

ÁCIDOS ORGÂNICOS COMO REGULADORES DA FERMENTAÇÃO RUMINAL EM BOVINOS DE CORTE

Data de submissão: 09/04/2023

Data de aceite: 02/06/2023

Liandra Maria Abaker Bertipaglia

(Universidade Brasil, UB, Descalvado-SP.
<http://orcid.org/0000-0001-5811-7816>)

Gabriel Maurício Peruca de Melo

(Universidade Brasil, UB, Descalvado-SP.
<http://orcid.org/0000-0002-1634-4145>)

Wanderley José de Melo

(Universidade Brasil, UB, Descalvado-SP
e Universidade Estadual Paulista, FCAV/
UNESP, Jaboticabal-SP. Pesquisador
Sênior do CNPq. <http://orcid.org/0000-0003-2683-0347>)

Paulo Henrique Moura Dian

(Universidade Brasil, UB, Descalvado-SP.
<http://orcid.org/0000-0002-6949-7831>)

Priscila Fantozi

(Graduação em Agronomia pela
Universidade Brasil. Descalvado-SP.
<http://lattes.cnpq.br/4788150876333302>).

Thiago de Oliveira Alves

(Médico Veterinário, mestrando em
Produção Animal pela Universidade
Brasil. Descalvado-SP. <http://lattes.cnpq.br/1121738989477825>).

da comunidade científica em avaliar alternativas capazes de potencializar a microflora ruminal. Por meio de produtos biologicamente seguros, ou seja, sem a utilização de antibióticos, com a finalidade de alterar o padrão de fermentação ruminal e estimular crescimento bacteriano, além da degradação da parede celular, foi proposto o uso de ácido málico como aditivo na dieta dos ruminantes de alta performance. O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial da ação tamponante do ácido málico na fermentação ruminal *in vitro* de dieta para alto desempenho animal. Na produção acumulada de gases *in vitro* e na digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), em 24 horas de fermentação, não houve diferença entre adição ou não de ácido málico, no entanto, alterações na produção de gás foram observadas no início da fermentação (9 horas). Não foi observada diferença do pH no meio de incubação entre os tratamentos testemunha e com ácido málico. Em todo o período de incubação, as concentrações do ácido láctico foram significativamente inferiores nos tratamentos ácido málico em relação aos testemunha. Conclui-se que o uso do ácido málico no meio de fermentação não afeta a DIVMS, o pH e tem potencial em controlar a

RESUMO: É crescente a preocupação

concentração do ácido láctico, evitando quadros que, na prática, poderiam ocasionar acidose nos bovinos mantidos em dieta de alto grão.

PALAVRAS-CHAVE: aditivo, ácido láctico, ácido málico, ácido orgânico, ph, produção de gases

ORGANIC ACIDS AS REGULATORS OF RUMEN FERMENTATION

ABSTRACT: The scientific community is increasingly concerned with evaluating alternatives capable of enhancing the rumen microflora. By means of biologically safe products, that is, without the use of antibiotics, with the purpose of altering the rumen fermentation pattern and stimulating bacterial growth, besides the degradation of the cell wall, the use of malic acid as an additive in the diet of high-performance ruminants has been proposed. The objective of the present study was to evaluate the potential of malic acid buffering action on in vitro rumen fermentation of high animal performance diet. In the accumulated in vitro gas production and in vitro dry matter digestibility (DIVMS), in 24 hours of fermentation, there was no difference between the addition or not of malic acid, however, changes in gas production were observed at the beginning of fermentation (9 hours). No difference was observed in the pH of the incubation medium between the control and malic acid treatments. Throughout the incubation period, the concentrations of lactic acid were significantly lower in the malic acid treatments compared to the control treatments. It is concluded that the use of malic acid in the fermentation medium does not affect DIVMS, pH and has the potential to control the concentration of lactic acid, avoiding conditions that, in practice, could cause acidosis in cattle kept on high grain diets.

KEYWORDS: additive, lactic acid, malic acid, organic acid, pH, gas production

1 | INTRODUÇÃO

Todos os fatores que influenciam a produção animal são de incontestável importância, no entanto, o fator alimentação tem caráter relevante uma vez que, por si, assume a liderança na composição dos custos da produção.

