente.

O abate dos animais foi realizado de acordo as normas do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de produtos de Origem Animal - RIISPOA (BRASIL, 1980). A carcaça quente foi pesada para obter o rendimento de carcaça quente (RCQ), sendo: $RCQ = ((\text{peso da carcaça quente} / \text{peso vivo ao abate}) \times 100)$.

Posteriormente, após o abate as carcaças foram acondicionadas em sacos plásticos e transferidas para a câmara fria onde foram mantidas a uma temperatura de 4°C durante 24 h. Após o resfriamento as carcaças foram pesadas, para obtenção do rendimento da carcaça fria ou rendimento comercial da carcaça (RCC): $RCC = ((\text{peso da carcaça fria} / \text{peso vivo ao abate}) \times 100)$. As perdas por resfriamento PPR= PCQ-PCF).

Depois da evisceração, foram separados o rúmen e o intestino delgado para coleta de amostras de conteúdo ruminal e uma de digesta intestinal. A amostra do conteúdo ruminal foi filtrada em 4 camadas de gaze, em seguida foi realizada leitura de pH utilizando-se um potenciômetro digital. Foram coletados 50 mL de líquido ruminal, acidificados com 1 mL de ácido sulfúrico (1:1) para determinar a concentração de amônia (NH₃) e mais 50 mL, foram coletados para determinação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), as amostras foram armazenadas a -20° C. A concentração de NH₃ foi determinada pela técnica de Chaney e Marbach (1962). A determinação das concentrações de AGCC foi realizada em Cromatógrafo Gasoso (SHIMADZU, modelo GC-2014), com injetor automático modelo AOC - 20. A temperatura do injetor utilizada foi de 200 °C e a temperatura da coluna 80°C/3min até 240 °C (20 graus/min). A coluna utilizada foi HP INNOWax - 19091N (30m de comprimento; 0,32mm ID; 0,50 um de filme) e o detector utilizado foi a ionização de Chama.

Outras duas amostras de líquido ruminal (15 mL) e uma de digesta intestinal (15 mL) foram coletadas para a determinação da concentração dos lipopolissacarídeos (LPS). As amostras coletadas foram transferidas em tubos estéreis e centrifugadas a 6000 x g durante 15 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi armazenado a -20°C. Posteriormente 1,5 ml do sobrenadante foi novamente centrifugado a 10000 x g durante 30 mim, para análise de concentrações de LPS utilizando o kit comercial para determinação de Endotoxinas (ToxinSensor™ chromogenic LAL Endotoxin Assay, GenScript), assim como descrito por Emmanuel et al. (2008) e Khafipour et al. (2009).

Após a remoção da digesta e lavagem do rúmen com água destilada, um fragmento de aproximadamente 1 cm² foi coletado da região do saco ventral do rúmen. As amostras de tecido ruminal foram lavadas em solução tampão fosfato (0,1 M; pH 7,4), e fixadas em solução formalina tamponada 10%. Após o período de fixação (24 h) as amostras foram mantidas em álcool a 70°GL até o processamento histológico (Prophet et al., 1992).

Posteriormente, as amostras foram lavadas em séries crescente de álcool etílico a 70, 80 e 90°GL, ficando submerso durante 30 minutos em cada solução. Em seguida, as amostras foram diafanizadas em xilol PA dimetil benzeno (C₆H₄(CH₃)₂) por 30 minutos e incluídas em parafina. Logo após, o material foi submerso em parafina por 30 minutos 60°C. Com os blocos de parafina prontos foi realizada a microtomia semi-seriada, a uma espessura de 5 µm. Os cortes histológicos foram montados em lâminas e corados pelas técnicas de hematoxilina-eosina (Prophet et al., 1992).

As variáveis microscópicas avaliadas foram a largura da papila, o tecido conjuntivo, espessura total epitélio, espessura da camada córnea. A espessura da camada não queratinizada foi calculada por diferença entre a espessura do epitélio e a camada córnea.

Estes parâmetros foram mensurados em imagens digitalizadas dos fragmentos de tecido ruminal na objetiva de 10x e 20x. A captura de imagens e as análises foram realizadas com auxílio dos softwares computacionais, Q-Capture e o Motic imagens plus 2.0 ML, acoplados a um microscópio, Olympus BX41.

Abscessos hepáticos (AH) foram classificados de acordo com a severidade em escala de 0 a 3 (Brink et al., 1990), e categorizada como segue: (0) fígados sem abscessos; (A-) fígados com um ou dois pequenos abscessos (menores que 2,5cm de diâmetro) ou cicatrizes de abscessos; (A) fígados com dois a quatro abscessos ativos (menores que 2,5cm de diâmetro); (A+) fígados com um ou mais, grandes abscessos (maiores que 2,5cm de diâmetro) e porções do diafragma aderido à superfície do fígado. Foi considerada para análise, a porcentagem de animais acometidos por abscessos dentro de cada tratamento, obtendo-se com isso a incidência de abscessos hepáticos propriamente dita.

