



**JULIA DIANE LIMA DIAS**

**SUPLEMENTAÇÃO DE VACAS EM LACTAÇÃO COM  
CULTURA DE LEVEDURA DURANTE O VERÃO**

**LAVRAS - MG**

**2017**

**JULIA DIANE LIMA DIAS**

**SUPLEMENTAÇÃO DE VACAS EM LACTAÇÃO COM CULTURA DE LEVEDURA  
DURANTE O VERÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras. Como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção e Nutrição de Ruminantes, área de concentração em Zootecnia, para a obtenção do Título de Mestre.

Prof. Dr. Marcos Neves Pereira

Orientador

**LAVRAS - MG**

**2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA,  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Dias, Julia Diane Lima.

Suplementação de vacas em lactação com cultura de levedura durante o verão / Julia Diane Lima Dias. – Lavras : UFLA, 2017.  
101 p. : il.

Orientador: Marcos Neves Pereira.

Dissertação(mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Estresse por calor 2. Niacina 3. Levedura. I. Pereira, Marcos Neves. II. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**Julia D. Lima Dias**

**Suplementação de vacas em lactação com cultura de levedura morta durante o verão**

**Supplementation of dairy cows during summer with yeast culture**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras. Como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Zootecnia, para a obtenção do Título de Mestre.

APROVADA em 20 de abril de 2017.

Dr. Marcos Neves Pereira - UFLA

Dr.<sup>a</sup> Carla Luiza da Silva Ávila – UFLA

Dr. Rafael Canonenco de Araujo – GRASP Indústria e Comércio Ltda.

Prof. Dr. Marcos Neves Pereira

Orientador

**LAVRAS - MG**

**2017**

Aos meus pais, Diana e Rogério, aos meus irmãos Jéssica e Rogério Gabriel, e à minha avó Maria  
Perpétua.

DEDICO

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Zootecnia (DZO), pela oportunidade concedida para realização do mestrado. Aos professores e funcionários do Departamento de Zootecnia (DZO).

Ao professor Dr. Marcos Neves Pereira pelo seu tempo e orientação. À Dr.<sup>a</sup> Renata Apocalypse Nogueira Pereira pelo apoio.

Ao Grupo do Leite, por me acolherem.

À equipe da Fazenda São Francisco: Carlinhos, Sebastião (Tião), Geraldo, Sr. Antônio e Josie.

Aos bolsistas de iniciação científica por todo auxílio.

À minha irmã Jéssica, por tudo.

A todos os amigos, e em especial a Eugenio Barbosa, Gustavo Cariêlo e Fernanda Gomes, tão presentes nessa caminhada.

“Torna-te quem tu és.”

F. Nietzsche

## RESUMO

A suplementação de vacas leiteiras com aditivos à base de leveduras pode aumentar a digestibilidade da dieta, o teor plasmático de niacina, a dissipação de calor e o desempenho leiteiro. Foi avaliada a resposta de vacas da raça Holandesa em final de lactação ( $234 \pm 131$  DEL) à cultura de levedura morta (YC, 15 g/d, Factor SC, Grasp, *Saccharomyces cerevisiae*) durante o verão (ITU > 68 por 92,2% do tempo). Trinta e duas vacas foram alimentadas com dieta de padronização por 14 dias e os tratamentos Controle (CTL) ou YC foram fornecidos por 35 d, em delineamento de blocos inteiramente casualizados ajustado para covariável. Os resultados foram avaliados por 5 semanas como medidas repetidas no tempo. Vacas foram ordenhadas 3x/d e os tratamentos foram fornecidos via oral a cada vaca antes das ordenhas. O teor de niacina plasmática foi 1,50 e 1,66  $\mu\text{g/mL}$  em CTL e YC respectivamente ( $P = 0,02$ ). A YC reduziu a temperatura retal, frequência respiratória e temperatura da superfície corporal e tendeu a aumentar a taxa de sudorese ( $P = 0,13$ ) avaliadas duas vezes por semana ( $P \leq 0,05$ ) às 07:30, 15:00 e 22:00 h. A proporção de vacas com temperatura retal acima de 39,2 °C no CTL e YC foi, respectivamente: 8 e 0 % às 07:30 h, 52 e 25 % às 15:00 h e 35 e 26 % às 22:00 h. ( $P \leq 0,05$ ; GENMOD do SAS). O teor de glicose nas semanas 3 e 5 aumentou em YC ( $P = 0,01$ ). A digestibilidade aparente no trato total dos nutrientes, o teor de N-ureico no plasma, o perfil de AGV no rúmen, excreção urinária de alantoína, a ingestão e atividade mastigatória, e a proporção do alimento ingerido pela manhã, à tarde e à noite não foram afetados pelos tratamentos ( $P \geq 0,16$ ). Vacas no CTL rejeitaram partículas da dieta > 19 mm pela manhã ( $P = 0,02$ ), à tarde foram menos seletivas contra partículas longas ( $P = 0,05$ ) e a favor de partículas < 8 mm ( $P = 0,03$ ), e não rejeitaram partículas finas à noite ( $P = 0,05$ ). A produção de leite foi de 30,5 kg/d no CTL e 30,2 kg/d em YC ( $P = 0,58$ ). Em YC houve redução do CMS (19,4 vs. 20,3 kg/d;  $P = 0,04$ ) e aumento da eficiência alimentar medida pela relação entre leite e consumo (1,64 vs. 1,50;  $P = 0,05$ ). A produção e o teor de sólidos no leite, o escore linear de células somáticas e o teor de N-ureico no leite não diferiu entre tratamentos ( $P \geq 0,21$ ). O tratamento YC aumentou o teor plasmático de niacina, melhorou a dissipação de calor e aumentou a eficiência alimentar de vacas leiteiras em final de lactação.

**Palavras-chave:** estresse por calor, niacina, levedura

## ABSTRACT

The supplementation of dairy cows with yeast-based products may increase diet digestibility, plasma niacin concentration, heat dissipation, and lactation performance. We evaluated the response of Holsteins in late lactation ( $234 \pm 91$  DIM) to dead yeast culture (YC, 15 g/d, Factor SC, Grasp, *Saccharomyces cerevisiae*) during Brazilian summer (THI > 68 for 92.2% of time). Thirty-two cows were individually fed a standard TMR for 14 d and treatments Control (CTL) or YC for 35 d, in a covariate adjusted randomized block design. Response was evaluated in week 5 or as repeated measures over time. Cows were milked 3x/d and treatments were orally dosed to each cow after each milking. Plasma niacin was 1.50 and 1.66  $\mu\text{g/mL}$  on CTL and YC, respectively ( $P = 0.02$ ). The YC reduced rectal temperature, respiratory rate, and body surface temperature ( $P \leq 0.05$ ) and tended to increase the sweating rate ( $P = 0.13$ ) evaluated twice per week at 0730, 1500, and 2200 h. The proportion of cows with rectal temperature  $\geq 39.2$  °C on CTL and YC was, respectively: 8 and 0 % at 0730 h, 52 and 25% at 1500 h, and 35 and 26 % at 2200 h ( $P \leq 0.05$ , GENMOD of SAS). Plasma glucose in weeks 3 and 5 were increased by YC ( $P = 0.01$ ). The total tract apparent digestibility of nutrients, plasma urea-N concentration, ruminal VFA profile, urinary allantoin excretion, ingestion and chewing behavior, and the proportion of daily intake in the morning, afternoon, and night were not affected by treatment ( $P \geq 0.16$ ). Cows on CTL rejected feed particles > 19 mm in the morning ( $P = 0.02$ ), in the afternoon were less selective against long feed particles ( $P = 0.05$ ) and in favor of particles < 8 mm ( $P = 0.03$ ), and did not sort against short particles at night ( $P = 0.05$ ). Milk yield was 30.5 kg/d for CTL and 30.2 for YC ( $P = 0.58$ ). The YC reduced DMI (19.4 vs. 20.3 kg/d,  $P = 0.04$ ) and increased the milk to DMI ratio (1.64 vs. 1.50,  $P = 0.05$ ). Milk solids yield and concentration, linear SCC score, and MUN did not differ ( $P \geq 0.21$ ). The YC increased plasma niacin concentration, heat dissipation, and feed efficiency of late lactation dairy cows.

**Keywords:** heat stress, niacin, yeast

## LISTA DE FIGURAS

- Figure 1.** Temperature, humidity, and temperature-humidity index (THI) inside the tie stall. Temperature:  $24.1 \pm 3.7$  °C (Mean  $\pm$  SD). Humidity:  $82.4 \pm 12.3$  %. THI:  $72.7 \pm 4.1$ . THI  $\geq$  68: 92.2 % of time. THI  $\geq$  72: 44.6 % of time. Minimum daily THI:  $67.6 \pm 1.2$ . Maximum daily THI:  $80.5 \pm 1.8$ . 1680 recordings at 30-min intervals.....99
- Figure 2.** Yeast culture in a Neubauer chamber stained with methylene blue indicative of non-viable cells (400x magnification).....100
- Figure 3.** Plasma niacin concentration on d 35 at 12 h post-feeding on treatments Control and Yeast.  $P = 0.02$ .....100
- Figure 4.** Plasma glucose concentration on weeks 3 and 5 at 12 h post-feeding on treatments Control and Yeast.  $P = 0.01$  for the effect of treatment,  $P < 0.01$  for the effect of week, and  $P = 0.45$  for the interaction of treatment and week.....101

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração total de ácidos graxos voláteis (AGV), acetato, propionato, relação A:P, outros AGV, metano e amônia no fluido ruminal em estudos in vitro e in vivo com aditivos à base de leveduras vivas (LV) e cultura de levedura (CL).....	27
<b>Table 1.</b> Composition in ingredients and particle size of the offered TMR and in nutrients of the consumed TMR (% of DM) on treatments Control (CTL) and Yeast (YC).....	92
<b>Table 2.</b> Feed intake, lactation performance, MUN, feed efficiency, BW, BW change, BCS, and linear SCC on treatments Control (CTL) and Yeast (YC) .....	93
<b>Table 3.</b> Rectal and skin temperatures and respiration rate on treatments Control (CTL) and Yeast (YC).....	94
<b>Table 4.</b> Proportion of cows (% of total) with rectal temperature $\geq 39.2$ °C and with at least 1, 2, $\geq 3$ measurements of rectal temperature $\geq 39.2$ °C at 0730, 1500, and 2200 h on treatments Control (CTL) and Yeast (YC). Data obtained on d 4 and 7 weekly throughout the 5-week comparison period .....	95
<b>Table 5.</b> Body surface area, sweating rate, rectal temperature, evaporative heat loss, and total stored heat on treatments Control (CTL) and Yeast (YC).....	95
<b>Table 6.</b> Jugular blood acid-base balance 8 h post-feeding on d 26 on treatments Control (CTL) and Yeast (YC).....	96
<b>Table 7.</b> Total tract apparent digestibility (D) of DM, OM, NDF, starch, and non-NDF OM, urinary allantoin excretion, and Allantoin per DOMI measured on d 27 to 29 on treatments Control (CTL) and Yeast (YC).....	96
<b>Table 8.</b> Plasma urea-N (PUN) 0, 2, and 4 h post-feeding on d 34 on treatments Control (CTL) and Yeast (YC).....	96
<b>Table 9.</b> Molar proportion of VFA, pH, and protozoa concentration in rumen fluid on d 35 on treatments Control (CTL) and Yeast (YC) .....	97
<b>Table 10.</b> Chewing activity, intake pattern, and time laying down on d 30 to 32 on treatments Control (CTL) and Yeast (YC).....	97
<b>Table 11.</b> Proportion of intake in periods of the day and feed sorting behavior on d 30 to 32 on treatments Control (CTL) and Yeast (YC).....	98

## LISTA DE SIGLAS

**AGNE** - Ácidos graxos não-esterificados  
**AGV** - Ácidos graxos voláteis  
**BEN** - Balanço energético negativo  
**BSTr** - Somatotropina bovina recombinante  
**CY** - Cultura de levedura  
**DEL** - Dias em lactação  
**FDN** - Fibra em detergente neutro  
**GY** - Cultura de levedura acrescida de glicerol  
**HS** - Estresse por calor  
**HS0** - Alto amido sem levedura  
**HS2** - Alto amido com 2 g/d de levedura  
**HS4** - Alto amido com 4g/d de levedura  
**HSP70** - Proteína de resistência ao choque térmico  
**ITU** - Índice de temperatura e umidade  
**LCE** - Leite corrigido para energia  
**LCG** - Leite corrigido para gordura  
**LS0** - Baixo amido sem levedura  
**MO** - Matéria orgânica  
**MS** - Matéria seca  
**NAD** - Nicotinamida-adenina nucleotídeo  
**PCO2** - Pressão de CO2  
**PF** - Consumo pareado  
**PK** - Constante de dissociação  
**Proporção A:P** - Relação proporcional entre acetato e propionato  
**S** - Coeficiente de solubilidade do CO2 no plasma  
**TAE** - Temperatura Ambiental Efetiva  
**WCS-C** - Carço de algodão coberto com amido gelatinizado  
**WCS-Y** - Carço de algodão coberto com amido gelatinizado acrescido de levedura  
**YC-EHY** - Cultura de levedura enzimaticamente hidrolisada

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1</b>	<b>Objetivo .....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Estresse por calor.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Índice de temperatura e umidade (ITU) e ambiente térmico .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Respostas fisiológicas de animais submetidos ao estresse por calor .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1.3</b>	<b>Impacto do estresse por calor sobre o consumo de alimentos, metabolismo de energia e produção de leite .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1.4</b>	<b>Balanco ácido-básico sanguíneo em animais submetidos a estresse por calor .....</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>Leveduras na alimentação de vacas leiteiras.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>Aditivos à base de leveduras na alimentação de vacas leiteiras .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2</b>	<b>Ação de aditivos à base de leveduras sobre a digestão ruminal .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Concentração de AGV, metano e amônia.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Estímulo a microrganismos ruminais por malato .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Estímulo a microrganismos ruminais por aditivos à base de leveduras.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Modulação do pH ruminal .....</b>	<b>34</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Concentração de O<sub>2</sub> no fluido ruminal .....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.6</b>	<b>Digestibilidade de nutrientes .....</b>	<b>37</b>
<b>3.3</b>	<b>Consumo de alimentos e desempenho leiteiro de vacas suplementadas com leveduras .....</b>	<b>39</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Consumo de alimentos e produção de leite.....</b>	<b>39</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Produção de sólidos no leite .....</b>	<b>42</b>
<b>3.4</b>	<b>Suplementação de leveduras para vacas em lactação sob estresse por calor .....</b>	<b>44</b>
<b>3.5</b>	<b>Suplementação de leveduras e parâmetros metabólicos sanguíneos .....</b>	<b>47</b>
<b>3.6</b>	<b>Suplementação de leveduras e comportamento alimentar .....</b>	<b>48</b>
<b>4</b>	<b>Niacina .....</b>	<b>50</b>
<b>4.1</b>	<b>Suplementação de niacina para vacas em lactação .....</b>	<b>53</b>
<b>4.2</b>	<b>Niacina e o metabolismo energético .....</b>	<b>54</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>57</b>
	<b>Capítulo 2 – ARTIGO .....</b>	<b>70</b>
	<b>Supplementation of dead yeast culture to lactating dairy cows during hot season.....</b>	<b>70</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O efeito benéfico de aditivos à base de leveduras sobre o desempenho de vacas em lactação tem sido relatado (DESNOYERS et al., 2009). Leveduras vivas (ativas) e as mortas com seus metabólicos podem melhorar a função ruminal, induzindo ganho em digestibilidade de nutrientes e controle de acidose ruminal (CHAUCHEYRAS-DURAND et al., 2008). Recentemente também foi observado que a suplementação com leveduras vivas e mortas pode aumentar a síntese ruminal de niacina (SALVATI et al., 2015), capaz de ter efeito positivo sobre a circulação periférica e a perda de calor metabólico (ZIMBELMAN et al., 2010). A parede celular de leveduras também tem potencial para atuar positivamente sobre a função imune de vacas leiteiras (ZAWORSKI et al., 2014).