De modo geral, diante o valor do produto animal, os custos de produção aumentam e as margens de lucro são reduzidas e, além disso, existe o risco da influência marcante de fatores extrínsecos como os agroclimáticos e os mercadológicos, com o custo de produção majoritariamente dolarizado. Nesse cenário, é de fundamental importância otimizar a produção pecuária com ferramentas para conferir competitividade e sustentabilidade ao sistema produtivo.

Na criação de bovinos de corte, no contexto mundial, duas estratégias de alimentação são comumente aplicadas, sendo uma delas a alimentação baseada em pastagem e, a segunda, o confinamento onde os animais são terminados confinados recebendo dietas totais com alto grão (SUMAN et al., 2014). No Brasil é majoritária a porção dos bovinos abatidos com origem nos sistemas em pastagem, no entanto, o sistema em confinamento está muito desenvolvido e, em expansão na sua contribuição de animais abatidos

anualmente.

O confinamento de bovinos deve ser racionalmente planejado e conduzido pelo alto custo que representa. A base da dieta de bovinos em confinamento é composta por ingredientes que, dentre outras características, são commodities, fato este que atribui valor alto neste item da produção. As dietas para bovinos confinados são ricas em concentrados e com baixa quantidade de volumoso, sendo a ingestão de energia o fator mais importante e que afeta o desempenho em ganho de peso de bovinos de corte.

A dieta de bovinos em confinamento é conhecida por ser de alto risco à ocorrência de desordens metabólicas. A inclusão de pequena percentagem de fibra em dietas ricas em grãos ajuda a prevenir desordens nutricionais, tais como acidose, e a maximizar o consumo de energia líquida, permitindo ótimo desempenho zootécnico (GALYEAN e HUBBERT, 2012). De acordo com Owens et.al (1998), as complicações digestivas causadas pela quantidade reduzida de volumoso usado na dieta incluem a acidose ruminal, laminite e timpanismo.

Para que as complicações digestivas de bovinos em confinamento sejam controladas, medidas mitigatórias devem ser adotadas no contexto da alimentação, dentre elas as mais comumente usadas são a incorporação de aditivos alimentares (prebióticos, probióticos e fitobióticos) e a proporção na relação concentrado e volumoso da dieta.

Nesse sentido, o presente trabalho justifica-se pelo fato de propor, uma revisão de trabalhos de pesquisa publicados na área da nutrição de ruminantes e, além disso, a abordagem dos resultados de pesquisa conduzida mediante a avaliação da fermentação *in vitro*, de dieta suplementada com ácido orgânico (ácido málico). A dieta foi caracterizada de alto concentrado (proporção de 80%), frequentemente utilizada na bovinocultura de corte de alta produção, em sistema de confinamento.

Na situação prática, esse tipo de dieta apresenta-se como um risco ou gatilho para um quadro de acidose ruminal, que reflete o desequilíbrio entre a produção microbiana, a utilização microbiana e a absorção ruminal de ácidos orgânicos. A gravidade da acidose, geralmente relacionada à quantidade, frequência e duração da alimentação com grãos, varia desde acidose aguda devido ao acúmulo de ácido láctico, até acidose subaguda devido ao acúmulo de ácidos graxos voláteis no rúmen (NAGARAJA e TITGEMEYER, 2007).

1.1 Fermentação ruminal

O ruminante é capaz de manter condições ruminais que promovam o crescimento dos microrganismos, favorecendo assim, a digestão ou fermentação do alimento que foi consumido. Essa fermentação, juntamente com os mecanismos homeostáticos do animal proporcionam a manutenção da temperatura relativamente constante (39°C) (FURLAN; MACARI; FARIA FILHO, 2011).

No processo de fermentação retículo-ruminal ocorre a conversão dos alimentos, caracterizados como substratos fermentescíveis, principalmente em ácidos orgânicos, que

são absorvidos desse sistema pela parede ruminal. Nos bovinos adaptados a dieta com grãos ou concentrado, uma vez que a disponibilidade de substrato não seja excessiva e a taxa de absorção acompanhe a produção, a fermentação ruminal é estável e o pH ruminal médio é em torno de 5,8 a 6,5.

O pH ruminal é influenciado pela ingestão de carboidratos fermentáveis, capacidade inerente do animal de fornecer tampão e taxas de utilização e absorção de ácidos. Em bovinos de corte alimentados com dietas de alto concentrado, a capacidade do animal de tamponar o rúmen é limitada pela secreção salivar inadequada.