Os dados foram analisados, utilizando-se o procedimento GLM do pacote estatístico SAS (Statistical Analysis System, versão 9.1). As médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

O modelo estatístico utilizado foi o seguinte:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

Onde, Y_{ij} = valor observado das variáveis estudadas, relativo a cada indivíduo j , recebendo o tratamento i ; μ = constante geral; T_i = efeito do tratamento i , com i variando de 1 a 4; e_{ij} = erro aleatório associado a cada observação.

As frequências dos abscessos foram calculadas pelo procedimento FREQ. A incidência e a severidade dos abscessos foram analisadas pelo procedimento Logistic do SAS (Statistical Analysis System, versão 9.1), utilizando-se o teste de Qui-quadrado e adotando-se $\alpha=0,05$.

O modelo estatístico utilizado foi o seguinte:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X$$

Onde, Y = Probabilidade de ocorrência de abscessos hepáticos; β_0 , β_1 , parâmetros estimados associados com os termos do modelo e o X é a incidência do abscesso hepático.

Resultados e discussão

A suplementação com leveduras vivas, MOS e a combinação de leveduras vivas e MOS não apresentou efeito ($P>0,05$) sobre o consumo de matéria seca (CDMS), os parâmetros de desempenho, o peso final, os ganhos de peso diário e total e a conversão alimentar de ovinos alimentados com dieta à base de grãos em confinamento (Tabela 2).

Tabela 2- Desempenho de ovinos alimentados com dieta à base de grãos e suplementados com leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* e mananoligossacarídeos e a associação dos aditivos (leveduras vivas + MOS)

Item	Tratamentos				EPM ⁴	P
	Controle	Lev.	MOS	Lev+MOS		
CDMS g d ⁻¹	957	1.039	971	968	0,12	0,78
CDMS, %PV	3,8	4,3	4,1	3,9	1,22	0,54
CDMS, g kg ^{0,75}	72,9	78,9	75,6	73,5	3,71	0,59
PI, kg	24,8	24,0	23,9	24,6	0,53	0,91
PF, kg	37,1	37,9	36,3	37,2	1,72	0,89
GPD, g	233	267	242	247	22,8	0,82
CA	4,2	3,9	4,3	4,2	0,58	0,80

Consumo de matéria seca (CDMS), consumo de matéria seca em porcentagem de peso vivo (CDMS, %PV), consumo de matéria seca em gramas por quilogramas de peso metabólico (CDMS, g kg^{0,75}), peso vivo inicial (PI), peso vivo final (PF), ganho de peso diário (GPD, g), conversão alimentar (CA); ¹Lev: leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*); ²MOS: Mananoligossacarídeos; ³Lev+MOS: leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*) + mananoligossacarídeos; ⁴EPM = erro-padrão da média; Teste Tukey ($\alpha=0,05$).

Em relação ao CMS, os resultados foram semelhantes aos observados por Kawas et al. (2007), onde a suplementação de 1,2 g kg⁻¹/animal/dia de uma cultura de leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* (contendo $2,8 \times 10^4$ UFC de leveduras g⁻¹) não teve efeito sobre CMS, o ganho de peso e a conversão alimentar de cordeiros em fase de terminação. Mas, é importante destacar que o fornecimento diário de leveduras vivas utilizado por esses autores foi menor que usada no presente estudo.

Vyas et al. (2014) também não observaram efeito sobre os parâmetros de desempenho de novilhas de corte recebendo uma dieta com 33,8% de amido e suplementados com 4 g dia⁻¹ de leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* ($3,48 \times 10^{10}$ UFC) e 4 g dia⁻¹ levedura morta ($2,86 \times 10^2$ UFC), administradas em capsulas de gelatina diretamente no rúmen.

Em contraste com os resultados apresentados neste trabalho, Ding et al. (2008) observaram aumento de 11,5% na eficiência alimentar em cordeiros recebendo uma dieta à base de grãos (43,3% de amido), com a adição de 1 g/animal/dia de uma cultura

de leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* (20×10^9 UFC g⁻¹). Possivelmente, esse efeito observado pelos autores pode estar relacionado à utilização de uma dieta com 64,5% milho floculado, o qual demonstrou melhorar a digestibilidade e a eficiência de utilização dos nutrientes (Simas et al., 2008), já que a concentração de leveduras vivas fornecida foi igual à descrita neste estudo (2×10^{10} UFC g⁻¹ de levedura).

De acordo com Cömert et al. (2015) as divergências de resultados encontrados nos diferentes estudos sobre os parâmetros de desempenho em ruminantes suplementados com leveduras vivas e MOS, podem ser atribuídas ao tipo de dieta basal, forragem utilizado e a alimentação, uma vez que, teores diferentes de carboidratos solúveis na dieta, afetam o CMS dos ruminantes (Chademana e Offer, 1990). Além disso, o tipo de animal, estado fisiológico e nível de produção também podem influenciar a resposta do animal à suplementação (Beauchemin et al., 2003).