A seleção para alta produção de leite tem aumentado a sensibilidade de vacas leiteiras ao estresse por calor, devido ao aumento no consumo de nutrientes digestíveis e, conseqüentemente, na produção de calor metabólico (KADZERE et al., 2002). O estresse por calor causa grande prejuízo financeiro à indústria leiteira mundial por induzir queda na produção de leite, na eficiência reprodutiva e na longevidade dos animais (ST-PIERRE; COBANOV; SCHNITKEY, 2003). Vacas sujeitas a estresse por calor têm redução no consumo de matéria seca, maior propensão a ter acidose ruminal (MISHRA et al., 1970), são mais dependentes de glicose como substrato energético (BAUMGARD; RHOADS, 2015), podem ter deficiência imunológica (BRADFORD et al., 2015) e têm maior exigência nutricional de manutenção (FUQUAY, 1981).

O efeito positivo da suplementação com leveduras sobre o desempenho de vacas leiteiras submetidas a estresse calórico tem sido relatado de longa data (HUBER et al., 1994). Vacas sob estresse por calor parecem ter maior resposta positiva em desempenho leiteiro a probióticos à base de leveduras (BRUNO et al., 2009; MOALLEM et al., 2009; SALVATI et al., 2015) que o predito por meta-análises da literatura (DESNOYERS et al., 2009; POPPY et al., 2012), sugerindo que a condição fisiológica do animal em desafio térmico amplificaria a magnitude da resposta a este aditivo nutricional. Entretanto, quando vacas leiteiras foram submetidas a desafio térmico de curta duração em câmaras climáticas, a suplementação com leveduras ativas e enzimas reduziu a temperatura retal, mas não atenuou o efeito do calor excessivo sobre o desempenho leiteiro, o consumo e variáveis metabólicas (SHWARTZ et al., 2009). Além do fator fisiológico, a resposta animal à suplementação com leveduras pode ser dependente do tipo de produto utilizado e seu modo de ação. Produtos classificados como cultura de leveduras mortas incluem o meio de cultivo usado para crescimento do

microrganismo e não são dependentes da existência de leveduras ativas para exercer seu efeito fisiológico (POPPY et al., 2012). Culturas de leveduras são teoricamente capazes de prover fatores de crescimento para microrganismos do rúmen e induzir ganho em digestibilidade de nutrientes, redução do acúmulo de ácido láctico no fluido ruminal e aumento na síntese de niacina, favorecendo a regulação da homeotermia.

### **1.1 Objetivo**

Objetivou-se avaliar o efeito da suplementação de cultura de levedura morta sobre o desempenho leiteiro, o consumo de matéria seca, a digestibilidade de nutrientes, a manutenção da homeotermia e o padrão ingestivo de vacas leiteiras sujeitas a estresse por calor.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Estresse por calor**

#### **2.1.1 Índice de temperatura e umidade (ITU) e ambiente térmico**

A alta temperatura ambiental reduz a eficiência produtiva e reprodutiva do gado de leite. Animais de produção estão sob influência do ambiente que são criados, sendo que a temperatura do ar tem efeito majoritário, mas não único. O potencial de impacto do ambiente térmico sobre a produção e bem-estar animal pode ser descrito como Temperatura Ambiental Efetiva (TAE). Quatro fatores ambientais determinam a TAE: temperatura do ar, umidade relativa do ar, movimentação do ar e radiação solar (ARMSTRONG, 1994). A zona termoneutra é definida como a faixa de TAE em que não há gasto adicional de energia, acima da manutenção, para manutenção da temperatura corporal normal (WEST, 2003). Na zona termoneutra o animal está confortável e expressa o máximo potencial produtivo com mínimo de estresse (NRC, 1981). Quando a TAE está abaixo ou acima de valores tidos como críticos ocorre o estresse por frio ou calor, respectivamente. Animais compensam extremos de TAE com alterações no consumo de alimento, no metabolismo, em mecanismos de dissipação de calor e alteração da partição de nutrientes ingeridos, resultando em menor eficiência energética para produção (NRC, 1981).

Em animais homeotérmicos há um balanço entre o calor gerado pelo metabolismo, o calor absorvido do ambiente e o calor perdido para o ambiente. O animal troca calor com o ambiente por condução, convecção e radiação. A radiação direta solar ou das superfícies ao redor do animal contribui para o calor absorvido do ambiente e influencia a TAE. Sombras e abrigos previnem o animal de ganhar calor por radiação solar direta. A umidade do ar é importante para o balanço térmico porque em altas temperaturas o animal usa da evaporação via trato respiratório e pela pele para perder calor. Quanto maior a umidade do ar, menor o gradiente de umidade entre a pele, o trato respiratório e o ar, e mais lenta será a evaporação das superfícies. Animais mais dependentes da sudorese para a termorregulação são mais afetados pela alta umidade do ar. A ocorrência de precipitação está relacionada à umidade do ar na composição do ambiente térmico e contribui para diminuição da radiação solar direta. A velocidade de movimentação do ar e o contato com as superfícies ao redor influenciam a troca de calor pelo animal por convecção e condução (NRC, 1981).

Portanto, o estresse por calor não é causado apenas pela temperatura do ar, mas a combinação dessa com outros fatores ambientais: radiação solar, umidade relativa do ar, velocidade de movimentação do ar e precipitação (BOHMANOVA; MISZTAL; COLE,

2007). Thom (1958) propôs o índice de temperatura e umidade (ITU) para descrever de maneira mais completa as condições ambientais. Berry, Shanklin e Jonhson (1964) foram os primeiros a aplicar o conceito de ITU para avaliar o conforto térmico de vacas leiteiras.

Em experimentos conduzidos nas décadas de 50 e 60, concluiu-se que o ITU máximo para conforto de vacas leiteiras seria o índice de 72 (ARMSTRONG, 1994). Em revisão sobre estresse térmico, Kadzere et al. (2002) propuseram que ambiente com ITU de até 70 seria confortável para vacas leiteiras, entre 75 e 78 seria considerado estressante, e acima de 78 seria considerado extremamente estressante. Com ITU acima de 78 vacas leiteiras seriam incapazes de manter os mecanismos termorregulatórios para evitar aumento da temperatura corporal. Contudo, o limite de ITU para conforto dos animais é dependente do nível de produção de leite. Os trabalhos das décadas de 50 e 60 foram realizados com vacas produzindo cerca de 15,5 kg/d. Com o aumento da produção de leite ocorre o aumento da sensibilidade do animal ao calor e ocorre redução do valor de ITU no qual ocorrem perdas de produção. Isso é explicado pela produção de calor metabólico, que aumenta concomitantemente com a produção de leite.

Foram realizados oito estudos na Universidade do Arizona, com cem vacas multíparas holandesas (média de produção 35 kg/d) em câmaras climáticas, ao longo de três anos (ZIMBELMAN, 2009). Analisando os resultados dos experimentos em conjunto, os autores concluíram que ITU mínimo diário acima de 65 ou média diária de ITU acima de 68 reduziu 2,2 kg/d na produção de leite. Portanto, tem sido sugerido que valores de ITU acima de 68 seriam indutores de estresse por calor em vacas de maior produção.

### **2.1.2 Respostas fisiológicas de animais submetidos ao estresse por calor**

Os animais homeotérmicos precisam manter a temperatura corporal constante, ou com mínimas variações diárias para manutenção da homeostase. A temperatura retal, embora não seja exatamente igual à temperatura corporal, é utilizada como parâmetro para definir a normalidade (WEST, 2002), sendo um bom indicador de estresse térmico (FUQUAY et al., 1979). A frequência respiratória também é alterada em condições de estresse térmico, pois a perda de calor via aumento da troca no ar inspirado e expirado é um mecanismo importante de manutenção da temperatura corporal. Vacas sob estresse térmico têm temperatura retal elevada e alta frequência respiratória, o que implica em metabolismo debilitado (KADZERE et al., 2002).

Vacas expostas ao estresse por calor têm redução da produção fecal e urinária para reduzir perda de líquido (MCDOWELL et al., 1969), queda no consumo de alimentos,

aumento da sudção e aumento das frequências respiratória e cardíaca. Ocorre também redução da motilidade ruminal (BEEDE; COLLIER, 1986), aumento do consumo de água e aumento da perda hídrica por evaporação (MCDOWELL et al. 1969).

A sudção é uma adaptação fisiológica para aumento da perda de calor pela pele. Existe perda de água por evaporação superficial do corpo constantemente, desde que a umidade relativa do ar esteja abaixo de 100%. A proporção de calor dissipada do animal por evaporação para o ambiente aumenta com aumento da temperatura do ar, pois decresce o gradiente de temperatura entre a superfície do animal e o ar (KADZERE et al., 2002). A taxa de evaporação cutânea medida na região lombodorsal de garrotes Guernsey e Limousin aumentou de 36 para 253 g/m<sup>2</sup>/h ( $P < 0,01$ ) quando os animais foram movidos de câmara climática a 11 °C para 36 °C. Resultado semelhante foi observado com novilhas Guernsey, em que a taxa de evaporação passou de 43 para 186 g/m<sup>2</sup>/h ( $P < 0,01$ ), sob 11 e 36 °C, respectivamente (BLAZQUEZ et al., 1994).

A taxa de sudção diferiu em garrotes de corte das raças Brahman, Hereford, Shorthorn e cruzamento entre essas raças, mantidos sob as mesmas condições ambientais (FINCH; BENNETT; HOLMES, 1982). A relação entre taxa de sudção e temperatura retal foi linear e positiva ( $r =$  de 0,50 a 0,60;  $P < 0,01$ ), isto é, à medida que a temperatura retal aumentou em consequência da temperatura ambiente, a taxa de sudção também aumentou. A inclinação da reta foi maior para animais da raça Brahman, (294 g/m<sup>2</sup>.h/°C;  $P < 0,01$ ) ou seja, esses animais tiveram maior taxa de sudção a uma mesma temperatura retal, comparados aos Hereford, Shorthorn e cruzamento. O aumento mais rápido da sudção observada nos animais da raça Brahman foi uma possível explicação para menor temperatura retal observada nesses animais. A sudção varia com as condições ambientais e com a raça ou grupo genético do animal.

Outro mecanismo de perda de calor por evaporação é por aumento da frequência respiratória, que aumenta a perda de umidade pelos pulmões (GEBREMEDHIN et al., 2008). Em estudo com 15 vacas da raça Holandesa em clima tropical objetivou-se descrever a perda de calor evaporativo pela superfície corporal de animais mantidos a pasto (MAIA; DASILVA; BATTISTON LOUREIRO, 2005). A temperatura do ar variou de 10 a 36 °C. Com o aumento da temperatura do ar, a perda de calor por evaporação cutânea aumentou. Em ambiente com temperatura do ar de 10 a 20 °C, a perda de calor por evaporação cutânea representou 20 a 30% da perda de calor total, e o restante seria a perda de calor via trato respiratório. Quando a temperatura do ar esteve acima de 30 °C, a perda por evaporação cutânea aumentou para 85 % da perda total. Quando a temperatura do ar está próxima ou mais

alta que a temperatura da superfície corporal a perda de calor por evaporação cutânea é importante para manutenção da homeotermia.

Em climas quentes, vacas leiteiras mudam o comportamento de repouso, com menor tempo de decúbito (ALLEN; HALL; COLLIER, 2015). Com o aumento do ITU e da temperatura corporal vacas passaram mais tempo de pé, em estudo que compilou dados de seis experimentos no Arizona, Minnessota e Califórnia. Nos experimentos conduzidos no Arizona a temperatura ambiente média foi de 32,7 °C, enquanto no Minnessota foi de 20,9 °C e na Califórnia 22,8 °C. Animais dos experimentos do Arizona passaram mais tempo de pé, comparado aos outros dois estados (12,6 h/d vs. 11,4 e 11,3 h/d respectivamente;  $P < 0,04$ ). Vacas em ambiente quente permanecem mais tempo de pé possivelmente para melhorar a perda de calor por aumento da área de superfície do corpo exposta ao ar. Esse comportamento pode ser prejudicial à produção e saúde dos animais.

A fisiologia digestiva é alterada em vacas sob estresse por calor. A queda de consumo de alimentos causada pelo calor é documentada na literatura e possivelmente uma estratégia de sobrevivência, dado que a digestão, absorção e metabolismo de nutrientes gera calor (BAUMGARD; RHOADS, 2015). A síntese microbiana de vitaminas, aminoácidos e ácidos graxos voláteis (AGV) no rúmen é prejudicada pelo estresse térmico. O tempo de ruminação e motilidade do rúmen e do retículo diminuem. Com menor tempo de ruminação, o fluxo de saliva também diminui. Com o aumento da frequência respiratória há maior excreção de  $\text{CO}_2$  pelos pulmões. Para manutenção do pH sanguíneo a relação  $\text{CO}_2 : \text{HCO}_3^-$  deve ser constante na proporção de 20:1. Quando o animal aumenta a frequência respiratória e aumenta a perda de  $\text{CO}_2$ , diminui a concentração desse gás no sangue. Para não haver desbalanço, os rins então secretam mais  $\text{HCO}_3^-$ . Assim há menor suprimento de  $\text{HCO}_3^-$  para a saliva, o que faz com que a saliva de ruminantes submetidos ao calor tenha menor poder tamponante (COLLIER et al., 1982; SCHNEIDER; BEEDE; WILCOX, 1988b), o que contribui para aumento do risco de acidose em animais sob estresse por calor (WEST, 2003). Concentração de Na e de K são reduzidas no fluido ruminal de vacas sob estresse térmico, por conta da perda desses minerais no suor. A perda de Na e K no suor de animais Hereford e Guernsey e mestiços de Hereford e Shorthorn com Brahman e Africander aumentou ( $P < 0,01$ ) quando a temperatura do ar foi maior que 35 °C (JOHNSON, 1970), que contribui para a queda da osmolaridade do fluido ruminal.

Em geral, vacas sob estresse térmico estão mais propensas a acidose ruminal (SANCHEZ; MCGUIRE; BEEDE, 1994). A taxa de passagem da digesta ruminal diminui e consequentemente o tempo de retenção é maior (SCHNEIDER; BEEDE; WILCOX, 1988b),

fato relacionado à maior digestibilidade dos alimentos. O fluxo sanguíneo para o trato gastrointestinal diminui (KADZERE et al., 2002) e a absorção de nutrientes no trato gastrointestinal pode ser prejudicada pela hipomotilidade, elevando o risco de acúmulo ruminal de AGV (BAUMGARD; RHOADS, 2007). A diminuição do fluxo sanguíneo para o sistema digestório foi demonstrada em cabras leiteiras mantidas em ambiente controlado, sob ciclos de temperatura de 35 °C durante o dia e 24 °C durante a noite, com umidade relativa do ar constante de 55%. O fluxo sanguíneo das veias porta e mesentérica aumentou cerca de 30% comparando-se o período termoneutro durante a noite com o período quente durante o dia (WANG et al., 2016).

Vacas Jersey fistuladas no rúmen foram mantidas em ambiente com temperatura controlada (15 ou 30 °C) e alimentadas com feno de gramínea às 06:00 e às 16:00 h (BANDARANAYAKA; HOLMES, 1976). Amostras de fluido ruminal foram coletadas imediatamente antes, 3, 6 e 9 h após a alimentação matinal. Vacas em ambiente a 30 °C tiveram pH ruminal significativamente mais baixo antes da alimentação ( $P < 0,01$ ). Em experimento semelhante, seis vacas da raça Holandesa fistuladas no rúmen foram submetidas a diferentes condições ambientais de temperatura e umidade (fresco; 18,3 °C e 50% de umidade ou quente; 29,4 °C e 85% de umidade) em câmara climática e alimentadas com duas dietas: alto grão (31,8% MS de feno de alfafa) ou alta forragem (60% MS de feno de alfafa) (MISHRA et al., 1970). Para manter o consumo constante nos diferentes ambientes, o alimento não ingerido foi introduzido pela cânula ruminal. O fluido ruminal foi coletado 1,0; 1,25; 1,50; 1,75; 2,25; 2,75; 3,25; 4,75; 5,75; 6,75 e 7,75 h após a alimentação. O ambiente e a dieta tiveram efeito sobre o pH ruminal ( $P < 0,01$ ). No ambiente fresco o pH ruminal esteve acima de 6,0 em ambas dietas, enquanto no ambiente quente permaneceu abaixo de 6,0. O pH ruminal médio dos animais mantidos em ambiente fresco foi mais alto que dos animais mantidos em ambiente quente na dieta de alta (6,45 vs. 6,3;  $P < 0,01$ ) ou baixa (6,3 vs. 5,6;  $P < 0,01$ ) forragem. Esses resultados, em conjunto com a hipomotilidade do rúmen e retículo e menor fluxo sanguíneo para o trato gastrointestinal descritos acima, evidenciam o aumento do risco de acidose em vacas submetidas a estresse por calor.