Segundo Bergman (1990), quando a absorção pela parede ruminal for prejudicada por papilas ruminais anormais ou rumenite, a capacidade do animal de manter um pH ruminal estável é afetada. Quando o pH ruminal cai abaixo de 5,6, os ácidos graxos voláteis (AGV) tornam-se mais protonados ou não dissociados, acarretando aumento na sua taxa de absorção, alterando a populações microbianas com o favorecimento das bactérias ácido-láticas, o que reduzirá ainda mais o pH ruminal.

O ácido lático, pelas suas propriedades químico-físicas, apresenta-se mais protonado que os AGV's e, por isso acumula-se no ambiente ruminal, contribuindo para a diminuição drástica do pH nesse meio (GIESECKE e STANGASSINGER, 1980). Na mesma concentração, o lactato reduziria o pH em uma unidade inteira de pH (concentração de H^+ 10 vezes maior) em comparação com o AGV.

O pH é um fator crítico para a função fisiológica normal (motilidade e função absorviva), tão como para a estabilidade geral do rúmen, para as populações microbianas e os produtos da fermentação. Portanto, o pH do meio ruminal, abaixo do fisiológico tem consequências negativas na saúde e desempenho do bovino (COOPER et al., 1998).

Desde o início do uso de grãos na alimentação dos ruminantes, tem-se o conhecimento da acidose ruminal e, é considerada o distúrbio nutricional mais comum em bovinos confinados. O pH ruminal de 5,6 ou inferior é geralmente considerado a referência para a acidose ruminal. Na acidose subaguda, a razão para o pH cair abaixo de 5,6 é o acúmulo de AGV (aumento do substrato e possivelmente diminuição da absorção). Embora o ácido lático seja produzido durante a acidose subaguda, ele não se acumula porque as bactérias fermentadoras de lactato permanecem ativas e rapidamente o metabolizam em AGV (GOAD et al., 1998).

Na condição do pH entre 5,0 e 5,6, é caracterizada a acidose subaguda ou crônica. Se o pH se aproxima de 5,0 ou inferior por período prolongado, o crescimento de bactérias fermentadoras de lactato é inibido e, assim, o lactato começa a se acumular. Portanto, a acidose subaguda tem o potencial de se tornar acidose láctica se o pH de 5,0 for mantido por um tempo. Na condição do pH abaixo de 5,0, aproximando-se de 4,5 ou inferior, é considerada acidose aguda. Na acidose aguda, a razão para o pH atingir 4,5 ou menos é o acúmulo de ácido lático (KRAUSE e OETZEL, 2006).

O acúmulo de lactato só acontecerá quando houver abundância de substrato

(isto é, amido que é extensivamente convertido em glicose), particularmente quando a disponibilidade de glicose exceder sua conversão em intermediários metabólicos. O lactato produz apenas 2 ATP/glicose, mas acredita-se que a produção de lactato seja pelo menos 5 vezes mais rápida do que a fermentação de AGV's (NAGARAJA e TITGEMEYER, 2007). Alterações microbianas ruminais associadas à acidose são reflexo do aumento da disponibilidade de substratos fermentáveis e subsequente acúmulo de ácidos orgânicos.

1.2 Aditivos

O acúmulo de lactato deve ser evitado, especialmente quando as condições acidogênicas suprimem a digestibilidade ruminal da fibra em detergente neutro ou levam a acidose subclínica, prejudicando o desempenho animal. Ferramentas de manejo nutricional como avaliar o tamanho de partícula dos componentes da dieta total, acompanhar a classificação e equilíbrio da fermentação do amido conforme afetada pelo grão em processamento. Devem até certo limite auxiliar no controle da acidose. No entanto, práticas tecnológicas são adotadas por perfazerem a função de evitar que o quadro de distúrbio se instale, de modo muito eficiente.

No Brasil, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento define aditivo como substância intencionalmente adicionada ao alimento com a finalidade de conservar, intensificar ou modificar suas propriedades, desde que não prejudique seu valor nutritivo (BRASIL, 2009).

De acordo com a Instrução Normativa MAPA N° 15 de 26/05/2009, os principais aditivos usados na nutrição de ruminantes são os ionóforos (substâncias naturais produzidas por fermentação de microrganismos (*Streptomyces*)); prebióticos, probióticos (produtos baseados em culturas de organismos vivos não patogênicos que se estabelecem naturalmente no trato digestivo, especialmente no intestino); Inoculantes ruminais (fluido ruminal coletado em abatedouros e liofilizado); Leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*); tamponantes (substâncias utilizadas diminuir as variações no pH do trato digestivo e mantê-lo em níveis normais, sendo os principais bicarbonato de sódio, bicarbonato de potássio, óxido de magnésio e o carbonato de cálcio); outros aditivos (extratos naturais de plantas, taninos, saponinas, óleos essenciais, própolis, ácidos orgânicos) (BRASIL, 2009).