Os rendimentos de carcaças de ovinos alimentados com dieta de alto grão e suplementados com leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae*, MOS e a combinação destes aditivos não foram influenciados ($P > 0,05$; Tabela 3).

Tabela 3- Rendimentos das carcaças de ovinos alimentados com dieta à base de grãos e suplementados com leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae*, mananoligossacarídeos e a associação dos aditivos (leveduras vivas + MOS)

Item	Tratamentos				EPM ⁴	P
	Controle	Lev ¹	MOS ²	Lev+ MOS ³		
PVA, kg	37,1	37,9	36,3	37,2	1,72	0,89
PCQ, kg	18,5	18,9	17,8	18,5	0,38	0,80
PCF, kg	18,4	18,7	17,7	18,4	0,37	0,85
PPR, %	1,1	1,2	1,4	1,1	0,03	0,68
RCQ, %	49,5	49,4	48,9	49,3	0,36	0,95
RCF, %	49,8	49,8	49,0	49,6	0,35	0,87

Peso vivo ao abate (PVA), Peso da carcaça quente (PCQ), Peso da carcaça fria (PCF), perda por resfriamento (PPR), rendimento da carcaça quente (RCQ), rendimento da carcaça fria (RCF); ¹Lev: leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*); ²MOS: Mananoligossacarídeos; ³Lev+MOS: leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*) + mananoligossacarídeos (MOS); ⁴EPM = erro-padrão da média; Teste Tukey ($\alpha=0,05$)

Os rendimentos de carcaça quente e fria dos cordeiros mestiços Santa Inês x Dorper, utilizados neste estudo, foram de 49,2 e 49,5%, respectivamente, para animais abatidos com média de peso de 37,2 kg. Resultados semelhantes foram encontrados por Araújo Filho et al. (2010), ao avaliarem o desempenho e as características de carcaça de ovinos Santa Inês x Dorper terminados em confinamento, os quais apresentaram rendimentos de carcaça quente e fria de 47,98 e 46,99 %, respetivamente.

Apesar dos animais estarem em jejum antes do abate, os valores de pH ruminal, obtidos no momento do abate, estavam relativamente baixos em todos os tratamentos (Tabela 4), indicando um possível quadro de acidose ruminal subaguda. Contudo, os episódios deste distúrbio metabólico são diagnosticados quando o pH do rúmen diminui a um nível sub-ótimo ($\text{pH} < 5,8$) durante um período de tempo superior a $5,4 \text{ h dia}^{-1}$ (Zebeli et al., 2008). Desta forma, como o pH ruminal foi mensurado apenas no momento do abate (após 16 horas da última alimentação), sem conhecer suas variações durante o dia, portanto, não é possível concluir que os animais apresentaram a acidose ruminal subaguda.

Tabela 4- Valores de pH ruminal, amônia (NH_3) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) de ovinos alimentados com dieta de alto grão suplementados com leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae*, mananoligossacarídeos e a associação dos aditivos (leveduras vivas + MOS)

Item	Tratamentos				EMP ⁴	P
	Controle	Lev ¹	MOS ²	Lev+MOS ³		
pH ruminal	5,18c	5,30bc	5,34b	5,50a	0,07	0,01
NH_3 (mg dL^{-1})	36,54a	29,45b	24,93c	28,14bc	1,62	0,04
Total AGCC, mM	136,9c	157,4a	145,4b	132,3c	3,57	0,05
AGCC						
Acetato (A)	68,68	77,60	69,83	61,55	4,9	0,12
Propionato (P)	49,78	57,37	60,46	52,17	2,2	0,29
Butirato (B)	14,27	18,78	11,37	14,68	1,5	0,39
Isobutirato	0,40	0,42	0,42	0,43	0,04	0,99
Isovalerato	1,13	1,56	1,06	1,68	0,18	0,57
Valerato	2,67	1,66	2,67	1,77	0,18	0,18
Proporção A: P	1,54	1,44	1,16	1,18	0,08	0,28

¹Lev: leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*); ²MOS: Mananoligossacarídeos; ³Lev+MOS: leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*) + mananoligossacarídeos; ⁴EPM = erro-padrão da média; Teste Tukey ($\alpha=0,05$).

Os valores de pH ruminal aumentaram ($P \leq 0,05$) com a suplementação de MOS e leveduras vivas + MOS, quando comparados com o tratamento controle. No entanto, o pH dos animais alimentados com leveduras vivas foi semelhante ($P \geq 0,05$) ao observado nos ovinos que receberam a dieta controle.

Ding et al. (2008), Chung et al. (2011) e Silberberg et al. (2013) constataram que as leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* e os MOS, podem aumentar o pH ruminal dos animais alimentados com dietas de alto grão, reduzindo as variações drásticas de pH, o que resulta em maior estabilidade do ambiente ruminal.