### **2.1.3 Impacto do estresse por calor sobre o consumo de alimentos, metabolismo de energia e produção de leite**

Há aumento da exigência de manutenção de animais expostos ao calor, com prejuízo na produção de leite, no ganho de peso e no desempenho reprodutivo (BEEDE; COLLIER, 1986). Vacas leiteiras em temperatura de 35 °C têm exigência de manutenção 20% maior que de

animais em condições termoneutras (NRC, 1981). Vacas sob estresse por calor experimentam queda no consumo de alimento, na eficiência alimentar e na eficiência de utilização de energia para produção de leite, a despeito de digestibilidade da matéria seca mais alta (MCDOWELL et al., 1969).

A queda do consumo de matéria seca (CMS) causa queda no consumo de energia, cuja ingestão é limitante para vacas em lactação expostas ao calor. Aumentar a densidade energética da dieta pela diminuição do teor de fibra é uma abordagem comum. O menor teor de fibra na dieta pode aumentar o consumo e diminuir o calor de fermentação. No entanto, o uso de dieta com baixo teor de fibra em situações de estresse por calor requer cautela, dado o risco de acidose associado a dietas ricas em grãos (WEST, 2003).

A queda do CMS leva vacas em lactação sob estresse por calor a entrar em balanço energético negativo (BEN), a despeito da queda de produção de leite. O BEN induzido pelo calor acarreta adaptações metabólicas cujo objetivo é priorizar o atendimento da exigência de manutenção e a manutenção da homeotermia, às custas da energia que seria direcionada para a produção (BEEDE; COLLIER, 1986). Os mecanismos poupadores de glicose e direcionadores para a síntese de leite e de tecido muscular são prejudicados em animais expostos ao calor. Nessa situação a concentração plasmática de insulina está alta, apesar da queda de consumo, da perda de peso e do BEN. Esse efeito é descrito também em não ruminantes (FERNANDEZ et al., 2015). A insulina alta é paradoxal, pois é um potente hormônio anabólico, que estimula a lipogênese e está elevada em uma situação catabólica, com perda de peso, como o estresse por calor (BAUMGARD; RHOADS JR, 2012).

Vacas sob estresse térmico tem a capacidade diminuída de mobilizar lipídios para suprir sua demanda energética, a despeito do aumento de hormônios lipolíticos como cortisol, epinefrina e norepinefrina liberados em animais que estão sob efeito do calor. A inability de mobilizar tecido adiposo torna animais sob estresse por calor inflexíveis quanto ao substrato energético utilizado, mais dependentes de glicose. O direcionamento da glicose para outras funções que não a síntese de leite e ganho impacta negativamente na produtividade animal (BAUMGARD; RHOADS, 2015).

A redução no CMS é apontada como a principal causa da queda de produção em animais sob estresse térmico (FUQUAY, 1981). No entanto, a queda no consumo explica apenas parte da queda de produção de leite (RHOADS et al., 2010).

Para verificar os efeitos não associados ao consumo do estresse por calor em vacas leiteiras, pesquisadores do Arizona (RHOADS et al., 2009) alojaram doze vacas holandesas múltíparas em duas câmaras climáticas, cada uma correspondendo a um tratamento: estresse

por calor (HS) ou consumo pareado (PF). Durante nove dias (P1) todos os animais foram mantidos em condições de conforto térmico: 20 °C, umidade do ar 20% e ITU = 64 e foram alimentados à vontade. Nos nove dias seguintes (P2) os animais do grupo PF permaneceram em condição de conforto, ao passo que os animais do grupo HS foram submetidos a temperatura variando de 29,4 a 38,9 °C e umidade relativa de 20%. O ITU foi mantido acima de 73, com pico de 82, o que caracterizou o tratamento HS. Os animais do grupo HS foram alimentados à vontade. Foi calculada redução percentual diária do CMS dos animais do grupo HS no P2 em relação ao P1. Essa proporção de redução foi aplicada aos animais do grupo PF, que estavam em condições termoneutras, mas passaram a receber alimentação restrita. Os animais submetidos ao estresse tiveram queda do CMS de 37% (23,4 vs. 16,8 kg/d;  $P < 0,01$ ) e da produção de leite de 40,5% (32,1 vs. 21,5 kg/d;  $P < 0,01$ ). No grupo PF, a queda do consumo foi semelhante, de 21,2 para 15,6 kg/d, mas esses produziram 29 kg/d de leite no P2. Animais em conforto térmico produziram 7,5 kg/d a mais que aqueles submetidos ao calor, com o mesmo consumo. Tanto vacas do PF quanto do HS entraram em balanço negativo de energia e perderam peso, sem diferença entre tratamentos ( $P > 0,35$ ; 49,4 kg). A concentração plasmática de glicose foi maior para os animais do tratamento PF nos dois períodos ( $P < 0,05$ ). A concentração plasmática de ácidos graxos não esterificados (AGNE) foi similar entre tratamentos em P1. Nos animais submetidos ao calor a concentração plasmática de AGNE não se alterou (110 vs. 128 mEq/L;  $P > 0,05$ ) em P2, enquanto no grupo PF subiu em relação ao P1 (139 vs. 305 mEq/L;  $P < 0,01$ ). Os autores apontam que animais sob estresse por calor têm maior custo energético de manutenção por esforço para dissipação de calor.

Em estudo semelhante Wheelock et al., (2010) usaram 22 vacas holandesas multíparas em câmaras climáticas, em três períodos experimentais. No primeiro período (P1) os animais ficaram sete dias em conforto térmico (20 °C, 20% de umidade, THI = 64) e alimentados *ad libitum*. No segundo período (P2) dez animais (grupo HS) foram colocados em condições de estresse térmico (29,4 a 38,9 °C, 20% de umidade, ITU de 72,4 a 82,2) e alimentados à vontade. A proporção de redução de CMS observada no grupo HS foi aplicada ao grupo PF, que ficaram em condições termoneutras. No 1º d do terceiro período (P3) todos os animais receberam BSTr, e foram mantidas as condições ambientais e de alimentação. Foi realizado teste de tolerância a glicose (250 mg/kg de peso vivo) no 5 d de cada período. Durante o estresse térmico (P2) os animais reduziram o CMS progressivamente, e o consumo no grupo PF, por arranjo experimental, foi igual. A produção de leite caiu 9,56 kg/d (27,6%) em média para os grupo HS e 4,79 kg/d (13,9%) para o grupo PF. Quando os animais receberam BSTr (P3) a produção de leite tendeu a recuperar no grupo HS (aumento de 2,22 kg/d comparado ao

P2;  $P < 0,07$ ) e aumentou no grupo PF (3,70 kg/d;  $P < 0,01$ ). Tanto as vacas do grupo HS quanto PF entraram em balanço energético negativo a partir do P2 e perderam peso ( $P < 0,01$ ). Comparado ao P1, ambos grupos tiveram redução na concentração plasmática de glicose, em P2 e P3. A concentração plasmática de AGNE foi mais alta em P2 e P3 para o grupo PF, ao passo que para os animais do grupo HS não houve diferença entre períodos. A concentração de insulina no plasma não diferiu entre períodos para vacas do grupo PF, no entanto, aumentou (37%;  $P < 0,05$ ) em P2 e P3 em vacas do grupo HS. Vacas desse experimento estavam em balanço energético negativo, no entanto, animais do grupo HS não tiveram aumento na concentração plasmática de AGNE, mesmo após administração de BSTR.

A oxidação de lipídios de reserva leva a maior produção de calor, comparado aos carboidratos. Assim, animais sob estresse por calor obteriam energia preferencialmente de carboidratos. A redução da concentração plasmática de insulina ou da sensibilidade dos tecidos a esse hormônio é comum em animais malnutridos. No estudo descrito acima, os animais no grupo HS tiveram aumento da concentração basal de insulina, enquanto nos animais do grupo PF não houve alteração. A ausência da mobilização de lipídios em animais sob estresse térmico pode ser mediada pelo aumento da concentração plasmática de insulina, visto que é um hormônio anti-lipolítico potente (BAUMGARD; RHOADS, 2015).

#### **2.1.4 Balanço ácido-básico sanguíneo em animais submetidos a estresse por calor**

O pH sanguíneo depende da pressão de  $\text{CO}_2$  ( $\text{PCO}_2$ ), da concentração de bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), da constante de dissociação do ácido carbônico (pK) e do coeficiente de solubilidade de  $\text{CO}_2$  no plasma (S). Essas variáveis predizem o pH sanguíneo segundo a equação de Henderson-Hasselbalch em animais com concentração plasmática de proteínas normal. Considerando que pK e S são constantes em mamíferos saudáveis, pH sanguíneo seria função de  $\text{PCO}_2$  e  $\text{HCO}_3^-$ . Em exames de balanço ácido-básico sanguíneo a  $\text{PCO}_2$  e pH são mensurados e  $\text{HCO}_3^-$  é calculado a partir destas variáveis (CONSTABLE, 2014).

Com a aplicação da equação de Henderson-Hasselbalch quatro situações podem ser descritas: acidose respiratória (aumento de  $\text{PCO}_2$ ), alcalose respiratória (queda de  $\text{PCO}_2$ ), acidose metabólica (queda de  $\text{HCO}_3^-$ ) e alcalose metabólica (aumento de  $\text{HCO}_3^-$ ). O  $\text{HCO}_3^-$ , está em equilíbrio com  $\text{PCO}_2$  sanguínea. O balanço entre  $\text{HCO}_3^-$  e a  $\text{PCO}_2$  age no centro do controle da respiração no sistema nervoso central. A hiperventilação no estresse por calor causa perda de  $\text{CO}_2$  e alcalose sanguínea. O pH sanguíneo abaixo de 7,4 causa aumento da frequência respiratória (KADZERE et al., 2002).

Em experimento em câmara climática o estresse por calor causou aumento do pH sanguíneo de vacas em lactação, monitorado continuamente. Foram simuladas condições cíclicas de aumento e diminuição da umidade do ar e temperatura durante o dia e a noite. O pH sanguíneo foi mais elevado nas horas mais quentes, e caía com a redução da temperatura. Como o pH sanguíneo é finamente regulado, os rins excretam  $\text{HCO}_3^-$  para compensação, com observado aumento do pH urinário (SCHNEIDER; BEEDE; WILCOX, 1988a). O estresse por calor aumenta ainda a pressão sanguínea de  $\text{O}_2$ , decorrente da maior ventilação alveolar (HALES; FINDLAY, 1968).

### 3 LEVEDURAS NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS

#### 3.1 Aditivos à base de leveduras na alimentação de vacas leiteiras

Leveduras são fungos unicelulares que se reproduzem assexuadamente por brotamento ou bipartição. São normalmente aeróbios, mas podem sobreviver na ausência de oxigênio e podem ser encontradas no fluido ruminal. A temperatura no rúmen, em torno de 39 °C, é mais alta que a temperatura ótima para crescimento de leveduras, que é de 25 °C. Mais de  $1,3 \times 10^5$  células/mL de leveduras cresceram em fluido ruminal de bovino quando incubado a 25 °C, mas a contagem caiu para  $3,5 \times 10^3$  células/mL quando incubado a 39 °C. A viabilidade de células vivas de levedura no rúmen é limitada a aproximadamente 24 horas, são habitantes transitórios da comunidade microbiana do rúmen. Para que ocorram efeitos de células de leveduras vivas na nutrição de ruminantes sua introdução pela dieta deve ser constante (LUND, 1974).

A alimentação de vacas leiteiras com produtos contendo leveduras é uma prática antiga. Inicialmente produtos contendo levedura eram utilizados como fonte de proteína em dietas animais. A utilização de leveduras em pequena inclusão (< 1% na matéria seca), como aditivo alimentar, começou a ganhar importância nas décadas de 40 e 50 (WALLACE; NEWBOLD, 2007). A levedura mais comumente utilizada como aditivo na alimentação animal é a *Saccharomyces cerevisiae* (LINN; RAETH-KNIGHT, 2006; SANTOS; GRECO, 2012).

Um dos tipos de aditivos à base de leveduras para alimentação de ruminantes é a cultura de levedura. Este aditivo contém células mortas de leveduras e o meio de crescimento no qual foram cultivadas, além de compostos oriundos de sua atividade metabólica, que podem agir como fatores de crescimento para bactérias e protozoários ruminais (POPPY et al., 2012). Substâncias presentes na cultura de levedura, tais como ácidos orgânicos, vitaminas e aminoácidos, estimulariam o crescimento de populações específicas de bactérias no rúmen, como as utilizadoras de lactato e degradadoras de celulose (CALLAWAY; MARTIN, 1997), e induziriam ganho na digestibilidade de nutrientes. Cultura de levedura pode ainda estimular o crescimento microbiano ruminal, com aumento do fluxo de proteína microbiana para o duodeno (HRISTOV et al., 2010).

Produtos para ruminantes contendo leveduras vivas podem melhorar a digestibilidade da fibra. Um dos modos de ação propostos para leveduras vivas no rúmen é o consumo de oxigênio no ambiente ruminal, pela própria atividade metabólica das células. A menor concentração de oxigênio no fluido ruminal criaria condições mais favoráveis para atividade

de colonização e digestão de partículas de alimento pela microbiota celulolítica (CHAUCHEYRAS-DURAND; WALKER; BACH, 2008). Outro mecanismo de ação de leveduras vivas seria a modulação do pH do fluido ruminal por diminuição da concentração de lactato, como consequência do estímulo a bactérias consumidoras de lactato (PINLOCHE et al., 2013). O pH ruminal mais alto e estável favoreceria a população de microrganismos degradadores de fibra, com aumento da digestibilidade ruminal desse nutriente.

Células vivas de levedura podem sobreviver à degradação ruminal e à digestão ácida no abomaso e chegar ao intestino delgado (CHAUCHEYRAS-DURAND et al., 1998). No intestino, glucanas e mananas da parede celular das leveduras estimulam a imunidade epitelial inespecífica (MORAN, 2004).

Leveduras podem modular a expressão de genes ligados a interleucinas pró-inflamatórias, importantes no recrutamento e ativação de células do sistema imune em tecido epitelial intestinal de suínos (ZANELLO et al., 2011). Suínos submetidos ao calor tiveram aumento da expressão de genes codificadores de proteína de resistência ao choque térmico (HSP70), com comprometimento da integridade da parede intestinal (PEARCE et al., 2013). Cultura de levedura diminuiu a expressão de genes de proteína de resistência ao choque térmico (HSP70) em células brancas circulantes de vacas em lactação sob estresse por calor (LIU et al., 2014). Tais resultados indicam possível relação entre efeitos negativos do estresse por calor sobre o sistema imune e potencial atenuação desses efeitos por ação de aditivos à base de leveduras.

Cultura de levedura pode ter efeito benéfico na saúde e produção de animais em situação de estresse, como no período peri-parto (ZAWORSKI et al., 2014). O fornecimento de 56 ou 112 g/d de cultura de levedura (Diamond V Original XP; Mills, Inc.) por 28 dias antes e depois do parto baixou o teor plasmático de cortisol de vacas multíparas ( $P = 0,02$ ) nos três primeiros dias após o parto. A cultura de levedura aumentou a concentração plasmática de proteínas de fase aguda na primeira semana após o parto, o que indica aumento da resposta imune inespecífica. Levedura enzimaticamente hidrolisada (YC-EHY) melhorou a saúde da glândula mamária de vacas em período de transição, evidenciada pela menor contagem de células somáticas (YUAN et al., 2015b). As vacas receberam 0, 30, 60 ou 90 g/d de YC-EHY durante 21 dias pré-parto e 42 dias pós-parto. Houve efeito quadrático a dose de YC-EHY sobre o escore linear de células somáticas, com queda significativa na dose de 60 g/d na quinta semana de lactação. A concentração plasmática de anticorpos aumentou linearmente com a dose de YC-EHY, após desafio com ovoalbumina ( $P = 0,06$ ). Os autores concluíram que YC-EHY foi capaz de modular a resposta imune. Os mecanismos de ação

propostos para aditivos à base de leveduras vão além da digestão ruminal, como estimulação da imunidade de mucosas.