1.3 Ácido Málico

Predominantemente, os ácidos orgânicos fornecidos aos animais são de origem natural, com baixo potencial de toxicidade, pois ocorrem naturalmente no metabolismo celular. A suplementação com ácidos orgânicos ajuda os animais a evitar a queda do pH ruminal; ao mesmo tempo, também ajuda a reduzir a metanogênese no rúmen (SAHOO e JENA, 2014). Os ácidos orgânicos podem estimular o crescimento de bactérias ruminais, como *Selenomonas ruminantum*, alterando o padrão de fermentação desses microrganismos (MARTIN et al., 1999).

Estudos sugerem que os ácidos orgânicos aspartato, fumarato e, em especial, o malato presentes no rúmen, podem estimular a absorção de lactato pela bactéria *Selenomonas ruminantium*, sendo que o malato confere resposta significativa nessa ação de prevenir ou corrigir uma queda no pH ruminal associada à acidose ruminal (MARTIN e PARK, 1996), podem reduzir a metanogênese (ASANUMA et al., 1999).

Segundo Martin (1998), com base na capacidade de *S. ruminantium* crescer em malato na presença de hidrogênio extracelular e produzir succinato, o malato pode agir como um coletor de elétrons para o hidrogênio, na via succinato-propionato usada por *S. ruminantium*. A incorporação de DL-malato em fermentações de amido solúvel e milho rachado com microrganismos ruminais mistos alterou o pH final, concentração de CH₄, e de AGV de maneira análoga aos efeitos dos ionóforos.

Além disso, os ácidos orgânicos representam outro efeito complementar no ambiente ruminal sobre o potencial de tamponar o pH ruminal. Como a produção de propionato é um processo redutor, o microrganismo lactolítico que produz propionato pela via do succinato teria ainda mais [2H] para eliminar, quando o lactato fosse convertido em piruvato. Portanto, observou-se que as cepas lactolíticas de *Selenomonas* melhoraram a absorção de lactato quando as culturas foram dosadas *in vitro* com malato e fumarato. Esse autor explicou que esses ácidos dicarboxílicos podem ser incluídos em rações (MARTIN, 1998).

Estudo realizado em condição *in vitro* avaliou o uso dos ácidos orgânicos citrato, transaconitato, malato, malonato, quinato e shiquimato na fermentação de forragens. Os autores relatam que, após a adaptação da microbiota ruminal aos ácidos orgânicos, estes são fermentados e transformados rapidamente em AGV, cerca de 10 horas, sendo o acetato e o propionato os principais produtos finais (RUSSELL e Van SOEST, 1984).

Martin e Streeter (1995), observando o efeito da fermentação *in vitro* do malato pelas bactérias ruminais, verificaram que, na ausência de fornecimento de carboidratos, a adição de DL-malato aumentou significativamente a concentração de propionato, diminuindo a relação acetato/propionato, não se observando alterações significativas no pH do meio. Assim como Russell e Van Soest (1984), Martin e Streeter (1995) observaram que a fermentação do malato em culturas de microrganismos ruminais produz acetato e propionato.

2 | MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo, anteriormente foi submetido para avaliação e amparo ético da Comissão de Ética para Uso de Animais – CEUA, Universidade Brasil (Protocolo nº 2100014).

Diante do delineamento inteiramente casualizado, em esquema de análise fatorial como medidas repetidas no tempo, os tratamentos avaliados foram: T1. Testemunha; T2. Ácido málico (equivalente a 80 g animal/dia).

O período experimental foi relativo ao tempo de incubação de 24 horas, com as avaliações nos horários 0, 3, 6, 9, 12 e 24 horas para degradação da matéria seca, cinética de produção de gases e pH e, os tempos de 3, 12 e 24 horas para a concentração do ácido láctico no meio de fermentação (Figura 1). O parâmetro pH foi determinado com 4 repetições por tratamento (um frasco para controle entre sistemas de incubação) e, os demais, com 3 repetições.