O uso das leveduras vivas em estudos *in vitro*, tem demonstrado que estes aditivos podem atuar fornecendo ácidos dicarboxílicos, particularmente, o ácido málico, pró-

vitaminas e micronutrientes, favorecendo o crescimento e a atividade das bactérias celulolíticas, das bactérias utilizadoras de ácido lático e dos protozoários ruminais (Williams et al., 1991; Chung et al., 2011). Possivelmente, o uso de leveduras vivas e o MOS (probiótico e prebiótico) associados na dieta dos animais, pode ter apresentado um efeito simbiótico, que favoreceu a estabilização do pH ruminal.

O uso de leveduras vivas e dos MOS aumentou ($P \leq 0,05$) a concentração total de AGCC. Resultados semelhantes foram encontrados por Li et al. (2011), que também encontraram maior produção de AGCC usando níveis crescentes de oligossacarídeos (0,2 a 0,8%) na dieta basal de ovelhas. De acordo com Pinloche et al. (2013) o aumento na concentração de AGCC pode estar relacionado com um aumento da atividade metabólica dos microrganismos anaeróbios, tanto bactérias como protozoários presentes no rúmen.

Houve redução das concentrações de NH_3 ($P \leq 0,05$) com a suplementação de todos os aditivos, quando comparados com o tratamento controle, sugerindo um aumento do fluxo de nitrogênio bacteriano para o intestino delgado do animal e, portanto, uma maior eficiência de utilização deste elemento. Do mesmo modo, Alshaiikh et al. (2002) também observaram redução na concentração de NH_3 , quando dietas ricas em concentrado foram suplementadas com uma cultura de leveduras vivas. Mais recentemente, Vyas et al. (2014) não observaram efeito da suplementação da cultura de leveduras vivas e leveduras secas inativas na dieta de novilhas de corte sobre o nível de NH_3 no rúmen, indicado que ainda existem resultados controversos sobre este parâmetro.

As concentrações de LPS livres no plasma e líquido ruminal, obtidas neste estudo (Tabela 5), foram maiores que os valores encontrados por Huo et al. (2013) em caprinos alimentados com menores proporções de concentrados. Esse resultado pode estar relacionado à lise celular de bactérias ruminais sensíveis ao baixo pH, como consequência da utilização de dietas de alto grão (Emmanuel et al., 2008; Khafipour et al., 2009; Chang et al., 2015).

Os resultados obtidos aqui foram similares aqueles obtidos por Khafipour et al. (2009) para a concentração de LPS. Khafipour et al. (2009) substituíram apenas 21% de MS da dieta total por uma ração misturada com pellets contendo 50% de trigo e 50% de cevada em vacas leiteiras, e mesmo assim observaram aumento da concentração de LPS no sangue periférico. Lei et al. (2013), por outro lado, utilizaram dietas com 60% de concentrado para indução da acidose ruminal subaguda em novilhos de corte,

observaram aumento nas concentrações de LPS livres no líquido ruminal de 44.006 EU mL⁻¹ e no plasma de 0,96 EU mL⁻¹, respectivamente.

Tabela 5- Lipopolissacarídeos (LPS), soro amiloide A (SAA) e haptoglobina (Hp) em ovinos alimentados com dietas à base de grãos suplementados com leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae*, mananoligossacarídeos e a associação dos aditivos (leveduras vivas + MOS)

Item	Tratamento				EPM ⁴	P
	Controle	Lev ¹	MOS ²	Lev+MOS ³		
LPS, EU mL ⁻¹						
Plasma	0,94a	0,46b	0,44b	0,04c	0,02	0,01
Líquido ruminal	46.132	44.594	42.480	43.276	1.953	0,92
Fluído duodenal	45.473	45.292	43.075	43.544	1.860	0,95
SAA (µg mL ⁻¹)	28,16	29,63	28,64	29,14	3,49	0,75
Hp (µg mL ⁻¹)	316,37	316,29	317,11	318,19	4,06	0,46

¹Lev: leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*); ²MOS: Mananoligossacarídeos; ³Lev+MOS: leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*) + mananoligossacarídeos; EU: Unidades de endotoxinas; ⁴EPM = erro-padrão da média; Médias seguidas de letras diferentes na mesma fila diferem pelo teste Tukey ($\alpha=0,05$).

A translocação de LPS para a circulação sistêmica pode ocorrer como consequência do aumento da permeabilidade do epitélio do rúmen (Gozho et al., 2005; Gomez et al., 2014; Chang et al., 2015). Isto permite que as bactérias e toxinas bacterianas (LPS) possam entrar na circulação portal, causando alterações metabólicas como, abscessos no fígado e uma resposta inflamatória (Gozho et al., 2005).

A suplementação com leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae*, com MOS ou em associação, na dieta à base de grão, para ovinos, resultou em menores concentrações plasmáticas de LPS ($P \leq 0,05$), e o tratamento com leveduras vivas + MOS apresentou a menor concentração de LPS (0,04 EU mL⁻¹; $P \leq 0,05$), comparado ao controle (0,93 EU mL⁻¹) (Tabela 5), indicando um efeito sinérgico com o uso dos dois aditivos. Este efeito pode ser atribuído às cargas positivas dos ligantes presentes na parede celular da levedura e os MOS, os quais, por força eletrostática, são capazes de absorver endotoxinas por apresentarem carga negativa (fosfato) (Johnson et al., 1997; Lei et al., 2013), permitindo que esta seja eliminada do trato digestório do animal sem ser absorvida para a corrente sanguínea (Johnson et al., 1997).