### **3.2 Ação de aditivos à base de leveduras sobre a digestão ruminal**

Muito foi investigado sobre a modificação no ambiente e na microbiota ruminal causados por aditivos à base de leveduras. Os principais mecanismos de ação de aditivos à base de levedura no rúmen de animais adultos envolve aumento na concentração de AGV e mudança na proporção de acetato e propionato (A:P), estímulo a bactérias ruminais e aumento da síntese microbiana, modulação do pH ruminal, redução na concentração de O<sub>2</sub> no rúmen, melhoria da digestão de nutrientes. Esses mecanismos serão brevemente discutidos nos subtópicos seguintes.

#### **3.2.1 Concentração de AGV, metano e amônia**

O efeito de probióticos a base de cultura de levedura sobre a concentração de AGV, metano e amônia no fluido ruminal é variável. A mudança no perfil de AGV como consequência do fornecimento de produtos à base de leveduras vivas e mortas é descrita na literatura, mas parece depender da dieta fornecida (LYNCH; MARTIN, 2002), da dose (GUEDES et al., 2008) e da cepa de *S. cerevisiae* utilizada (CHUNG et al., 2011) ou do tipo de produto contendo cultura de levedura (MILLER-WEBSTER et al., 2002). Foram reunidos resultados de estudos *in vitro* e *in vivo* revisados sobre a concentração no fluido ruminal de AGV, amônia, metano e relação A:P na tabela abaixo:

Tabela 1. Concentração total de ácidos graxos voláteis (AGV), acetato, propionato, relação A:P, outros AGV, metano e amônia no fluido ruminal em estudos *in vitro* e *in vivo* com aditivos à base de leveduras vivas (LV) e cultura de levedura (CL)

Referência	Tipo de aditivo	AGV	Acetato	Propionato	Relação A:P	Outros AGV	Metano	Amônia
<i>Estudos in vitro</i>								
Miller-Webster et al., 2002	Duas CL (Pr1)	+ 15,1 %	- 17,8 %	+ 56,8 %	- 47,5 %	NS <sup>1</sup>	NR <sup>2</sup>	+ 34,9 %
Miller-Webster et al., 2002	Duas CL (Pr2)	+ 7,6 %	- 7,2 %	+ 15,7 %	- 16,3 %	NS	NR	+ 49,5 %
Oeztuerk, 2009	LV e autoclavadas	+ 8,0 %	+ 5,4 %	+ 8,8 %	NR	+ butirato e iso	NR	+ 11,4 %
<i>Estudos in vivo</i>								
Harrison et al., 1988	CL	NS	- 9,2 %	+ 9,5 %	- 17,5 %	+ 46 % isoácidos	NR	- 30,4 %
Williams et al., 1991	CL	NS	NR	NR	- 15,1 %	- 18,9 % butirato	NR	NR
Erasmus et al., 2005	CL	NR	NS	+ 18,6 %	- 10,6 %	+ 21,7 % valerato	NR	NR
Guedes et al., 2008	LV	+ 11,2 %	+ 4,8 %	+ 25 %	- 15,7 %	+ 9,7 %	NR	+ 6,5 %
Moallem et al., 2009	LV	NR	NR	NR	NR	NR	NR	- 20 %
Al Ibrahim et al., 2010	LV	NS	+ 5,4 %	NS	NS	NS	NR	- 5,3 %
Hristov et al., 2010	CL	NS	NS	NS	NS	NS	NS	- 20 %
Chung et al., 2011	LV cepa 1	NS	NS	- 3,7 %	+ 6,0 %	+ 6,7 % valerato	+ CH <sub>4</sub> /kg MS	NS
Chung et al., 2011	LV cepa 2	NS	- 2,5 %	+ 7,4 %	- 9,1 %	+ 13,3 % valerato	- CH <sub>4</sub> /kg MS	NS
Vyas et al., 2014	LV e autoclavadas	NS	NS	NS	NR	NS	NR	+ 19,7 %

<sup>1</sup>Não significativo. Diferenças entre tratamento e controle com  $P > 0,15$  foram consideradas não significativas.

<sup>2</sup>Não relatado

Em fermentação *in vitro* leveduras vivas ou cultura de levedura reduziram a proporção A:P, mas o resultado variou de acordo com o substrato utilizado. Quando utilizou-se apenas feno de alfafa ou de *Cynodon*, a proporção A:P não respondeu à adição de leveduras vivas ou mortas. Quando o substrato foi amido solúvel ou milho moído, a proporção A:P caiu significativamente com ambos aditivos (LYNCH; MARTIN, 2002). Em trabalho com simulador da fermentação ruminal abastecido com fluido doado por garrote alimentado exclusivamente com forragem, a adição de 10 g de levedura viva não surtiu efeito sobre a concentração de AGV ou na proporção de acetato e propionato (KUNG JR et al., 1997). Esses resultados sugerem que leveduras podem alterar a proporção de AGV do fluido ruminal em dietas ricas em concentrados.

O cultivo *in vitro* de dieta contendo 53% da MS de forragens e 47% da MS de concentrados junto com dois produtos contendo de cultura de levedura aumentou a produção total de AGV, diminuiu a concentração de ácido acético e aumentou de ácido propiônico e valérico (MILLER-WEBSTER et al., 2002). Aumento de propionato também foi escrito *in vivo*, em vacas em início de lactação recebendo cultura de levedura (ERASMUS et al., 2005). Sessenta vacas no peri-parto foram alimentadas com dieta controle, controle acrescida de cultura de levedura (Diamond V XP, Mills Inc.), controle acrescida de monensina ou ambos durante 3 semanas pré-parto até a oitava semana pós-parto. As amostras de fluido ruminal foram obtidas por ruminocentese aos 10, 30 e 50 dias após o parto, 4 a 5 h após a alimentação matinal. Todos os tratamentos aumentaram a proporção de propionato no fluido ruminal, comparados ao controle. A monensina teve maior diferença em relação ao controle (36,9 vs. 29,6 mM;  $P = 0,03$ ), seguida da cultura de levedura (35,1 mM;  $P = 0,09$ ) e da combinação de ambos (34,3 mM;  $P = 0,14$ ), a relação A:P diminuiu para todos os tratamentos em comparação ao controle.

Para avaliar como o perfil de AGV no fluido ruminal e a microbiota ruminal respondem à cultura de levedura, foi realizado experimento com seis vacas da raça Holandesa fistuladas no rúmen (HARRISON et al., 1988). Os tratamentos foram controle (placebo, constituído do meio de cultivo das leveduras sem as células), ou cultura de levedura (114 g/d, Diamond V, Mills, Inc.). A dieta era composta por 60% da MS de forragem e 40% da MS de concentrados; teor de PB de 15% e 34,2% de FDN. O fluido ruminal de vacas tratadas com cultura de levedura teve pH mais baixo ( $P < 0,01$ ), apesar da concentração total de AGV não diferir entre tratamentos. A proporção de acetato foi menor em animais no tratamento cultura de levedura ( $P < 0,01$ ) e a proporção de propionato foi maior ( $P < 0,01$ ), logo a relação A:P foi menor ( $P = 0,01$ ). Houve também aumento de isoácidos (isobutirato, isovalerato e

valerato;  $P = 0,03$ ), comparado ao controle. A contagem total de bactérias anaeróbicas e celulolíticas aumentou em resposta à cultura de levedura, no entanto a digestibilidade da FDN não aumentou.

Em estudos com leveduras vivas, é importante considerar a cepa utilizada na interpretação dos resultados. Os produtos da fermentação ruminal variam de acordo com a cepa utilizada (CHUNG et al., 2011). Estudo foi conduzido com duas cepas de *S. cerevisiae* vivas (Lallemand Animal Nutrition), uma cepa comercial e outra experimental, fornecidas na mesma dose ( $1 \times 10^{10}$  UFC/d). Os tratamentos foram administrados a vacas secas não gestantes fistuladas no rúmen, alimentadas com dieta composta por 50% da MS de silagem de cevada e 50% da MS de concentrado à base de cevada. A emissão de metano pelos animais foi medida usando técnica do hexafluoreto de enxofre. Nenhuma das cepas interferiu na concentração total de AGV. A cepa comercial aumentou a proporção de acetato e diminuiu propionato ( $P < 0,06$ ), ao passo que para a cepa experimental o resultado foi inverso: a relação A:P diminuiu. A cepa experimental diminuiu a emissão de metano por quilograma de MS e por unidade de energia consumida. A cepa experimental modulou a fermentação para um perfil mais acidogênico e glicogênico e criou condições ruminais menos favoráveis à metanogênese.

O efeito de aditivos à base de leveduras na concentração de amônia no fluido ruminal *in vivo* é modesto (WALLACE; NEWBOLD, 2007). Geralmente não há alteração na concentração de amônia (WIEDMEIER; ARAMBEL; WALTERS, 1987; PIVA et al., 1993; NEWBOLD; WALLACE; MCINTOSH, 1996; ERASMUS et al., 2005; GUEDES et al., 2008), aumento moderado (ALLEN; YING, 2012; VYAS et al., 2014) ou redução (HRISTOV et al., 2010). Leveduras vivas diminuíram a concentração de amônia no fluido ruminal (151,9 vs. 126,1 mg/L;  $P < 0,04$ ) de vacas submetidas a estresse por calor (MOALLEM et al., 2009). Esse efeito deveu-se possivelmente a melhor aproveitamento do N dietético, dado que houve aumento da produção de proteína no leite.

### **3.2.2 Estímulo a microrganismos ruminais por malato**

O malato disponível no fluido ruminal é rapidamente utilizado pelas bactérias. O ácido málico é precursor de succinato, que origina o propionato a partir de piruvato, pela via do ácido dicarboxílico (KOZLOSKI, 2009). Como a produção de propionato drena elétrons do meio, há consumo de  $H_2$ . A formação de propionato melhora a eficiência de extração de energia da matéria orgânica (MO) fermentada, pois contribui para eliminação de elétrons do ambiente ruminal, e assim diminui a necessidade de formação de metano.

O aumento do suprimento de malato no rúmen poderia reduzir a formação de metano por favorecer a formação de propionato, o que teria impacto positivo sobre o aproveitamento energético da dieta. Em uma meta-análise foi estudado o efeito da adição de malato sobre a produção de metano em sistemas *in vitro* (UNGERFELD; FORSTER, 2011). A recuperação de propionato oriundo de malato foi 0,48 mol/mol. A produção de metano caiu em média 0,11 mol por mol de malato adicionado, redução considerada pelos autores de baixa magnitude. No entanto, o fornecimento de malato ao rúmen pode atuar sobre a fermentação não como precursor de propionato diretamente, mas como fator de crescimento para microrganismos ruminais. A adição de malato foi estudada em sistema simulador da fermentação ruminal, alimentado com dieta de alta forragem ou alto grão (GÓMEZ; TEJIDO; CARRO, 2005). O malato aumentou a degradação da MS e da fibra, a produção de propionato, butirato, valerato e isovalerato ( $P < 0,05$ ), independente da dieta. O crescimento de microrganismos associados à fase sólida foi estimulado pelo malato na dieta rica em forragem. O fluxo de proteína microbiana a tendeu aumentar com o malato ( $P = 0,08$ ). Os autores atribuíram a maior produção de AGV observado por aumento da atividade microbiana estimulada pelo malato.

A resposta em desempenho animal à suplementação com malato é escassa na literatura. Com fornecimento de 480 g/d de DL-malato a vacas mantidas em pastagem não houve incremento no desempenho, consumo ou redução da produção de metano no rúmen (FOLEY et al., 2009). Malato foi suplementado em quatro doses crescentes (0; 7,8; 15,6 e 23,4 g/kg MS) a novilhos em crescimento fistulados no rúmen (LIU et al., 2009). O CMS médio foi de 9 kg/d sem diferença entre tratamentos. A concentração de AGV no fluido ruminal aumentou linearmente com a adição de malato, assim como decaiu o pH, a concentração de amônia e a relação A:P decorrente de aumento na concentração de propionato. A digestibilidade da MS, MO e FDN, assim como a excreção de derivados de purinas na urina, aumentaram de forma quadrática, decaindo com dose acima de 15,6 g/kg MS. O malato estimulou o crescimento de microrganismos ruminais *in vivo*.

### **3.2.3 Estímulo a microrganismos ruminais por aditivos à base de leveduras**

A cultura de levedura fornece fatores de crescimento para bactérias ruminais. Quando cultivada em meio contendo cultura de levedura (Yea Sac, Alltech), *Selenomonas ruminantium* duplicou a velocidade de crescimento ( $P < 0,05$ ), triplicou o consumo de lactato do meio ( $P < 0,05$ ) e aumentou a produção de AGV e propionato (NISBET; MARTIN, 1991). Aspartato e fumarato adicionados ao meio de cultivo quadruplicaram o consumo de lactato por *S. ruminantium*, e malato aumentou a utilização de lactato pela bactéria em mais de 10

vezes (NISBET; MARTIN, 1990). A levedura *S. cerevisiae* cultivada em anaerobiose e usando xilulose como substrato produziu e acumulou malato no meio (SENAC; HAHN-HAGERDAL, 1990). O malato presente na cultura de levedura pode ser um dos fatores solúveis que estimula o crescimento de microrganismos ruminais. O extrato filtrado e esterilizado de cultura de levedura (Diamond V XP, Mills Inc.) aumentou o crescimento bactérias utilizadoras de lactato em meio de cultivo contendo DL-lactato. A cultura de levedura aumentou também a produção de propionato e a velocidade de degradação da celulose por bactérias dos gêneros *Fibrobacter* e *Ruminococcus* cultivadas *in vitro* (CALLAWAY; MARTIN, 1997).

Quando células de levedura estão mortas ou rompidas supõe-se que o acesso das bactérias do rúmen aos compostos oriundos de seu metabolismo seja facilitado. Novilhas fistuladas no rúmen foram suplementadas com 0, 10 ou 30 g/d de levedura enzimaticamente autolisada (GOMIDE, 2013). Foram avaliadas a digestibilidade da MS consumida e a degradabilidade ruminal do feno de tifton, bem como a concentração de AGV no fluido ruminal. O fornecimento de 30 g/d do aditivo tendeu a aumentar velocidade de degradação da fração B da MS e da FDN incubada no rúmen. Foi observado aumento da concentração de ácidos graxos de cadeia ímpar (C15:0 iso + C17:0 iso) no fluido ruminal, condizente com estímulo a população fibrolítica, e aumento da síntese de proteína microbiana no rúmen. Aumento da concentração de ácidos graxos de cadeia ímpar e da população de bactérias celulolíticas em resposta a cultura de levedura já havia sido descrito por Wiedmeier, Arambel e Walters (1987).

Em estudo para caracterizar mudanças na população de microrganismos ruminais induzidas por suplementação com leveduras vivas (PINLOCHE et al., 2013) três vacas fistuladas no rúmen em início de lactação recebem um de três tratamentos: controle; 0,5 g/d ou 5 g/d de leveduras (*S. cerevisiae*, Sc47, Lallemand). O experimento foi conduzido em delineamento quadrado latino 3 x 3, com períodos de 21 dias. Os animais receberam dieta composta de silagem de milho, feno de alfafa e concentrados (69,3 % MS de forragens e 30,7 % MS concentrados). Os tratamentos foram oferecidos sobre a TMR, uma vez ao dia. As amostras de fluido ruminal foram obtidas pela cânula em dois dias consecutivos, 4 h após a alimentação e destinadas para análises de AGV e microbiologia. Foram realizadas análises de biologia molecular para classificar as populações microbianas no rúmen. A concentração de ácido láctico no fluido ruminal decresceu com a suplementação com levedura (13,2 controle; 9,6 e 4,0 mM com 0,5 g/d e 5 g/d de levedura;  $P < 0,05$ ). O pH ruminal médio foi mais alto para vacas suplementadas (5,81 controle; 5,99 com 0,5 g/dia e 6,23 com 5 g/dia;  $P < 0,05$ ). A

suplementação com levedura estimulou o aumento de populações de microrganismos utilizadores de lactato (gêneros *Megasphaera* e *Selenomonas*), e fibrolíticos (gêneros *Fibrobacter* e *Ruminococcus*). É possível explicar mudanças no pH ruminal e na digestibilidade da fibra de animais suplementados com leveduras vivas por mudanças na população microbiana ruminal. O estímulo do suplemento ao crescimento das bactérias utilizadoras de lactato favoreceu o aumento do pH ruminal e, por consequência, melhor ambiente para bactérias fibrolíticas.