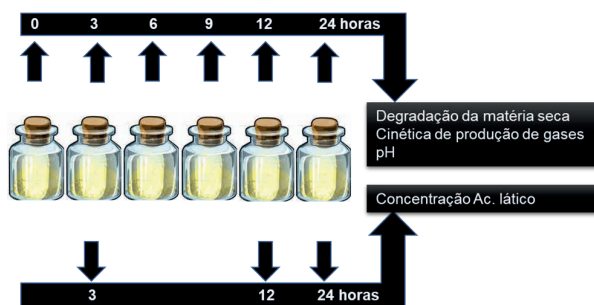


Figura 1. Diagrama de amostragem do meio de fermentação ruminal *in vitro*, em função do tempo de avaliação proposto para a determinação da degradação da matéria seca, cinética de produção de gases, pH e ácido láctico. **Fonte:** Arquivo pessoal.

A quantidade do aditivo (ácido málico) nas garrafas de incubação foi calculada com base no consumo de matéria seca de bovino de corte, com peso vivo fixado de 360 kg e ingestão de matéria seca de 2,5% PV (2,0% PV para a ingestão do concentrado).

Foi realizado o ensaio de produção de gases *in vitro*, utilizando a técnica descrita por Theodorou et al., (1994), com transdutor de pressão. Na incubação, para cada repetição, foi incubado 1,0 g de substrato moído (dieta 80% concentrado) em um frasco de vidro com 160 mL de capacidade, procedeu-se a inclusão do ácido málico e, posteriormente, 75 mL de inóculo diluído (25 mL de inóculo + 50 ML de solução tampão Menke) de acordo com Longo et al. (2006).

Uma vez colocado o inóculo ruminal, os frascos de vidro foram fechados com tampas de borracha e lacrados com anéis de alumínio. O conteúdo foi homogeneizado por agitação manual e, mantidos no banho maria à temperatura de 39°C (Figura 2A). Foram incluídos frascos contendo as soluções de incubação, sem amostra, e com os tratamentos avaliados, individualmente, como prova em branco.

Foi mensurada a produção de gases *in vitro*, registrando-se a pressão no interior do frasco com manômetro digital (*Pressure Meter Delta OHM-HD 2124.1*) (Figura 2B), nos horários de incubação de 3, 6, 9, 12 e 24 horas.

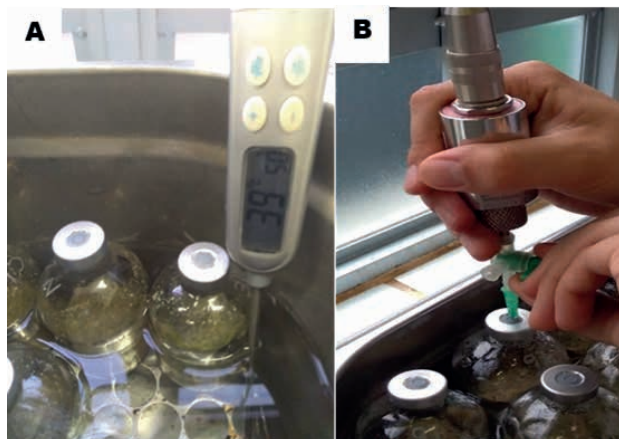


Figura 2. Em **A**, banho maria em 39°C, usado no ensaio de fermentação *in vitro*. Em **B**, leitura da pressão interna das garrafas em banho-maria, com auxílio de manômetro digital. **Fonte:** Arquivo pessoal.

A transformação dos dados de leitura de pressão medida em polegada quadrada (PSI) para volume (mL) foi realizada através de equação ($R^2 = 0,999$) determinada no local da execução do ensaio ($Y = 0,2839 X1$; (Y é o volume de gases (mL) e X é a pressão (psi)).

A degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) foi avaliada de acordo com Mauricio et al. (2003), ao final dos tempos de incubação da produção de gases *in vitro* (3, 6, 9, 12 e 24 horas). Na avaliação da degradabilidade *in vitro*, os frascos de cada tratamento, nos tempos de avaliação, tiveram seus conteúdos filtrados em cadinhos tipo Gooch (poros de 40 a 100 μm) previamente pesados, sendo o material retido (resíduo) lavado com água destilada quente. Em seguida, os cadinhos foram levados para estufa a 100°C - 105°C, por 24 horas, para determinação da degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS). Para fins de cálculo da DIVMS, foram determinados os teores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM) e matéria orgânica (MO) das amostras, seguindo o procedimento padrão (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, 1995).