Foi observada altas concentrações das proteínas da fase aguda, SAA e Hp (Tabela 5), possivelmente, pela presença de LPS na circulação sanguínea. Uma vez que os LPS permitem a liberação de citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral- α , interleucinas- 1 e 6) por macrófagos hepáticos, as quais, estimulam a liberação destas

proteínas SAA e Hp, como uma resposta inflamatória (Khafipour et al., 2009; Gómez et al., 2014; Chang et al., 2015). As concentrações dessas proteínas não foram influenciadas com a adição de leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae*, de MOS e a associação dos aditivos na dieta à base de grãos de ovinos ($P>0,05$) (Tabela 5).

A espessura da camada córnea foi menor ($P\leq 0,05$) com a adição de MOS ou combinada às leveduras vivas. A largura da papila, o tecido conjuntivo e a camada não queratinizada não foram influenciados ($P>0,05$) pela adição dos aditivos na dieta (Tabela 6).

Tabela 6- Parâmetros morfológicos das papilas ruminais de ovinos alimentados com dieta à base de grãos suplementados com leveduras viva *Saccharomyces cerevisiae*, mananoligossacarídeos e a associação dos aditivos (leveduras vivas + MOS)

Item, μm	Tratamento				EPM ⁴	P
	Controle	Lev ¹	MOS ²	Lev+MOS ³		
Largura total da papila	288,80	296,50	279,90	283,20	3,44	0,16
Largura tecido conjuntivo	53,07	59,10	55,32	54,19	2,76	0,62
Espessura do epitélio	80,85ab	87,26a	73,81b	80,52ab	2,79	0,03
Espessura camada córnea	23,66a	22,14a	16,51c	19,36b	0,63	0,01
Espessura camada não queratinizada	57,19	65,12	57,29	66,72	1,62	0,26

¹Lev: leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*); ²MOS: Mananoligossacarídeos; ³Lev+MOS: leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*) + mananoligossacarídeos; ⁴EPM = erro-padrão da média; Médias seguidas de letras diferentes na mesma fila diferem pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

O aumento da espessura do epitélio ruminal foi acompanhado por aumento da espessura da camada córnea, como resposta do epitélio ruminal ao aumento dos carboidratos não fibrosos da dieta (Steele et al., 2011). Este efeito normalmente é atribuído ao aumento ao aumento na produção de AGCC, principalmente o butirato (Gálfi et al., 1983; Steele et al., 2011), o qual, parece ser indesejável do ponto de vista de integridade e atividade metabólica da parede ruminal, em razão dos efeitos desse ácido sobre a proliferação e a queratinização das células epiteliais (Gálfi et al., 1993; Costa et al., 2008).

O espessamento da camada córnea é caracterizado pela presença de grande quantidade de queratina no citoplasma e poucas organelas celulares, a qual atua como uma barreira física, reduzindo o transporte de AGCC para as camadas mais profundas do epitélio (Hinders e Owen, 1965), onde a capacidade de absorção e metabolização de AGCC é maior, reduzindo assim, a porção metabolicamente ativa do tecido ruminal

(Baldwin e Jesse, 1992). Apesar da camada córnea ter sido maior ($P \leq 0,05$) para os ovinos que receberam a dieta com tratamento controle e levedura viva, a espessura da camada não queratinizada não foi influenciada pelos tratamentos ($P > 0,05$; Tabela 6).

No entanto, foi possível observar que a adição de MOS na dieta resultou em menor espessura de epitélio ruminal ($P \leq 0,05$) que os outros tratamentos, devido à menor camada de epitélio queratinizado observada para este parâmetro neste estudo (16,51 μm : $P \leq 0,05$). Igualmente, a combinação dos aditivos (leveduras vivas + MOS) resultou em menor ($P \leq 0,05$) espessura da camada córnea (19,36 μm), quando comparado com os tratamentos controle e leveduras vivas (23,66 e 22,14 μm , respectivamente), portanto, poderia pensar-se que o MOS pode contribuir com a saúde do epitélio ruminal, ao atenuar a acidose ruminal de animais submetidos a dietas à base de grãos, reduzindo assim a hiperqueratinização do rúmen.

A incidência e severidade dos abscessos hepáticos foi menor ($P > 0,05$) nos animais suplementados com leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* e a combinação dos aditivos (leveduras vivas + MOS) comparativamente aos ovinos que receberam a dieta controle (Tabela 7).