A população ruminal de bactérias fibrolíticas (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens*) foi investigada (MOSONI et al., 2007) em cordeiros suplementados com leveduras vivas (*S. cerevisiae*, CNCM I-1077, Levucell SC20, Lallemand). Foram utilizados seis cordeiros fistulados no rúmen, consumindo dietas que variaram de 0 a 50% de concentrado em percentual da matéria seca. O tratamento com leveduras foi introduzido no rúmen via fístula. A microbiota do rúmen foi estudada por PCR em tempo real. A quantidade de bactérias celulolíticas diminuiu à medida que concentrado foi adicionado à dieta dos cordeiros ( $P < 0,05$ ). A adição de leveduras causou aumento de duas a quatro vezes na população de *R. albus* e *R. flavefaciens* ( $P < 0,01$ ). Contudo, não foram observadas diferenças de pH ruminal entre tratamentos. É possível que a ausência dessa resposta seja consequência do momento e da frequência de mensurações de pH ruminal. As amostras de conteúdo ruminal foram coletadas 1 h antes e 1 e 3 h após a alimentação, possivelmente não foi amostrado o rúmen no momento de máxima concentração de AGV no fluido.

A suplementação com cultura de levedura também aumenta a produção de massa microbiana no rúmen, sem efeito observado sobre a digestibilidade ruminal de nutrientes (HRISTOV et al., 2010). Oito vacas multíparas com  $91 \pm 4,5$  dias em lactação (DEL) fistuladas no rúmen receberam 0 ou 56 g/vaca/dia de cultura de levedura (Diamond V, Mills Inc., Cedar Rapids), em delineamento de reversão simples, com períodos de 28 dias. A dieta experimental era composta por silagem de milho (34,8% MS), silagem pré-secada de alfafa (9,8% MS), feno de gramínea (5,9% MS), concentrado composto por milho moído, farelo de canola, soja integral, caroço de algodão, subprodutos de biscoito e açúcar, minerais e vitaminas (49,5% MS). As amostras de conteúdo ruminal foram coletadas nos dias 23 e 24 de cada período, 0, 2, 4, 6, 8, 10, 14, 18, 24, 30, e 36 h após a alimentação da manhã. Fezes foram amostradas do reto e usado cinzas insolúveis em ácido usadas como marcador interno para digestibilidade aparente no trato total. Coleta total de urina foi realizada nos dias 25, 26, 27 e 28 de cada período. A secreção urinária de derivados da purina foi usada como

estimativa para o fluxo de proteína microbiana para o duodeno. Nos dias 27 e 28 de cada período foram coletadas amostras de sangue para determinação de N-ureico e glicose plasmática. A produção de leite foi registrada diariamente e três amostras da última semana de cada período foram obtidas para composição do leite. A produção de leite (46,5 vs. 46,4 kg/d;  $P = 0,95$ ) e sólidos não diferiu entre tratamentos. O pH ruminal não diferiu entre tratamentos, assim como concentração de AGV ou relação A:P. Houve tendência de redução na concentração de amônia do fluido ruminal dos animais suplementados (3,6 vs. 3,0 mM;  $P = 0,08$ ). A excreção urinária de alantoína (597 vs. 654 mmol/d) e a estimativa do fluxo de proteína microbiana para o duodeno tenderam a aumentar com cultura de levedura ( $P = 0,08$ ). As perdas de N na urina e fezes não diferiram entre tratamentos. Os teores de N-ureico e glicose plasmático não diferiram entre tratamentos, a despeito de diferença numérica em glicose (55,4 vs. 58,0 mg/100 mL;  $P = 0,14$ ). O consumo e digestibilidade aparente de MS, MO, FDN e amido não diferiram entre tratamentos. Os autores concluíram que a cultura de levedura foi capaz de aumentar a síntese de proteína microbiana no rúmen, mas sem outros efeitos na fermentação ruminal.

A diminuição da concentração de protozoários no fluido ruminal é um outro mecanismo possível de aumento da produção bacteriana no rúmen em resposta à cultura de levedura. A defaunação está associada a maior fluxo de proteína microbiana para o duodeno (VEIRA, 1986). A adição de 1,5 g/dia de cultura de levedura a sistema simulador da fermentação ruminal estimulou o crescimento microbiano (NEWBOLD; MCINTOSH; WALLACE, 1998), com aumento de 38% na população total de bactérias e de 25% em bactérias viáveis ( $P < 0,05$ ). O aumento de bactérias viáveis foi associado ao aumento de biomassa bacteriana sintetizada. Contudo, a população de bactérias celulolíticas e a degradação da MS em 24 h não diferiram entre tratamentos. A cultura de levedura reduziu a contagem de protozoários ( $3,77 \times 10^3/\text{mL}$  vs.  $0,56 \times 10^3/\text{mL}$ ;  $P < 0,01$ ). A defaunação do meio cultivado foi uma possível explicação para o aumento da população de bactérias.

Em carneiros fistulados no rúmen, a suplementação de 1 g/d de cultura de levedura reduziu a contagem de protozoários no fluido ruminal de  $69,4 \times 10^4$  para  $39,7 \times 10^4$  células/mL ( $P < 0,05$ ) (GARCÍA et al., 2000). No entanto, a redução na contagem de protozoários em consequência da suplementação de aditivos à base de levedura não é comumente relatada na literatura. Há relatos de aumento no número de protozoários com o uso de leveduras *in vitro* (CARRO; LEBZIEN; ROHR, 1992) e *in vivo* (PLATA et al., 1994; AL IBRAHIM et al., 2010).

### 3.2.4 Modulação do pH ruminal

O efeito da suplementação de leveduras sobre o pH ruminal descrito na literatura é variável. Em muitos estudos *in vivo* o uso de leveduras não teve efeito sobre o pH do fluido ruminal (WIEDMEIER; ARAMBEL; WALTERS, 1987; ERASMUS, BOTHA, KISTNER, 1992; ERASMUS et al., 2005; LONGUSKI; YING; ALLEN, 2009; BITENCOURT et al., 2011; FERRARETTO, SHAVER, BERTICS, 2012). Em outros houve aumento do pH ruminal (GUEDES et al., 2008; MOALLEM et al., 2009; PINLOCHE et al., 2013; VYAS et al., 2014), enquanto a diminuição do pH é relatada com menor frequência (HARRISON et al., 1988; PIVA et al., 1993; CHUNG et al., 2011).

A estabilização do pH ruminal por aditivos à base de leveduras parece estar ligada ao estímulo a microrganismos degradadores e inibição de microrganismos produtores de lactato (CHAUCHEYRAS-DURAND et al., 2012). Leveduras vivas poderiam limitar a atividade de bactérias produtoras de lactato por competição por açúcares solúveis, em condições anaeróbicas. O cultivo de *S. cerevisiae* e *Streptococcus bovis* reduziu a produção de lactato *in vitro*, em comparação ao cultivo isolado da bactéria (CHAUCHEYRAS et al., 1996). O fornecimento de 5 g/d de leveduras vivas (*S. cerevisiae*,  $10^{10}$  cfu/g, Biosaf Sc 47, Lesaffre) a vacas em lactação fistuladas no rúmen diminuiu a concentração de lactato no fluido ruminal, em comparação ao controle e a vacas suplementadas com 150 g/d de bicarbonato de sódio (MARDEN et al., 2008). Os animais foram alimentados com silagem de milho (51,5 % da MS), alfafa (5,7 % da MS) e concentrados (42,8 % da MS). A dieta continha 37,8 % de FDN na MS. O pH ruminal médio e mínimo de vacas alimentadas com levedura foi 6,14 e 5,90 respectivamente, mais alto que o observado nos animais no controle (5,94 e 5,57;  $P = 0,03$ ) e não diferiu em relação aos animais suplementados com bicarbonato. A concentração de AGV no fluido ruminal aumentou com a levedura e o bicarbonato em relação ao controle (99,4 e 95,3 mM vs. 85,3 mM;  $P < 0,01$ ), com aumento do propionato nos animais consumindo levedura (25,8 mM vs. 20,0 e 18,0 mM;  $P < 0,01$ ). O autor atribuiu o efeito da levedura sobre o pH ruminal à diminuição na concentração de lactato pela conversão desse a propionato. A ação do bicarbonato sobre o pH se deu pela capacidade de neutralizar prótons no fluido ruminal.

Outra possível explicação para o aumento do pH em resposta a leveduras é possível estímulo à população de protozoários. Leveduras vivas aumentaram a concentração de protozoários no fluido ruminal de vacas em início de lactação (AL IBRAHIM et al., 2010). Protozoários engolfam grânulos de amido e assim competem com bactérias produtoras de

lactato por substrato. A taxa fracional de degradação do amido de milho grão úmido no rúmen foi mais alta em cordeiros defaunados (MENDOZA; BRITTON; STOCK, 1993).

O aumento do pH ruminal foi demonstrado com a suplementação de leveduras vivas a ovelhas fistuladas no rúmen após mudança abrupta de dieta de alta forragem para dieta de alto grão (MICHALET-DOREAU; MORAND, 1997) e com cultura de levedura a garrotes consumindo dieta com 50% de forragem e 50% de concentrado na MS (WILLIAMS; TATI; NEWBOLD, 1991). O efeito sobre o pH ruminal parece não depender da presença de células vivas de levedura no aditivo.

Em trabalho realizado com leveduras mortas e vivas Vyas et. al. (2014) avaliaram o efeito da viabilidade das células de levedura (*S. cerevisiae*, AB Vista) sobre o pH ruminal. Seis novilhas de corte fistuladas no rúmen foram usadas. Os animais consumiram dieta contendo silagem de cevada (40% MS) feno de gramínea (10% MS) e concentrado (50% MS), com 33,8% de amido na MS. Os tratamentos foram: controle; 4 g/d ( $10^{10}$  UFC/g) de leveduras vivas (AY); ou 4 g/d da mesma cepa de levedura autoclavada (KY). Os tratamentos foram fornecidos diretamente no rúmen, via cânula. O pH ruminal foi monitorado continuamente, por sistema eletrônico introduzido no rúmen. Independente da viabilidade das células de levedura no suplemento utilizado, novilhas suplementadas tiveram pH ruminal médio mais alto (6,06 controle; 6,28 AY; 6,26 KY;  $P = 0,02$ ) e pH mínimo mais alto (5,48 controle; 5,65 AY; 5,67 KY;  $P < 0,01$ ). O tempo com pH ruminal abaixo de 5,8 e de 5,6 foi mais baixo para animais nos tratamentos AY e KY ( $P < 0,01$ ) e não foi diferente entre eles. Apesar das diferenças entre tratamentos no pH, não foi observada mudança na concentração de AGV ou de lactato no fluido ruminal. A diversidade de microrganismos degradadores de ácido láctico foi estudada, mas sem efeito tanto de leveduras vivas quanto autoclavadas. Sendo assim, o efeito dos suplementos sobre o pH ruminal não pôde ser explicado pelo consumo de ácido láctico. Conclui-se que o fornecimento de leveduras vivas ou mortas é capaz de aumentar o pH ruminal e diminuir o risco de acidose, mas não foi possível esclarecer o mecanismo de ação.

Cepas diferentes de *S. cerevisiae* variam quanto à habilidade de modulação do pH ruminal (CHUNG et al., 2011). Foi realizado teste com duas cepas vivas de *S. cerevisiae*, uma disponível comercialmente (cepa 1) e outra em experimentação (cepa 2), (Lallemand Animal Nutrition). As leveduras foram fornecidas a vacas secas não gestantes fistuladas no rúmen. O tempo de pH  $< 5,8$  diminuiu em relação ao controle com o uso da cepa 1, mas aumentou com o uso da cepa 2. Apesar disso, houve diminuição de apenas 2,3% na digestibilidade da FDN com o uso da cepa 2, sem diferença estatística. A velocidade de degradação ruminal da MO

não foi estudada nesse experimento, mas pelo perfil de AGV no rúmen (menor relação A:P) aparentemente a cepa 2 induziu um padrão de fermentação mais rápido e propianogênico.

### 3.2.5 Concentração de O<sub>2</sub> no fluido ruminal

Apesar do rúmen ser considerado um ambiente anaeróbio, oxigênio é transferido para o fluido ruminal via saliva, aderido ao alimento ou por difusão oriunda do sangue. O oxigênio é tóxico para bactérias ruminais, sobretudo celulolíticas, que dependem da adesão às partículas de alimento para digestão. A adesão de *Fibrobacter succinogenes* à celulose diminuiu na presença de oxigênio (ROGER et al., 1990). A diminuição da concentração de oxigênio no fluido ruminal seria, portanto, benéfica ao crescimento de microrganismos ruminais, com aumento da eficiência de síntese de proteína microbiana no rúmen.

Em estudo em simulador da fermentação ruminal foi obtida diminuição da concentração de oxigênio no fluido quando suplementado com leveduras vivas (NEWBOLD; WALLACE; MCINTOSH, 1996). Os autores compararam duas cepas de *S. cerevisiae* (NCYC 240, NCYC 1026), uma com metabolismo normal e outra com consumo deficiente de oxigênio. A incubação foi feita em preparação livre de oxigênio, e em seguida O<sub>2</sub> foi adicionado ao sistema via água oxigenada. O consumo de oxigênio do sistema foi monitorado por dispositivo eletrônico. Foi analisada contagem de bactérias na digesta. O desaparecimento *in vitro* do oxigênio no fluido ruminal foi mais rápido quando adicionado leveduras ( $P < 0,05$ ). A cepa de levedura com metabolismo normal estimulou o crescimento de bactérias, aumentando a contagem total de bactérias celulolíticas. No entanto, esse efeito não foi observado com a cepa de levedura deficiente no consumo de oxigênio. Os autores concluíram que a presença de leveduras vivas é benéfica à microflora celulolítica por sua ação respiratória e consumo de O<sub>2</sub>.

No entanto, é difícil fazer inferência dos resultados *in vitro* descritos acima sobre a fermentação ruminal *in vivo*, pois a concentração de oxigênio adicionada no fermentador variou de 3,2 a 7,5 mM, mais alta que a observada no rúmen. A concentração de O<sub>2</sub> no fluido ruminal de bovino alimentado com feno foi de 0,3 mM e variou de 0 mM antes da alimentação a 1,02 mM após a alimentação, em caprinos consumindo feno e concentrados (SCOTT et al., 1983). Há pouca evidência de que a menor concentração de oxigênio no fluido ruminal seja benéfica à atividade microbiana no rúmen *in vivo*. Em apenas um estudo revisado a suplementação com leveduras vivas (*S. cerevisiae*, Sc47, Lallemand) a vacas em lactação reduziu a concentração de O<sub>2</sub> no rúmen (PINLOCHE et al., 2013). Houve aumento da população de bactérias degradadoras de fibra dos gêneros *Fibrobacter* e *Ruminococcus*. A

redução da concentração de O<sub>2</sub> no fluido ruminal foi atribuída ao metabolismo das próprias leveduras no rúmen.

No entanto, o consumo de O<sub>2</sub> por bactérias e protozoários ruminais em fermentação *in vitro* foi de 4.440 nmol de O<sub>2</sub>/min/mL (ELLIS; WILLIAMS; LLOYD, 1989), maior do que o relatado por Newbold, Wallace e Mcintosh (1996) no fermentador acrescido de leveduras vivas (189 nmol de O<sub>2</sub>/min/mL). O aumento do consumo de oxigênio possivelmente deve-se a estímulo à atividade microbiana no rúmen pela levedura e não diretamente pela atividade metabólica desta. Microrganismos anaeróbios facultativos e protozoários podem reduzir a concentração de O<sub>2</sub> no fluido ruminal. O efeito já descrito de estímulo da microbiota ruminal por produtos à base de leveduras poderia assim contribuir para o consumo de oxigênio no rúmen.

### 3.2.6 Digestibilidade de nutrientes

Em meta-análise que sumarizou os resultados de 110 estudos *in vivo* com leveduras vivas e mortas (DESNOYERS et al., 2009) foi encontrado aumento na digestibilidade da MO de 70,2% para 71,0% do consumido ( $P < 0,01$ ). Aumento da digestibilidade da fibra é um mecanismo de ação plausível de aditivos à base de leveduras (WILLIAMS; TATI; NEWBOLD, 1991). O aumento da digestibilidade da fibra pode ser consequência de pH ruminal mais alto ou de maior crescimento de bactérias fibrolíticas no rúmen (WIEDMEIER; ARAMBEL; WALTERS, 1987). No entanto, aumento de digestibilidade de nutrientes nem sempre é observado (ALLEN, M. S.; YING, 2012), mesmo quando há ganho em desempenho leiteiro em vacas suplementadas com leveduras (WOHLT; FINKELSTEIN; CHUNG, 1991; WOHLT; CORCIONE; ZAJAC, 1998; MOALLEM et al., 2009).