Na quantificação do pH do meio de fermentação, foi amostrada a fração líquida que ficou retida no recipiente Kitassato, após a filtragem a vácuo para a obtenção do resíduo da fermentação dos frascos de incubação. O pH das amostras foi determinado utilizando um peagômetro com prévia calibração com soluções tampão padrões pH = 4,0 e pH = 7,0, conforme método 017/IV descrito em Instituto Adolf Lutz, diretamente no meio de fermentação *in vitro* (0, 3, 6, 9, 12 e 24 horas de incubação).

Nos parâmetros avaliados, quando da existência de distribuição normal do erro e de homogeneidade de variâncias os dados foram analisados como um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial como medidas repetidas no tempo, com dois tratamentos experimentais, 5 tempos de incubação. Na condição do teste F significativo, foi procedida a comparação de médias pelo teste de Tukey 5%. Quando da ausência de

distribuição normal do erro e homogeneidade de variância, mesmo após a transformação dos dados, procedeu-se a comparação por análises por testes não paramétricos.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de gases *in vitro*

Quanto à produção de gases *in vitro* acumulada nos tempos de incubação (mL.g MS⁻¹), os resultados estão apresentados na Tabela 1. Ao comparar os tratamentos avaliados, houve diferença entre eles apenas no tempo de 9 horas com produção de gás acumulada superior no tratamento testemunha.

Observou-se, em cada tratamento, a produção acumulada de gases crescente até 24 horas de incubação ($p < 0,05$).

Tratamentos	Tempos de incubação				
	3	6	9	12	24
Testemunha	10,6 Ae	22,6 Ad	52,2 Ac	90,3 Ab	132,2 Aa
Ácido Málico	12,2 Ae	21,1 Ad	44,6 Bc	90,7 Ab	134,5 Aa

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença na coluna e letras minúsculas diferentes indicam diferença na linha. Tratamentos: Testemunha (sem adição de ácido orgânico); Ácido málico (equivalente a 80 g animal. dia⁻¹).

Tabela 1. Produção acumulada de gases *in vitro* (mL.g MS⁻¹), em 24 horas de incubação.

3.2 Degradação *in vitro* da matéria seca

Na Tabela 2 estão apresentados os valores médios da degradação *in vitro* da matéria seca (DIVMS). Observa-se não haver influência do ácido málico sobre a DIVMS nos tempos de incubação 0, 3, 12 e 24 horas, sendo os valores semelhantes entre si ($p > 0,05$). Especificadamente, no tempo de 9 horas de incubação a DIVMS foi maior no tratamento Testemunha em relação ao observado nos resultados desse parâmetro proporcionados pelo tratamento Ácido Málico ($p < 0,05$).

Na análise dos tratamentos, individualmente, nos tempos de incubação observa-se a degradação superior ao final da incubação ($p < 0,05$), apresentando comportamento crescente da degradação *in vitro* da matéria seca (% MS), em função do tempo (Tabela 2).

Tratamentos	Tempos de incubação					
	0	3	6	9	12	24
Testemunha	3,1 Af	4,5 Ae	8,1 Ad	20,3 Ac	38,8 Ab	57,4 Aa
Ácido málico	3,5 Ae	4,6 Ae	8,4 Ad	15,6 Bc	38,9 Ab	59,8 Aa

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença na coluna e letras minúsculas diferentes indicam diferença na linha. Tratamentos: Testemunha (sem adição de ácido orgânico); Ácido málico (equivalente a 80 g animal. dia⁻¹).

Tabela 2. Valores médios da degradação *in vitro* da matéria seca (% MS) no período de incubação de 24 horas, em função da aplicação dos tratamentos.

3.3 pH do meio de incubação

Os resultados dos valores de pH do meio de incubação (fermentação ruminal) *in vitro* estão apresentados na Tabela 3. Observa-se não haver alteração do valor de pH entre os tratamentos aplicados, nos tempos avaliados ($p > 0,05$). Ao analisar cada tratamento constatou-se que no tratamento Testemunha, houve diminuição ($p < 0,05$) do pH do meio, no tempo de 6 horas, em relação ao início da incubação (0 horas). A queda do pH do meio de incubação foi significativamente maior, quando comparada com o tempo 6, em 12 e 24 horas. No tratamento Ácido Málico, o valor de pH do meio inicialmente difere estatisticamente do observado no tempo de 6 horas de incubação, que se distinguiu dos tempos de 9, 12 e 24 horas, sendo observados valores inferiores ($p < 0,05$).