Tabela 7– Incidência e severidade de abscessos hepáticos em ovinos alimentados com dietas à base de grãos e suplementados com leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae*, mananoligossacarídeos (MOS) e associação dos aditivos (leveduras vivas+ MOS)

Item	Tratamentos				EPM ⁴	P
	Controle	Leveduras	MOS	Lev+ MOS ³		
0 (Sem abscessos), n	2	5	3	5	-	-
A-, n	2	2	3	2	-	-
A, n	2	1	1	1	-	-
A+, n	2	0	1	0	-	-
Incidência de abscessos, %	75,0a	37,5b	62,5a	37,5b	14,5	0,01
Severidade abscessos, % ⁵	50,0a	12,5b	25,0a	12,5b	13,0	0,02

¹Lev: leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*); ²MOS: Mananoligossacarídeos; ³Lev+MOS: leveduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*) + mananoligossacarídeos; ⁴EPM = erro-padrão da média; ⁵Severidade abscessos, % de fígados exibindo classificação A e A+ (mais prejudiciais); médias seguidas com letras diferentes em uma mesma linha são estatisticamente diferentes ($\alpha=0,05$)

O desenvolvimento de abscessos hepáticos está relacionado com o alto consumo de alimentos rapidamente fermentais e com lesões sobre o epitélio ruminal (ruminitis). Danos causados na integridade das papilas ruminiais, facilita a entrada de bactérias como *Fusobacterium necrophorum* e *Actinomyces pyogenes*, habitantes normais da microbiota bacteriana ruminal, na circulação portal até atingir os transportados para o fígado, onde é possível estabelecer focos infecciosos (Nagaraja e Chengappa, 1998).

As mananoproteínas presentes na estrutura da parede celular das leveduras, tem elevada afinidade por se ligar às lectinas das fimbrias Tipo 1, encontradas na superfície de bactérias patogênicas, permitindo que os MOS, se liguem a uma ampla variedade de microrganismos de forma competitiva, bloqueando a colonização destes patógenos (Heinrichs et al., 2003). Porém, este efeito tem sido observado em estudos *in vitro*, desta forma, mais estudos precisam ser realizados *in vivo* para corroborar estes resultados, pois é pouco discutido na literatura.

Conclusão

A suplementação de 2 g kg⁻¹ de MS de leveduras vivas *Saccharomyces cerevisiae* (10¹⁰ UFC g) e 2 g kg⁻¹ de MS de mananoligossacarídeos (460 g kg⁻¹ de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*) e a associação destes aditivos em dietas com alta proporção de grãos para ovinos, contribuiu no controle do pH no rúmen e reduz as concentrações de amônia e a translocação de lipopolissacarídeos para a corrente sanguínea.

Os mananoligossacarídeos e associação dos aditivos melhoraram a saúde do epitélio ruminal, reduzindo a espessura da camada córnea.

As leveduras vivas e associação dos aditivos na dieta dos ovinos reduz a incidência de abscessos hepáticos em animais que recebem dietas de alto grão, sem afetar o desempenho dos animais.

Referências bibliográficas

- Alshaikh, M.A.; Alsiadi, M.Y.; Zahran, S.M.; Mogawer, H.H.; Aalshowime, T.A. 2002. Effect of feeding yeast culture from different sources on the performance of lactating Holstein cow in Saudi Arabia. *Asian-Australas. Journal of Animal Science* 15: 352–356
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. 2002. *Official Methods of Analysis*. 17th ed., AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
- Araújo Filho, J. T.; Costa, R.G.; Fraga, A.B.; Sousa, W. H.; Cezar, M. F.; Batista, A. S. M. 2010. Desempenho e composição da carcaça de cordeiros deslanados terminados em confinamento com diferentes dietas. *Revista Brasileira de Zootecnia* 39: 363-371.
- Baldwin, R. L. and Jesse, B. W. 1992. Development changes in glucose and butyrate metabolism by isolated sheep rumen epithelia's cells. *Journal of Nutrition* 122: 1149-1153.
- Beauchemin, K. A.; Yang, W. Z.; Morgavi, D. P.; Ghorbani, G. R.; Kautz, W.; Leedle, J. A. Z. 2003. Effects of bacterial direct-fed microbial and yeast on site and extent