Bitencourt et al. (2011) suplementaram leveduras vivas (*S. cerevisiae*, CNCM I-1077, Lallemand) a vacas leiteiras consumindo dieta composta de silagem de milho, polpa cítrica, feno de tifton, milho floculado, vitaminas e minerais. Vinte e três vacas leiteiras receberam dose de 1 g/d ( $1 \times 10^{10}$  UFC de leveduras vivas) ou o tratamento controle. Animais do tratamento com levedura tiveram maior produção de proteína no leite (0,908 kg/d vs. 0,931 kg/d;  $P = 0,05$ ) e tenderam a maior produção de leite (28,5 kg/d vs. 29,4 kg/d;  $P = 0,11$ ), produção de lactose no leite, CMS ( $P = 0,11$ ), consumo de MO ( $P = 0,10$ ) e de MO digestível ( $P = 0,07$ ). Houve tendência de aumento na digestibilidade da FDN (43,2% vs. 48,1%;  $P = 0,08$ ), o que explica o ganho em digestibilidade da MO. Os autores não encontraram efeito da levedura na excreção urinária de alantoína, o que sugere que o aumento de proteína do leite observado não foi por aumento da produção de proteína microbiana ruminal. Os autores não

puderam elucidar o mecanismo do aumento da digestibilidade da fibra nesse estudo. Esses resultados estão de acordo com Guedes et al. (2008), que encontram aumento da degradabilidade ruminal da fibra de silagem de milho *in situ* em vacas alimentadas com 0,3 ou 1 g/d de leveduras vivas (*S. cerevisiae*, Levucell SC,  $1 \times 10^{10}$  UFC/g, Lallemand).

Experimento foi realizado para testar duas doses de leveduras vivas a vacas consumindo dieta com alto teor de amido (FERRARETTO; SHAVER; BERTICS, 2012). Foram usadas 64 vacas multíparas em lactação consumindo dieta com 31,4% MS de amido com 0, 2 ou 4 g/dia de leveduras vivas (*S. cerevisiae*, Procreatin-7, Lesaffre) ou dieta com 20,9% MS de amido sem leveduras. O pH e a concentração de AVG no fluido ruminal foram determinados em amostras coletadas por ruminocentese. Assim como no trabalho de Bitencourt et al. (2011), não foi encontrada diferença no pH do fluido ruminal entre tratamentos. A digestibilidade da MO foi maior no tratamento com leveduras ( $P < 0,01$ ), e não diferiu entre as doses 2 ou 4 g/d. A digestibilidade da FDN foi maior no tratamento com dose 4 g/d, comparado a 0 e 2 g/d nas dietas de alto amido (30,1 %; 31,5 %; 37,6 % nas doses de 0, 2 e 4 g/d;  $P < 0,01$ ). Os autores concluíram que a suplementação de leveduras vivas foi capaz de aumentar a digestibilidade da fibra em dieta de alto amido, mas esse resultado não pôde ser explicado por mudanças no ambiente ruminal. Os resultados deste experimento e os relatados por Bitencourt et al. (2011) sugerem que o aumento em digestibilidade de nutrientes induzido por suplementação de leveduras seja independente da mudança no pH do fluido ruminal.

O aumento do fluxo de proteína microbiana para o duodeno em vacas suplementadas com cultura de levedura foi relatado, sem que ocorresse ganho na digestibilidade aparente no trato total da MO (ERASMUS; BOTHA; KISTNER, 1992). Foram utilizadas seis vacas da raça Holandesa em lactação ( $56 \pm 94$  DEL), fistuladas no rúmen em experimento de reversão simples. A dieta continha palha de trigo (25% MS), feno de alfafa (10% MS), sorgo moído (10% MS), milho moído (32,75% MS), torta de girassol (10% MS) e farinha de peixes, uréia, melaço, calcário, vitaminas e minerais (12,25% MS). A dieta tinha teor de 16,5% de PB e 31,5% de FDN na MS. Os animais tratados receberam 10 g/d de cultura de levedura (Yea Sac, Alltech) via cânula ruminal uma vez ao dia. O óxido de cromo foi usado como marcador para análises de digestibilidade. A cultura de levedura aumentou o CMS (21,8 vs. 23,2 kg/d;  $P < 0,10$ ). O pH ruminal não diferiu entre controle e tratado, assim como não foi observada diferença nos demais parâmetros ruminiais estudados (produção de AGV, concentração de amônia e contagem de bactérias celulolíticas). Apenas o pico de concentração de ácido láctico

no rúmen foi mais baixo para animais consumindo a cultura de levedura (1,93 vs. 1,73 mM;  $P < 0,05$ ).

Foi estudada a digestibilidade ruminal verdadeira e aparente no trato digestivo total de nutrientes em resposta à suplementação com culturas de *S. cerevisiae* e *A. oryzae* fornecidas a vacas em lactação canuladas no rúmen e no duodeno (YOON; STERN, 1996). Quatro vacas foram utilizadas, alimentadas com uma dieta basal, basal acrescida de 57 g/d de cultura de *S. cerevisiae*; basal acrescida de 3 g/d de extrato de *A. oryzae*; ou basal com *S. cerevisiae* e *A. oryzae* nas doses acima. A dieta foi baseada em silagem de milho, feno de alfafa (50% MS) e concentrados (50% MS). Vacas foram amostradas no rúmen e duodeno para pH, perfil de AVG, amônia, microbiologia e fluxo de nutrientes. Houve aumento da digestibilidade ruminal da MO e diminuição do fluxo de MO para o intestino nos animais suplementados com *S. cerevisiae*. A digestibilidade aparente da MO no trato total não diferiu entre tratamentos, a despeito da maior digestibilidade ruminal verdadeira. A diferença entre digestibilidade ruminal verdadeira e a digestibilidade aparente no trato total pode ter sido compensada pela digestão intestinal.

Vacas sob estresse por calor suplementadas com 4 g/d de leveduras vivas (*S. cerevisiae*, Probio-Sacc, Biochem) tiveram maior digestibilidade aparente no trato total da FDN e maior percentual de gordura no leite, que foi atribuído a melhoria da digestibilidade da fibra (DEHGHAN-BANADAKY et al., 2013). Entretanto, outros autores não encontraram diferença na digestibilidade da MS ou da FDN em resposta a leveduras *in vivo* (HARRISON et al., 1988) ou na degradabilidade da MS em sistema de simulação da fermentação ruminal (OEZTUERK, 2009).

### **3.3 Consumo de alimentos e desempenho leiteiro de vacas suplementadas com leveduras**

A resposta produtiva de animais em lactação à suplementação com leveduras varia entre estudos e depende do tipo de aditivo utilizado, da interação com condições ambientais, composição da dieta (HRISTOV et al., 2010) e estágio de lactação dos animais (KUNG JR et al., 1997). O aumento da produção de leite e sólidos em resposta a aditivo à base de levedura está associado ao aumento de CMS (DESNOYERS et al., 2009).

#### **3.3.1 Consumo de alimentos e produção de leite**

Vacas em início de lactação aumentam o CMS e a produção de leite em resposta a leveduras (WOHLT; CORCIONE; ZAJAC, 1998; POPPY et al., 2012), ao passo que em animais após o pico da lactação o CMS não responde ao aditivo (ERDMAN; SHARMA, 1989) ou há redução (OLIVEIRA et al., 2010). Em apenas um estudo revisado vacas em

início de lactação ( $58,4 \pm 6,5$  DEL), alimentadas com levedura enzimaticamente hidrolisada na dose de 30 g/d tiveram redução de 2,1 kg/d de CMS, mas sem significância estatística ( $P = 0,14$ ) (YUAN et al., 2015a).

Para avaliar a resposta de vacas em transição e início de lactação, a cultura de levedura foi fornecida desde a quarta semana antes do parto até a 18<sup>o</sup> semana de lactação (WOHLT; FINKELSTEIN; CHUNG, 1991). Foram utilizadas 24 vacas primíparas blocadas de acordo com a data prevista de parto. Os tratamentos foram 10 g/d de cultura de levedura ou controle, fornecido uma vez ao dia sobre a dieta. A cultura de levedura aumentou a produção de leite durante as 18 primeiras semanas de lactação, efeito atribuído ao maior pico de produção dos animais consumindo levedura (29,5 vs. 28,5 kg/d;  $P = 0,10$ ). Após o parto, a cultura de levedura tendeu a aumentar o CMS nas 6 primeiras semanas de lactação. A partir da 7<sup>a</sup> semana, no entanto, animais suplementados com levedura consumiram menos ( $P < 0,01$  para interação tempo x tratamento). Entre a 7<sup>a</sup> e a 18<sup>a</sup> semana de lactação, a produção de leite foi semelhante entre tratamentos, mas dados de eficiência alimentar não foram relatados.

Uma meta-análise foi realizada com 110 estudos envolvendo 157 experimentos e 376 tratamentos para avaliação dos efeitos de suplementação de *S. cerevisiae* sobre o consumo, produção e fermentação ruminal (pH, concentração AGV e ácido lático, proporção A:P) em animais leiteiros e de corte (DESNOYERS et al., 2009). Nesse estudo também foi analisado o efeito do consumo, da composição da dieta e da dose de suplemento utilizada sobre a resposta à suplementação. Os autores reuniram apenas estudos *in vivo*, com grandes e pequenos ruminantes de produção. Foi levada em consideração a dose dos suplementos em  $\log^{10}$  UFC/peso vivo, dado que os experimentos envolviam diferentes espécies. O fornecimento de leveduras a ruminantes aumentou o CMS e a produção de leite (+ 0,4 kg/d;  $P = 0,04$  e + 1,2 kg/d;  $P < 0,01$  respectivamente) e tendeu a aumentar o teor de gordura do leite (+ 0,05%;  $P = 0,07$ ). O efeito da levedura sobre o consumo aumentou com maior proporção de concentrado na dieta ( $P = 0,04$ ), e o efeito sobre a produção de leite foi maior quanto maior o CMS ( $P < 0,01$ ), proporção de concentrado ( $P < 0,01$ ), FDN ( $P = 0,001$ ) e proteína bruta ( $P = 0,001$ ). O efeito da levedura em produção de leite e consumo aumentou linearmente com o aumento da dose fornecida.

Para testar os efeitos de cultura de levedura e levedura hidrolisada enzimaticamente sobre a produção de vacas de leite foi realizado um experimento utilizando 150 vacas múltíparas avaliadas do parto até a 14<sup>a</sup> semana de lactação (NOCEK; HOLT; OPPY, 2011). Os animais foram blocados por produção e alocados a um de três tratamentos: controle, 56 g/dia de cultura de levedura ou 28 g/dia de levedura enzimaticamente hidrolisada, misturados

à dieta. A unidade experimental foi baía, sendo duas baias por tratamento. Os dados foram analisados como medidas repetidas no tempo, com baía aninhada em tratamento. Os animais consumiram dieta composta de silagem de milho (58% MS), alfafa (13,5% MS) e concentrados (27,9% MS). Animais consumindo cultura de levedura e levedura enzimaticamente hidrolisada aumentaram a produção de leite (+ 1,5 kg/d em média;  $P = 0,01$ ). Houve aumento da produção de gordura de 1,48; 1,55 e 1,56 kg/d e proteína do leite 1,17; 1,21 e 1,24 kg/dia nos tratamentos controle, cultura de levedura e levedura enzimaticamente hidrolisada, respectivamente ( $P = 0,01$ ). Os dados de CMS não foram relatados.

Foi realizada uma meta-análise utilizando apenas estudos com cultura de leveduras (POPPY et al., 2012), visando sumarizar os efeitos sobre a produção de leite, leite corrigido para gordura (LCG), produção de proteína e gordura do leite e o CMS. Os autores selecionaram 36 estudos com 69 comparações para a análise, todos testando o mesmo produto comercial (Diamond V, Mills Inc.). Os autores estratificaram os trabalhos de acordo com diversos fatores, entre eles a data de parto e estágio da lactação no período experimental (definido como lactação inteira, abaixo de 70 DEL ou acima de 70 DEL). Houve aumento médio da produção de 1,18 kg/d, de 1,61 kg/d de LCG e 1,65 kg/d em leite corrigido para energia (LCE) com o fornecimento de cultura de levedura. A produção de gordura e proteína também tiveram aumento significativo de 0,06 kg/d ( $P < 0,01$ ) e 0,03 kg/d ( $P = 0,03$ ) respectivamente. Quanto ao CMS houve diferença de resultados na estratificação dos estudos por estágio da lactação. Em início de lactação, a suplementação com cultura de levedura induziu aumento no consumo de MS (+ 0,62 kg/d;  $P < 0,01$ ), enquanto que para lactação avançada houve queda no consumo (- 0,78 kg/d;  $P < 0,01$ ). O aumento de consumo no início da lactação é uma meta de nutricionistas e está relacionado à saúde de vacas leiteiras. O menor consumo em lactação avançada, sem prejuízo da produção, aumenta a eficiência da utilização de alimentos e é desejável.

O CMS em vacas suplementadas com cultura de levedura pode ser afetado por aumento da velocidade de degradação de nutrientes induzida pelo aditivo. Em trabalho com vacas fistuladas no rúmen e duodeno (ALLEN; YING, 2012) houve interação entre o fornecimento de cultura de levedura (56 g/d, Diamond V, Mills Inc.), a velocidade de digestão ruminal do amido e o CMS antes do experimento ( $P < 0,01$ ). A cultura de levedura aumentou a taxa de degradação ruminal do amido em animais consumindo até 26 kg MS/d antes do experimento. A dieta experimental continha alto teor de amido (30,1% MS). A degradação

mais rápida do amido pode ter aumentado o fluxo de propionato para o fígado, e aumentado o intervalo de refeições, com consequente menor CMS.

### 3.3.2 Produção de sólidos no leite

Aditivos à base de leveduras têm efeito benéfico à produção de gordura no leite em vacas consumindo dietas ricas em carboidratos rapidamente fermentáveis (WILLIAMS; TATI; NEWBOLD, 1991). Podem ainda aumentar a produção de proteína em animais submetidos a condições estressantes, tais como estresse por calor (BRUNO et al., 2009; MOALLEM et al., 2009) e o peri-parto (ZAWORSKI et al., 2014). Vacas consumindo cultura de levedura não tiveram queda na produção de gordura do leite quando a velocidade de degradação do amido da dieta foi aumentada bruscamente, mas sem alteração no perfil de ácidos graxos da gordura do leite (LONGUSKI; YING; ALLEN, 2009).

O uso de cultura de levedura (Diamond V, Mills Inc.) foi testado juntamente com caroço de algodão e uma fonte de amido rapidamente degradável (milho gelatinizado) com o intuito de prevenir a queda na digestão de fibra e gordura do leite (COOKE; BERNARD; WEST, 2007). Foram usadas trinta vacas em lactação ( $182 \pm 40$  DEL) alocadas a um de três tratamentos: caroço de algodão coberto com amido gelatinizado (WCS-C), WCS-C acrescido de 0,5% de ureia ou WCS-C acrescido de 2,0% de cultura de levedura (WCS-Y). As dietas experimentais foram iso-FDN. Os tratamentos não interferiram no CMS ou digestibilidade dos nutrientes. Houve tendência de aumento da produção de gordura do leite no tratamento WCS-Y (1,45 vs. 1,57 kg/d;  $P = 0,10$ ) e de decréscimo do percentual de proteína no leite. Com pequeno aumento da produção de gordura sem alteração no CMS, a eficiência alimentar expressa como LCE por CMS foi maior no tratamento WCS-Y (1,50 vs. 1,60;  $P = 0,02$ ). Resultado semelhante foi obtido por Piva et al. (1993), com aumento na produção de gordura e leite corrigido para gordura em resposta a 10 g/d de cultura de levedura fornecida a vacas após o pico de lactação.