Tratamentos	Tempos de incubação (horas)					
	0	3	6	9	12	24
Testemunha	7,29 Aa	7,25 Aa	7,00 Ab	6,69 Aabcd	6,37 Ac	6,25 Ad
Ácido málico	7,23 Aa	7,14 Aabc	6,97 Ab	6,71 Ac	6,36 Ad	6,33 Ad

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença na coluna e letras minúsculas diferentes indicam diferença na linha. Tratamentos: Testemunha (sem adição de ácido orgânico); Ácido málico (equivalente 80 g animal. dia⁻¹).

Tabela 3. Valores de pH do meio de incubação *in vitro* obtidos em função da aplicação dos tratamentos, nos tempos de incubação *in vitro*, medidos em horas.

De acordo com Imamidoost e Cant (2005), o pH afeta as taxas de degradação da fibra, sendo que o meio de fermentação ruminal *in vitro* com o pH de 6,7 proporciona 90% da velocidade máxima da taxa de degradação.

3.4 Concentração de ácido láctico *in vitro*

Na Tabela 6 estão apresentados os valores médios da concentração do ácido láctico no meio de fermentação. Observa-se, em todo o período de incubação, as concentrações do ácido láctico significativamente inferiores nos tratamentos Ácido Málico em relação aos do Testemunha. Pode-se inferir que a presença do ácido málico condicionou o ambiente

ruminal *in vitro*, mesmo na condição da fermentação de uma dieta de alto grão, e acúmulo do ácido láctico no período de incubação.

Os ácidos orgânicos podem acumular-se e reduzir pH se a remoção dos mesmos do rúmen e o tamponamento ruminal não puderem acompanhar sua produção (DIJKSTRA et al., 2020). Nos ruminantes, a principal via de remoção dos ácidos orgânicos acumulados é a absorção pela parede ruminal (ASCHEBACH et al., 2011), o que não ocorre em um meio *in vitro* de avaliação da fermentação ruminal. No caso do tamponamento, por exemplo, pode-se usar dietas com partículas longas de forragem podem promover a ruminação e a secreção salivar, o que auxilia tamponar os ácidos produzidos pela fermentação da ração no rúmen e, além desse fator, pode-se incluir aditivos na dieta que possam exercer essa função.

Ao comparar os tratamentos avaliados no tempo de incubação, observa-se que o Testemunha apresentou maior concentração de ácido láctico em 24h ($p < 0,05$), em relação a 3 ou 12 horas, quando foram semelhantes entre si. O tratamento Ácido Málico proporcionou concentração de ácido láctico diferente em todos os tempos, sendo a menor concentração no tempo de 3 horas de incubação, elevando-se às 12 horas e até às 24 horas.

Tratamentos	Tempos de incubação		
	3	12	24
Testemunha	6,5 Ab	8,9 Ab	19,9 Aa
Ácido málico	1,8 Bc	6,7 Bb	8,5 Ba

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença na coluna e letras minúsculas diferentes indicam diferença na linha. Tratamentos: Testemunha (sem adição de ácido orgânico); Ácido málico (equivalente 80 g animal. dia⁻¹).

Tabela 6. Valores médios de ácido láctico (mg/100 mL) produzidos no meio de incubação *in vitro* obtidos em função da aplicação dos tratamentos, nos tempos de incubação *in vitro*, medidos em 3, 12 e 24 horas.

4 | CONCLUSÕES

Concluiu-se que o uso do ácido málico no meio de fermentação ruminal *in vitro*, quando comparado com o meio testemunha, ou seja, sem o ácido orgânico, não altera a degradação da matéria seca do substrato, produção de gases e pH, em 24 horas de fermentação, no entanto, é eficiente ao controlar a concentração do ácido láctico no meio.

REFERÊNCIAS

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists**. 16th ed. Washington, 1995.

ASANUMA, N.; IWAMOTO, M.; HINO, T. Effect of the addition of fumarate on methane production by ruminal microorganisms *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v.82, p. 780–787, 1999.