- of digestion, blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. *Journal Animal Science* 81: 1628–1640.
- Brasil, 1983. Regulamentação da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal – RIISPOA. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Brasília.
- Brink, D.R.; Lowry, S.R.; Stock, R.A.; Parrot, J.C. 1990. Severity of liver abscess and efficiency IF feed utilization of feedlot cattle. *Journal Animal Science* 68: 1201-1207.
- Broadway, P. R.; Carroll, J.A.; Sánchez, N.C.B. 2015. Live Yeast and Yeast Cell Wall Supplements Enhance Immune Function and Performance in Food-Producing Livestock: A Review. *Microorganisms* 3: 417-427.
- Chademana, I., Offer, N.W., 1990. The effect of dietary inclusion of yeast culture on digestion in the sheep. *Animal Production* 50, 483–489.
- Chang, G.; Kai, Z.; Tianle, X.; Di, J.; Hans-Martin, S.; Xiangzhen, S.; Zhuang, S. 2015. Feeding a high-grain diet reduces the percentage of LPS clearance and enhances immune gene expression in goat liver. *BMC Veterinary Research* 67: 1-11.
- Chaney, A.L., Marbach, E.P., 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical Chemistry* 8: 130-1372.
- Chung, Y.H.; Walker, N.D.; McGinn, S.M.; Beauchemin, K.A. 2011. Differing effects of 2 active dried yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strains on ruminal acidosis and methane production in non-lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 94: 2431-2439.
- Cömert, M.; Şayan, Y.; Özelçam, H.; Baykal, G.Y. 2015. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* Supplementation and Anhydrous Ammonia Treatment of Wheat Straw on In-situ Degradability and, Rumen Fermentation and Growth Performance of Yearling Lambs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 28: 639–646.
- Commun, L.; Silberberg, M.; Mialon, M.M.; Martin, C.; Veissier, I. 2012. Adaptations of sheep to repeated acidosis challenges and effect of yeast supplementation. *The Animal Consortium* 6: 2011–2022.
- Costa, S.F.; Pereira, M.N.; Melo, L.Q.; Resende Júnior, J.C.; Chaves, M.L. 2008. Alterações morfológicas induzidas por butirato, propionato e lactato sobre a mucosa ruminal e a epiderme de bezerros: I Aspectos histológicos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 60: 1-9.
- Ding, J.; Zhou, Z.M.; Ren, L.P.; Meng, Q.X. 2008. Effect of Monensin and Live Yeast Supplementation on Growth Performance, Nutrient Digestibility, Carcass Characteristics and Ruminal Fermentation Parameters in Lambs Fed Steam-flaked Corn-based Diets. *Asian- Australasian Journal Animal Science* 21: 547 – 554.
- Emmanuel, D.G.V.; Dunn, S.M.; Ametaj, B.N. 2008. Feeding high proportions of barley grain stimulates an inflammatory response in dairy cows. *Journal Dairy Science* 1: 606–614.
- Gálfi, P.; Neogrady, S.; Kutas, F.; Veresegyházy, T. 1983. Keratinization of cultured ruminal epithelial cells treated with butyrate and lactate. *Journal of Veterinary Medicine* 30: 775-781.
- Gómez, L.M.; Posada, S.L.; Olivera, M. 2014. Sub-Acute Ruminal Acidosis and non-structural carbohydrates: a study model in nutritional immunology. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* 9: 295-306.
- Gozho, G. N.; Plaizier, J.C.; Rause, D.O.K.; Kennedy, A. D.; Wittenberg, M. 2005. Sub-acute Ruminal Acidosis Induces Ruminal Lipopolysaccharide Endotoxin Release and Triggers an Inflammatory Response. *Journal Dairy Science* 88 1399-1403.

- Hady, M.M.; El-Banna, R. A. Teleb, H.M.; Shima, R. A. 2012. Impact of Manna Oligosaccharide (Bio-Mos®) and Esterified Glucomannan (MTB-100®) Dietary Supplementation on Performance and Health Status of Barki lambs Under Egyptian Conditions. *International Journal of Chemical Engineering and Applications* 3: 264-268.
- Heinrichs, A.J.; Jones, C.M.; Heinrichs, B.S. 2003. Effects of Mannan oligosaccharides or antibiotics in neonatal diets on health and growth of dairy calves. *Journal Dairy Science* 86: 4064-4069.
- Hinders, R. G. and Owen, F. G. 1965. Relation of ruminal parakeratosis development to volatile fatty acid absorption. *Journal of Dairy Science* 48:1069- 1074.
- Huo, W.; Zhu, W.; Mao, S. 2013. Effects of Feeding Increasing Proportions of Corn Grain on Concentration of Lipopolysaccharide in the Rumen Fluid and the Subsequent Alterations in Immune Responses in Goats. *Asian-Australas Journal Animal Science* 26: 1437-1445.
- Johnson, P.J.; Casteel, S.W.; Messer, N.T. 1997. Effect of feeding deoxynivalenol (vomitoxin) - contaminated barley to horses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 9: 219–221.
- Kawas, J.R.; Garcia- Castillo, R.; Garza-Cazares, F.; Fimbres-Durazo, H.; Olivares-Saenz, E.; Hernandez-Vidal, G.; Lu, C.D. 2007. Effects of sodium bicarbonate and yeast on productive performance and carcass characteristics of light-weight lambs fed finishing diets. *Small Ruminants Research* 67: 157-163.
- Khafipour, E.; Krause, D. O.; Plaizier, J. C. 2009. A grain-based sub-acute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation. *Journal Dairy Science* 92: 1060–1070.
- Lei, C.L.; Dong, G.Z.; Jin, L.; Zhang, S.; Zhou, J. 2013. Effects of dietary supplementation of montmorillonite and east cell wall on lipopolysaccharide adsorption, nutrient digestibility and growth performance in beef cattle C.L. *Livestock Science* 158: 57-63.
- Li, G.H.; Ling, B.M.; Qu, M.R.; You, J.M.; Song, X.Z. 2011. Effects of several oligosaccharides on ruminal fermentation in sheep: an in vitro. *Revue Médecine Vétérinaire* 162: 192-197.
- Nagaraja, T. G. and Chengappa, M. M. 1998. Liver Abscesses in Feedlot Cattle: A Review. *Jornal Animal Science* 76:287–298.
- National Research Council - NRC. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7. rev. ed. Washinton, D.C.
- Pinloche, E.; Mcewan, N.; Marden, J.P.; Bayourthe, C.; Auclair, E.; Newbold, C.J. 2013. The Effects of a Probiotic Yeast on the Bacterial Diversity and Population Structure in the Rumen of Cattle. *PLoS ONE* 8: e67824.
- Prophet, E. M.; Millis, B.; Arrington, J. B.; Sobin, H. L. *Laboratory methods in histotechnology*. 1992. Washington D. C. Ed: American Registry of Pathology, 265 p.
- SAS Institute. 2009. SAS Proprietary Software, Release 9.2. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Silberberg, M.; Chaucheyras-Durand, F.; Commun, L. 2013. Repeated acidosis challenges and live yeast supplementation shape rumen microbiota and fermentations and modulate inflammatory status in sheep. *Animal* 7: 1910–1920.
- Simas, J.M.C.; Pires, A.V.; Susin, I.; Santos, F.A.P.; Mendes, C.Q.; Oliveira, R.C.; Fernandes, J.J.R. 2008. Efeitos de fontes e formas de processamento do amido na utilização de nutrientes e parâmetros ruminiais de vacas em lactação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 60: 1128-1134.