Foi realizado experimento com vacas em lactação suplementadas com leveduras vivas em dieta com alto amido (FERRARETTO; SHAVER; BERTICS, 2012). Os tratamentos consistiam de duas dosagens (2 ou 4 g/d) de leveduras vivas (*S. cerevisiae*, Procreatin-7, Lesaffre) em dieta com alto amido (30% MS) comparada à dieta com baixo amido (20% MS) sem leveduras. Foram usadas 64 vacas multíparas ( $114 \pm 37$  DEL) distribuídas aleatoriamente a 32 portões automáticos de alimentação. Os animais foram casualizadamente distribuídos a um dos quatro tratamentos: alto amido sem leveduras (HS0), alto amido com 2 g/dia de leveduras (HS2), alto amido com 4 g/dia de leveduras (HS4) ou baixo amido sem leveduras

(LS0). Os animais passaram por uma semana de adaptação aos portões e duas semanas de adaptação à dieta, consumindo 50% MS da dieta HS e 50% MS da dieta LS. A dieta HS era baseada em silagem de milho (37,5% MS), silagem de alfafa (12,5% MS), milho moído (25,1% MS), casca de soja (1,9% MS), farelo de soja (14,6% MS) e outros concentrados, minerais e vitaminas perfaziam 8,2% MS. A dieta LS foi obtida por substituição parcial do milho moído (de 25,1% MS para 10,2% MS) por casca de soja (de 1,9% MS para 17,3% MS). Os animais foram alimentados três vezes ao dia e os tratamentos fornecidos junto à dieta. O CMS não diferiu entre tratamentos HS, ou seja, a levedura viva não afetou consumo nessa situação. A produção de leite não foi afetada pela levedura ou pelo teor de amido da dieta (45,1 kg/d em HS0; 44,2 kg/d em HS2; 44,8 kg/d em HS4 e 44,0 kg/d em LS0;  $P = 0,82$ ). Houve tendência de aumento no teor de gordura do leite em HS4 comparado a HS0 ( $P = 0,06$ ). O teor de gordura em HS4 foi similar ao tratamento LS0 (3,57% e 3,69% respectivamente). Baseados nesses resultados os autores sugerem que a suplementação com leveduras pode ser uma estratégia para evitar depressão de gordura do leite em dietas com alto amido.

Nesse sentido, Longuski, Ying e Allen (2009) fizeram um experimento com oito vacas em lactação fistuladas no rúmen, suplementadas com cultura de levedura, em dieta e alto amido (35% MS). A suplementação preveniu a queda da gordura do leite quando a velocidade de fermentação do amido da dieta foi drasticamente aumentada pela substituição total de milho seco por milho grão úmido moído fino. Os autores, contudo, não foram capazes de apontar o possível mecanismo de ação, dado que a cultura de levedura não alterou parâmetros ruminais (pH, concentração de AGV e lactato, proporção A:P) ou percentual de ácidos linoleicos conjugados no leite.

Animais sob estresse por calor suplementados com 30 g/d de cultura de levedura tiveram maior produção de proteína no leite (1,19 vs. 1,22 kg/d;  $P = 0,05$ ) e menor teor N-ureico plasmático (14,3 vs. 12,8 mg/dL;  $P = 0,05$ ) (BRUNO et al., 2009). O menor N-ureico no plasma sem diferenças de consumo, sugere melhor aproveitamento da proteína dietética por animais tratados com cultura de levedura. Em vacas multíparas suplementadas com 0, 56 ou 112 g/d de cultura de levedura (Original XP Diamond V, Mills Inc.) durante o período de transição e as quatro primeiras semanas de lactação, a produção de proteína do leite foi de 1,09; 1,22 e 1,24 kg/d respectivamente ( $P = 0,05$ ). Nesse estudo, como não houve diferença em percentual de proteína no leite, o ganho em produção de proteína diário se deu por aumento da produção de leite, que foi em média 5,15 kg/d em animais suplementados ( $P = 0,03$ ) e não diferiu entre as doses utilizadas ( $P = 0,69$ ) (ZAWORSKI et al., 2014).

### 3.4 Suplementação de leveduras para vacas em lactação sob estresse por calor

A suplementação de leveduras vivas a vacas leiteiras durante o verão foi testada para verificar os efeitos sobre o desempenho, eficiência alimentar e digestibilidade (MOALLEM et al., 2009). Foram usadas 28 vacas holandesas múltíparas e 14 primíparas ( $114 \pm 54$  DEL) alojadas em baias equipadas com sistema eletrônico de alimentação individual. As vacas foram blocadas por paridade e alocadas a um dos dois tratamentos: controle ou 1 g de levedura viva (*S. cerevisiae*, SC47, Biosaf, Lesaffre) para cada 4 kg de MS consumida por dia, oferecida sobre a dieta, misturada a 100 g de milho moído, uma vez ao dia. As vacas foram alimentadas com dieta composta por silagem de trigo (20,2% MS), feno (11,8% MS) e concentrados, minerais e vitaminas (68% MS) uma vez ao dia e o consumo registrado diariamente. Amostras de leite foram coletadas para composição e contagem de células somáticas. Amostras fecais foram obtidas para digestibilidade em três dias consecutivos e o FDN indigestível usado como marcador. O ITU mínimo e máximo durante o experimento foi de  $69,4 \pm 3,5$  e  $79,3 \pm 2,1$  em média, respectivamente. Foi obtido aumento da produção de leite com o fornecimento de leveduras vivas (36,3 vs. 37,8 kg/d;  $P < 0,01$ ). A suplementação também aumentou o CMS (24,1 vs. 24,7 kg/d;  $P < 0,01$ ) e a produção de leite corrigido para 4% de gordura (32,8 vs. 34,8 kg/d;  $P < 0,01$ ). A eficiência alimentar, medida como leite corrigido para 4% de gordura por quilo de MS consumido foi maior para o tratamento com levedura. Não houve alteração no teor de gordura ou proteína do leite, e os animais tratados com levedura produziram mais sólidos (kg/d) por aumento da produção de leite. O percentual de lactose no leite foi mais alto para vacas tratadas com levedura (4,86 vs. 4,91%;  $P = 0,02$ ), relacionado a maior produção de leite. A suplementação não afetou a digestibilidade da MS, MO ou de outros nutrientes.

Estudo foi conduzido em duas fazendas comerciais na Califórnia para avaliar o efeito da suplementação com cultura de levedura sobre a produção de vacas leiteiras sob estresse por calor (BRUNO et al., 2009). O ITU médio esteve acima de 72 e o ITU máximo acima de 81 no período experimental. Foram utilizadas 723 vacas da raça Holandesa múltíparas, alocadas aleatoriamente no tratamento controle ( $n = 361$ ) ou suplementadas com 30 g/dia de cultura de levedura ( $n = 362$ ). A dieta continha, com base na MS: feno de alfafa (20,2 e 23,5%), silagem de milho (8,4 e 11,8%), silagem de trigo (16,8 e 11,0%) e concentrado (54,6 e 53,7%), fornecida aos animais duas vezes ao dia. As vacas foram alojadas em baias, com uma baia por tratamento na fazenda 1 e duas baias por tratamento na fazenda 2. O consumo foi mensurado diariamente por baia. Foi mensurada a produção de leite e coletadas amostras para análise do

teor de sólidos e contagem de células somáticas a cada duas semanas. A temperatura retal foi mensurada semanalmente de 22 vacas por tratamento. O CMS não diferiu entre tratamentos. Animais consumindo cultura de levedura produziram 1,2 kg/d a mais de leite ( $P = 0,02$ ), porém com menor teor de gordura (3,58% vs. 3,48%;  $P < 0,01$ ), o que levou a menor excreção de energia no leite (2,85 vs. 2,81 mj/kg;  $P = 0,01$ ). A suplementação com cultura de levedura não teve efeito sobre a temperatura retal (38,52 vs. 38,44 °C;  $P = 0,21$ ). No entanto, foi observada interação tratamento x semana da lactação ( $P = 0,05$ ). Animais com mais de 72 DEL e suplementados tiveram temperatura retal 0,2 °C menor que o controle.

Estudo recente com vacas no terço final da lactação sob condição de estresse por calor foi realizado para determinar o efeito de doses crescentes de cultura de levedura (ZHU et al., 2016). Foram utilizadas 81 vacas blocadas por paridade, produção de leite e DEL ( $206 \pm 46$ ) alocadas em três tratamentos: 0, 120 ou 240 g/d de cultura de levedura (Diamond V Original XP; Mills, Inc.) fornecidos por oito semanas. Os animais foram alojados em *tie stall*, alimentados individualmente. A dieta continha silagem de milho (20,7% MS), feno de alfafa e gramíneas (20,2% MS) e concentrados (59% MS), 16,7% de PB e 36,4% de FDN na MS. A temperatura e umidade do ar foram medidas na instalação de alojamento dos animais para cálculo do ITU. O ITU médio durante o experimento foi de  $76,6 \pm 3,69$  e variou de 68 a 86. A dose de cultura de levedura tendeu a efeito linear sobre o temperatura retal, (39,2 vs. 38,9 °C com 0 e 240 g/d de cultura de levedura;  $P = 0,07$ ). No entanto, os autores não oferecem possível explicação para esse efeito. A produção de leite respondeu à cultura de levedura com aumento linear (20,8; 21,3 e 21,5 kg/d para tratamentos 0, 120 e 240 g/d respectivamente;  $P = 0,02$ ) e não houve diferenças no CMS. Animais suplementados tiveram melhor status energético, pois ganharam peso durante o experimento, ao passo que animais no controle perderam ( $P < 0,01$ ), mas não foi sugerido possível mecanismo de ação para esse efeito.

A suplementação de vacas leiteiras durante o verão (temperatura média 33 °C) com cultura de leveduras foi capaz de aumentar a eficiência alimentar (SCHINGOETHE et al., 2004). Em experimento com vacas da raça Holandesa ( $105 \pm 28$  DEL) suplementadas com 60 g de cultura de levedura (Diamond V, Mills Inc.), a produção de leite (34,9 vs. 35,4 kg/d  $P = 0,75$ ) e de sólidos do leite não diferiu entre tratamentos. O consumo de MS também não diferiu, apesar de numericamente menor em animais consumindo cultura de levedura (22,1 vs. 23,1 kg/d). A eficiência alimentar aumentou ( $P < 0,05$ ) com o fornecimento de cultura de levedura, quando avaliada como LCE por CMS. Os autores não sugerem um modo de ação que suporte a resposta observada. Não foram tomadas medidas de digestibilidade, temperatura

corporal, parâmetros sanguíneos e metabólicos nesse estudo que poderiam permitir maior discussão dos dados.

Vacas leiteiras alojadas em câmaras climáticas foram suplementadas com cultura de levedura e enzimas fibrolíticas exógenas com o objetivo de avaliar o efeito desses aditivos sobre o desempenho de vacas sob estresse por calor em ambiente controlado (SHWARTZ et al., 2009). A hipótese era que o fornecimento dos aditivos melhoraria o aproveitamento energético da dieta e aliviaria o balanço negativo de energia imposto pelo calor. Foram alocadas 23 vacas da raça Holandesa múltiparas às dietas controle ou acrescida de 10 g/d de mistura de enzimas fibrolíticas e cultura de levedura, fornecida sobre o alimento. O experimento durou 28 dias, sendo os sete primeiros em condições termoneutras (18 °C e 20% de umidade; ITU = 64; P1) e os 21 restantes em condição de estresse (temperatura de 29,4 a 37,8 °C, 20 % de umidade; ITU > 73; P2). A temperatura retal, de superfície e frequência respiratória dos animais foram mesuradas três vezes ao dia. As vacas foram alimentadas duas vezes ao dia com dieta composta de feno de alfafa e concentrado. O balanço de energia foi calculado segundo NRC (1989). Durante P1 não houve diferença nas medidas de temperatura corporal ou frequência respiratória entre tratamentos. No período de estresse térmico a temperatura de superfície medida na cauda e na escápula tenderam a diminuir nos animais consumindo cultura de levedura às 12:00 h ( $P = 0,06$  e  $P = 0,08$ ; respectivamente). Os tratamentos também tiveram efeito sobre a temperatura retal às 12:00 h (40,29 vs. 40,02 °C;  $P < 0,03$ ) e às 18:00 h (40,35 vs. 40,12 °C;  $P < 0,05$ ). O estresse por calor reduziu o CMS em geral, comparado ao P1. No entanto, vacas do tratamento com cultura de levedura consumiram ainda menos (19,1 vs. 17,9 kg/d;  $P < 0,05$ ), mas sem diferença quando comprado consumo por peso vivo. Vacas alimentadas com cultura de levedura produziram menos leite em P1 (37,2 vs. 34,0 kg/d) e em P2 (27,1 vs. 24,3 kg/d;  $P = 0,02$ ), mas não houve diferença quando calculada a produção por peso vivo ou LCE ( $P = 0,10$ ). Os autores argumentaram que a queda de consumo induzida pelo tratamento com cultura de levedura pôde reduzir a produção de calor metabólico, o que levou a queda nas medidas de temperatura corporal. Vacas no período de estresse térmico tiveram balanço de energia negativo, mas não diferiu entre tratamentos, contrariando a hipótese de melhoria do aproveitamento energético da dieta com o aditivo.

Cultura de levedura enriquecida ou não com glicerol foi fornecida por 60 dias a vacas em início de lactação (DEL  $60 \pm 13$ ) durante o verão (ITU médio 76,8) (LIU et al., 2014). Foram utilizadas 30 vacas em lactação alojadas em *tie stall* em fazenda comercial. Os animais foram blocados por paridade e produção de leite e alocados aleatoriamente a um de três

tratamentos: sem suplementação, cultura de levedura (CY; 33,1 g/d) ou cultura de levedura acrescida de glicerol (GY; 31,6 g/d de cultura de levedura e 153,2 g/d de glicerol). Os animais foram alimentados individualmente e o alimento oferecido e as sobras foram pesadas diariamente. Amostras de leite foram obtidas das três ordenhas quinzenalmente e a temperatura retal e frequência respiratória foram mensuradas semanalmente. Amostras de sangue foram coletadas antes da alimentação matinal para mensuração do teor plasmático de glicose, N-ureico e AGNE. Nos eritrócitos foi medida a atividade de glutathione peroxidase. A expressão de genes que codificam proteínas de resistência ao choque térmico (HSP70) foi medida nas células brancas do sangue. Ambos tratamentos aumentaram a produção de leite (29,24; 30,12 e 30,35 kg/d no controle, CY e GY;  $P < 0,05$ ) e a produção de LCE ( $P < 0,05$ ). Não houve efeito de tratamento sobre o CMS. A temperatura retal no controle tendeu a ser mais elevada comparada ao CY (39,41 vs. 39,15 °C;  $P = 0,09$ ). A frequência respiratória não diferiu entre tratamentos. O tratamento GY aumentou o teor plasmático de glicose ( $P < 0,05$ ) e houve tendência de aumento no tratamento CY ( $P = 0,11$ ). Ambos tratamentos diminuíram a concentração plasmática de AGNE ( $P < 0,05$ ) e houve tendência para maior atividade de glutathione peroxidase nos eritrócitos em CY ( $P = 0,12$ ) e GY ( $P = 0,07$ ). Foi observada menor expressão de HSP70 nos tratamentos CY e GY ( $P < 0,05$ ) e os autores atribuíram esses efeitos a menor estresse por calor sofrido por animais suplementados. O alívio do estresse por calor foi relacionado à maior atividade de glutathione peroxidase, que levaria a menor estresse oxidativo.

Em experimento de dez semanas com leveduras vivas (SALVATI et al., 2015) foi obtido aumento da produção de leite e sólidos (+ 1,3 kg/d;  $P = 0,03$  e + 0,14 kg/d;  $P = 0,05$ ) em vacas sob estresse térmico (ITU médio 71,8) recebendo 10 g/dia de leveduras. Esses autores avaliaram a digestibilidade aparente no trato total da MS, MO, FDN e MO não-FDN por coleta total de fezes na última semana do experimento. Foi coletado líquido ruminal e mensurado pH, concentração de AGV e contagem de protozoários. Não foram obtidas diferenças de digestibilidade ou de parâmetros ruminais. Assim, a melhoria de desempenho de vacas sob estresse térmico suplementadas com leveduras deveu-se a outro mecanismo que não aumento de digestibilidade e mudança de pH ruminal.