- ASCHENBACH, J.R.; PENNER, G.B.; STUMPF, F.; GÄBEL, G. Ruminant nutrition symposium: role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. **Journal of Animal Science**, v.89, p.1092-1107, 2011
- BERGMAN, E.N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, v.70, p. 1580-1588, 1990.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa MAPA nº 15 de 26/05/2009. Regulamenta o registro dos estabelecimentos e dos produtos destinados à alimentação animal, e dá outras providências. Brasília: **Diário Oficial da União**; 28 de maio de 2009.
- COOPER, R.J.; KLOPFENSTEIN, T.J.; STOCK, R.A.; PARROTT, J.C. Observations on acidosis through continual feed intake and ruminal pH monitoring. **Nebraska Beef Report**. University of Nebraska, Lincoln. p. 75–76, 1998.
- DIJKSTRA, J.; VAN GASTELEN, S.; DIEHO, K.; NICHOLS, K.; BANNINK, A. Review: Rumen sensors: data and interpretation for key rumen metabolic processes. **Animal**, v. 14, Sup. 1, p.176-s186, 2020.
- FURLAN, R. L.; MACARI, M.; FARIA FILHO, D. E. Anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Eds.). **Nutrição de ruminantes**. 2a. ed. Jaboticabal: Funep, 2011. p. 1 – 25.
- GALYEAN, M.L.; M.E. HUBBERT. 2012. Traditional and alternative sources of fiber – roughage values, effectiveness, and concentrations in starting and finishing diets. In: **2012 Plains Nutrition Council Spring Conference**. p.74-97.
- GIESECKE, D.; STANGASSINGER, M. **Lactic acid metabolism**. In: RUCKEBUSCH Y. THIVEND P. Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants. AVI Publ. Co, Westport, CT. p.523-539, 1980.
- GOAD, D.W.; GOAD, C.L.; NAGARAJA, T.G. Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. **Journal Animal Science**, v.76, p. 234-241, 1998.
- IMAMIDOOST, R.; CANT, J. P. Non-steady-state modeling of effects of timing and level of concentrate supplementation on ruminal pH and forage intake in high-producing, grazing ewes. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 5, p. 1102–1115, 2005.
- KAMRA, D.N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, v.89, p.125-135, 2005.
- KOIKE, S.; KOBAYASHI, Y. Fibrolytic rumen bacteria: their ecology and functions. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, 2009, v. 22, n. 1, p. 131 - 138.
- KRAUSE, K.M.; OETZEL, G.R. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. **Animal Feed Science and Technology**, v.126, p. 215-236, 2006.
- LONGO, C.; BUENO, I. C. S.; NOZELLA, E. F.; GODOY, P. B.; CABRAL FILHO, S. L. S.; ABDALLA, A. L. The influence of head-space and inoculum dilution on in vitro ruminal methane measurements. **International Congress Series** 1293, p. 62-65, 2006.
- MARTIN, S.A.; STREETER M.N. Effect of Malate on In vitro Mixed Ruminal Microorganism Fermentation. **Journal of Animal Science**, v.73, p.2141-2145, 1995.

- MARTIN, S.A.; STREETER, NISBET, D.J.; HILL, G.M. et al. Effects of DL-malate on ruminal metabolism and performance of cattle fed high concentrate diet. **Journal of Animal Science**, v.77, p.2141-2145, 1999.
- MAURÍCIO, R. M.; MOULD, F. L.; DHANOA, M. S.; OWEN, E.; CHANNA, K. S.; THEODOROU, M. K. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 79, n. 4, p. 321-330, 1999.
- MAURÍCIO, R.M.; PEREIRA, L.G.R.; GONÇALVES, L.C. et al. Relação entre pressão e volume para a implantação da técnica in vitro semi-automática de produção de gases na avaliação de forrageiras tropicais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n. 2, p.216-219, 2003.
- NAGARAJA, T.G.; TITGEMEYER, E.C. Ruminal acidosis in beef cattle: The current microbiological and nutritional outlook. **Journal of Dairy Science**, v.90 (E. Suppl.), pp. E17-E38. 2007.
- OWENS, F. N., D. S. SECRIST, W. J. HILL, AND D. R. GILL. 1998. Acidosis in cattle: A review. **Journal Animal Science**, v.76:275-286.
- PELL, A. N.; SCHOFIELD, P. (1993). Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. **Journal of Dairy Science**, v.76, n.4, p.1063-1073
- RUSSELL, J.B.; VAN SOEST, P.J. In vitro ruminal fermentation of organic acids common in forage. **Journal of Applied Microbiology**, v.47, p.155-159, 1984.
- SAHOO, A.; JENA, B. Organic acids as rumen modifiers. **International Journal of Science and Research**, v.3, p.2262–2266, 2014.
- THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M.S.; MCALLAN, A.B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.48, p.185-197, 1994.