- Sniffen, C.J.; O'connor, J.D.; Van Soest, P.J.; Fox, D.G.; Russell, J.B. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *Journal Animal Science* 70: 3562-3577.
- Steele, M. A.; Croom, J.; Kahler, M.; AlZahal, O.; Hook, S. E.; Plaizier, K.; McBride, B.W. 2011. Bovine rumen epithelium undergoes rapid structural adaptations during graininduced subacute ruminal acidosis. *The American Journal of Physiology* 300: 1515-1523.
- Valadares Filho, S. C.; Machado, P. A. S.; Furtado, T.; Chzotti, M. L.; Amaral, H. F. 2015. *Tabelas Brasileiras de Composição de Alimentos para Bovinos, CQBAL 3.0. 1ed Viçosa: UFV.*
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Symposium: Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal Dairy Science* 74: 35-83.
- Vyas, D.; Uwizeye, A.; Mohammed, R.; Yang, W. Z.; Walker, N. D.; Beauchemin, K. A. 2014. The effects of active dried and killed dried yeast on sub-acute ruminal acidosis, ruminal fermentation, and nutrient digestibility in beef heifers. *Journal Animal Science* 92:724-732.
- Williams, P.E.V.; Tait, C.A.G.; Innes, G.M.; Newbold. C.J. 1991. Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces creviceae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation palterns in the rumen of steers. *Journal Animal Science* 69: 3016-3026.
- Zebeli, Q.; Dijkstra, J.; Tafaj, M.; Steingass, H.; Ametaj, B.N.; Drochner, W. 2008. Modeling the adequacy of dietary fiber in dairy cows, based on the responses of ruminal pH and milk fat production to composition of the diet. *Journal Dairy Science* 91, 2046-2066.

VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de dietas com alto teor de grãos exige maior atenção dos produtores e nutricionistas, pois estas dietas podem ocasionar distúrbios no metabolismo ruminal, resultando em acidose ruminal aguda ou subaguda, causando importantes perdas econômicas nos sistemas intensivos de produção.

Neste trabalho, foi demonstrado que a utilização de levedura viva *Saccharomyces cerevisiae* (10^{10} UFC g^{-1}) e MOS (460 g kg^{-1}), nas doses avaliadas nos dois trabalhos ($1,5$ e 2 g kg^{-1} MS) na dieta à base de grãos podem aumentar os valores de pH ruminal e reduzir as concentrações de amônia, além de diminuir a intensidade da acidose ruminal subaguda, reduzindo, principalmente a translocação de lipopolissacarídeos à corrente sanguínea, a ocorrência de hiperqueratose ruminal e a aparição de abscessos hepáticos.

A utilização conjunta de prebióticos e probióticos permitiu diminuir o processo inflamatório observado nos ovinos. Indicando que a suplementação destes aditivos podem ser uma estratégia nutricional interessante para ruminantes terminados em sistemas intensivos de produção.

Por outro lado, para o desempenho, como já mostrado na literatura, os resultados não seguem uma linha consistente, sendo necessário, principalmente a padronização das doses suplementadas, assim como, as cepas de leveduras utilizadas em futuros experimentos.

Sugere-se a realização de novas pesquisas incluindo análises como síntese de proteína microbiana e a caracterização dos microrganismos como, *Megasphaera elsdenii*, *Selenomona ruminantium*, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* os quais ajudariam a explicar os resultados obtidos. Assim como, um número maior de repetições visando aumentar a fidedignidade dos resultados aqui apresentados.