### **3.5 Suplementação de leveduras e parâmetros metabólicos sanguíneos**

Há evidência de que leveduras vivas podem melhorar o status energético de vacas em lactação submetidas a estresse. Leveduras vivas tenderam a aumentar o teor plasmático de glicose quando fornecidas a vacas em terço final da lactação durante o verão (SALVATI et

al., 2015), concomitante aos aumentos de secreção de lactose diária e produção de leite. Em outro experimento foram estudados os efeitos de leveduras vivas sobre os parâmetros metabólicos sanguíneos de lactação durante o verão (DEHGHAN-BANADAKY et al. 2013). Os autores utilizaram cinquenta e seis vacas ( $145 \pm 23$  DEL) divididas em grupos de 28 e alocadas ao tratamento com leveduras (4 g/d; Probio-Sacc, Biochem) ou controle. O tratamento aumentou a concentração plasmática de glicose (66,5 vs. 76,6 mg/dL;  $P < 0,01$ ) e diminuiu o teor de N-ureico no plasma (18,75 vs. 16,67 mg/dL;  $P = 0,04$ ). Os teores de AGNE e beta-hidroxibutirato no plasma não diferiram entre tratamentos. Apesar do aumento da glicose no plasma, não houve incremento da produção de leite ou secreção de lactose, em contraste os resultados observados por Salvati et al. (2015).

A suplementação de 10 g/d de cultura de levedura a vacas após o pico de lactação tendeu a aumentar o teor plasmático de glicose (PIVA et al., 1993). Vinte e quatro vacas foram alimentadas por 6 semanas com a mesma dieta contendo silagem de milho (30% MS), feno de alfafa (22,3% MS), concentrados (47,7% MS), 17,6% de PB e 33,5% FDN na MS. As duas primeiras semanas foram para padronização e após blocados os animais receberam 0 ou 10 g/d de cultura de levedura (Thepax Dry; Dox-AI) por quatro semanas. Amostras de sangue foram coletadas antes da alimentação na veia jugular para análise do teor plasmático de glicose, N-ureico, minerais e proteínas. O teor plasmático de glicose tendeu a aumentar de 3,95 para 4,20 mmol/L no plasma ( $P = 0,18$ ) em resposta à cultura de levedura. A concentração de zinco e proteínas totais também tenderam a aumentar ( $P = 0,14$  e  $P = 0,15$ ). A composição da cultura de levedura, que tem alto teor de zinco quelatado, provavelmente causou o aumento deste mineral no sangue e tem potencial efeito benéfico à saúde dos animais.

Em estudo com cultura de levedura administrada a vacas em lactação em fazenda comercial na Califórnia foi observado redução no teor de N-ureico no plasma, concomitante ao aumento da produção de proteína no leite (BRUNO et al., 2009). No entanto, aumento no teor de N-ureico no plasma em resposta à suplementação com leveduras vivas também é descrito na literatura (ZAWORSKI et al., 2014).

### **3.6 Suplementação de leveduras e comportamento alimentar**

A motivação do gado leiteiro em selecionar alimentos ou parte de uma dieta completa depende de fatores da dieta, do manejo de alimentação e do animal. Características da dieta como inclusão de forragem, o teor de MS e tamanho de partículas estão relacionadas à

facilidade do animal em separar componentes dietéticos e promover a seleção. O aumento da frequência de alimentação reduz a seleção (MILLER-CUSHON; DEVRIES, 2017).

Uma ampla variação na quantidade de sobras (de 6% a 33% como percentual do oferecido) foi encontrada em estudo comparando a seleção de alimento em vacas alojadas em *tie stall* ou *free stall*. A quantidade de sobras foi negativamente relacionada à seleção de partículas longas (LEONARDI; ARMENTANO, 2007). O comportamento de seleção de alimento varia entre indivíduos e em um mesmo indivíduo (LEONARDI; ARMENTANO, 2003) ao longo do tempo, o que indica que a seleção de alimento pode ser motivada por fatores internos. A palatabilidade dos alimentos é preponderante na escolha pelo animal. Bovinos preferem partículas pequenas da dieta e grãos, fato relacionado a preferência por sabor adocicado. O *feedback* interno pós-ingestão também é documentado (MILLER-CUSHON; DEVRIES, 2017). Vacas adultas são capazes de modificar sua preferência alimentar de acordo com o ambiente ruminal. Vacas irão selecionar a dieta em busca de partículas mais longas em resposta a baixo pH ruminal (DEVRIES; DOHME; BEAUCHEMIN, 2008).

Vacas submetidas a desafio de acidose ruminal subclínica selecionaram a favor de partículas médias e longas da dieta e contra partículas finas (DEVRIES; DOHME; BEAUCHEMIN, 2008), diferente do padrão de preferência de vacas em lactação por partículas pequenas e grãos (MILLER-CUSHON; DEVRIES, 2017). A seleção de porções da dieta é relacionada à variação no pH ruminal. O pH ruminal não é constante ao longo do dia e depende da velocidade de fermentação da dieta e da absorção de AGV no rúmen (ASCHENBACH et al., 2011).

Leveduras vivas têm potencial para estabilizar o pH ruminal e modificar o padrão de ingestão e ruminação como efeito secundário (DEVRIES; CHEVAUX, 2014). Para testar essa hipótese, doze vacas em início de lactação ( $48,6 \pm 16,5$  DEL) foram blocadas por DEL, produção e paridade e alocadas a um de dois tratamentos (controle ou  $1 \times 10^{10}$  UFC/d de leveduras vivas; *S. cerevisiae* CNCM I-1077; Levucell SC20; Lallemand). O comportamento alimentar, ruminação e o consumo de alimento foram monitorados por sistemas eletrônicos. A temperatura ruminal foi mensurada por bolus telemétrico, como medida indireta do pH. Amostras da dieta foram coletadas diariamente para composição e caracterização quanto ao tamanho de partículas, com base na matéria natural e na MS. O CMS não diferiu entre tratamentos, apesar disso, vacas alimentadas com levedura fizeram 1,2 refeições a mais que o controle ( $P = 0,04$ ) e com menor intervalo entre refeições. O tratamento com levedura levou a rejeição de partículas longas, não observada no controle. Apesar disso, houve tendência de

aumento no teor e produção de gordura do leite e estabilização do pH ruminal pela ação da levedura, evidenciada por menor temperatura no rúmen ( $P = 0,02$ ) e menor tempo acima de  $39,0\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $P < 0,01$ ). A produção e absorção de AGV foram mais constantes e proporcionaram o retorno à alimentação mais frequente.

Levedura enzimaticamente autolisada foi administrada a vacas multíparas durante 21 dias pré-parto e 42 dias após o parto (YUAN et al., 2015a). Animais foram blocados por data esperada de parição e alocados a 0, 30, 60 ou 90 g/d de cultura de levedura e levedura enzimaticamente autolisada (YC-EHY; Celmanax, Vi-COR). Houve efeito quadrático da dose de YC-EHY sobre o número de refeições diárias, frequência e duração das refeições, e a quantidade consumida por refeição antes do parto. O comportamento alimentar após o parto não foi afetado por tratamentos ( $P > 0,10$ ), assim como o CMS ( $P = 0,73$ ). Os autores hipotetizaram que a maior frequência de refeições pôde atenuar a flutuação no pH ruminal de vacas em início de lactação, e assim melhorar adaptação a mudanças repentinas na dieta. O fornecimento de cultura de levedura após o pico de lactação preveniu a queda da gordura do leite durante desafio com aumento repentino na velocidade de degradação do amido (LONGUSKI; YING; ALLEN, 2009), o que corrobora com essa hipótese. Resultado semelhante foi obtido por Bach, Iglesias e Devant (2007), que relatam aumento no pH ruminal promovido por leveduras vivas, o que levou a maior frequência de alimentação em vacas em lactação.

A duração e o número de refeições tendeu a aumentar com suplementação de cultura de levedura ( $P = 0,09$ ), dependendo do CMS antes do experimento. Animais suplementados e com maior CMS antes do experimento voltaram a se alimentar mais frequentemente, evidenciado por menor intervalo de refeições (ALLEN, M. S.; YING, 2012). Os autores associaram a alimentação mais frequente a um possível fluxo mais lento de propionato para o fígado, dado que os animais suplementados e com maior CMS antes do experimento tiveram degradação o amido mais lenta no rúmen.

#### **4 NIACINA**

Vitaminas são moléculas orgânicas necessárias em pequenas quantidades na dieta dos animais superiores. Essas moléculas são essenciais a quase todas as formas de vida, mas os animais superiores perderam as vias bioquímicas para sua síntese. Em sua maioria, as vitaminas hidrossolúveis são componentes de coenzimas. A niacina é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B precursora da nicotinamida-adenina nucleotídeo (NAD)

(STRYER, L., 1996). O NAD participa de diversas reações de oxidação-redução nos sistemas biológicos. A niacina pode ser encontrada em duas formas mais comuns: ácido nicotínico e nicotinamida, ambas com propriedades nutricionais semelhantes e podem ser usadas para a síntese de NAD (PIRES; GRUMMER, 2007).

A niacina é usada de forma terapêutica em humanos para tratar distúrbios do metabolismo de lipídeos. Um dos efeitos indesejados do uso de ácido nicotínico em humanos é a vasodilatação cutânea. A niacina provoca a produção de prostaglandina E<sub>2</sub> e D<sub>2</sub> nas células epiteliais de Langerhans. Essas células estão envolvidas em função imunológica e do controle de fluxo sanguíneo epitelial (GILLE et al., 2008; VAJJINATH; KASHYAP, 2008).

São descritas duas vias de biossíntese de NAD por leveduras: a síntese *de novo* e a síntese pela via de “salvamento” (SPORTY et al., 2009). Na via de “salvamento” o ácido nicotínico pode ser recuperado pela célula do meio extracelular por transportador na membrana (LLORENTE; DUJON, 2000).

A síntese de ácido nicotínico por sistemas microbiológicos em aerobiose pode ter o triptofano como precursor, mas poucos procaríotos podem converter triptofano em NAD. Glicerol e ácidos dicarboxílicos são precursores de NAD no metabolismo de bactérias anaeróbicas (ORTEGA; BRONW, 1960; FOSTER; MOAT, 1980). A síntese de ácido nicotínico tendo o triptofano como precursor é bem descrita em mamíferos, leveduras e *Neospora* (CHANDLER; CHOLSON; SCOTT, 1970), mas provavelmente não ocorre em bactérias anaeróbicas.

Usando células de *Escherichia coli* como modelo de metabolismo bacteriano, foi descrito que ácidos dicarboxílicos de quatro carbonos, juntamente com piruvato, propionato ou glicerol seriam os precursores de ácido nicotínico em células procaríotas (ORTEGA; BROWN, 1960). Aminoácidos alanina, aspartato, e glutamato adicionados ao meio de cultura aumentaram a concentração de ácido nicotínico por miligrama de células bacterianas cultivadas (470, 603, 945, 683 mg de ácido nicotínico nos meios contendo glicose, alanina, aspartato e glutamato). A produção de ácido nicotínico também aumentou quando foi adicionado piruvato, oxaloacetato e malato ao meio de cultivo, na ausência dos aminoácidos. A maior produção de ácido nicotínico pelas bactérias foi obtida quando piruvato e um ácido dicarboxílico de quatro carbonos foi fornecido ao meio, seja ele malato, succinato ou fumarato. A adição de glicose ao meio não teve efeito positivo na síntese de ácido nicotínico. Ao adicionar glicerol e succinato ao meio com carbono marcado radiotivamente (C<sup>14</sup>) ficou evidente a incorporação do carbono desses precursores na vitamina. O autor considerou que a via do triptofano para síntese de ácido nicotínico parece não ocorrer em *E. coli* e em outras

bactérias. Oxigênio molecular livre é exigido em três passos enzimáticos na via de síntese a partir de triptofano, o que dificultaria essa via em bactérias anaeróbias, que produzem grande quantidade de ácido nicotínico.

Segundo o NRC (2001) a síntese ruminal de niacina é suficiente para suprir as exigências de vacas em lactação. No entanto, a exigência dessa vitamina foi calculada por extrapolação dos dados obtidos em novilhos (MILLER; MEISKE; GOODRICH, 1986) e bezerras em crescimento (ZINN; OWENS; STUART, 1987).

A niacina é a vitamina sintetizada em maior quantidade no rúmen e varia de acordo com características da dieta. A síntese de niacina variou de 446 a 1.547 mg/kg de consumo de MS, quando a dieta oferecia 30% ou 40% de carboidratos não-fibrosos na MS, respectivamente. A síntese ruminal aparente de outras vitaminas do complexo B não foi afetada da mesma forma pelo teor de forragem da dieta (SCHWAB et al., 2006).

Em estudo com seis vacas multíparas em lactação (produzindo  $35,7 \pm 1,2$  kg/d) fistuladas no rúmen foi comparada a produção de vitaminas do complexo B pela microbiota ruminal quando oferecida dieta com proporção entre forragem e concentrado de 60:40 ou 40:60 (% MS) (SANTSCHI et al., 2005). Nesse experimento, as vacas do tratamento de baixa forragem tiveram consumo restrito para equiparar ao tratamento de alta forragem. A quantidade de niacina no fluido ruminal foi mais alta nos animais alimentados com a dieta de baixa forragem ( $P = 0,04$ ). Foram mensuradas no fluido ruminal as duas formas da vitamina, o ácido nicotínico e a nicotinamida. A forma predominante da vitamina no fluido ruminal foi a nicotinamida (86% da niacina na dieta alta forragem e 87% na dieta baixa forragem). Considerando que não houve quantidade detectável de nicotinamida na dieta, os autores relataram que parte do ácido nicotínico foi transformado em nicotinamida no rúmen ou essa forma foi a predominante sintetizada pela microbiota ruminal.

A síntese de niacina no rúmen varia em função da dieta consumida pelos animais, provavelmente porque a dieta modifica a população microbiana ruminal. A síntese ruminal aparente de niacina foi negativamente correlacionada ao consumo de FDN e FDA, em experimento conduzido com quatro vacas da raça Holandesa em lactação ( $71 \pm 10$  DEL) canuladas no rúmen e duodeno (BEAUDET et al., 2016). As dietas experimentais variaram quanto ao teor de fibra: alto (48,9% FDN da MS) ou baixo (36,1% FDN da MS) e quanto ao teor de proteína: alto (14,3% PB da MS) ou baixo (11,0% PB da MS). A síntese ruminal de vitamina foi calculada pela diferença entre o consumo via dieta e o fluxo de vitamina para o duodeno. O fluxo de niacina para o duodeno tendeu ( $P = 0,10$ ) a ser maior com maior teor de N na dieta, independente do perfil de carboidratos. O rúmen aparentemente consumiu niacina,

dado que sua síntese aparente foi negativa. A degradação de niacina no rúmen tendeu a ser menor na dieta de alto N e baixo FDN. A síntese ruminal de niacina correlacionou-se negativamente com o balanço de N no rúmen ( $P < 0,01$ ) e positivamente com a eficiência de síntese microbiana, em gramas de material microbiano sintetizado por grama de MO fermentada no rúmen ( $P < 0,05$ ).

Em estudo semelhante, com vacas em lactação canuladas no rúmen e duodeno, foi testada a relação do tamanho de partículas de silagens com a síntese ruminal aparente de vitaminas do complexo B (CASTAGNINO et al., 2016). As dietas continham silagens de alfafa (46,7% MS) ou trevo (49,7% MS), que variaram no tamanho médio de partículas fino (9,7 mm) ou longo (14,7 mm). A síntese ruminal aparente de niacina foi maior na dieta contendo de silagem de trevo cortada longa ( $P < 0,01$ ). O fluxo duodenal de niacina foi negativamente correlacionado ao consumo da vitamina na dieta. É possível que exista um mecanismo regulatório da sínteses da vitamina no rúmen, aparentemente dependente da exigência dos microrganismos, da massa microbiana, de populações específicas de microrganismos e de disponibilidade de substrato. A síntese aparente de niacina no rúmen foi negativamente relacionada ao pH ruminal, à taxa de passagem da digesta, e positivamente relacionada à quantidade de FDN digerida no rúmen e à concentração ruminal de AGV.

#### **4.1 Suplementação de niacina para vacas em lactação**

O fornecimento de 6 g/d de niacina não protegida ao rúmen não alterou a produção de AGV, a utilização de N pelas bactérias e a produção de proteína microbiana. A população de protozoários, contudo, respondeu à suplementação com aumento do crescimento, provavelmente devido à incapacidade de protozoários sintetizarem niacina. As digestibilidades da MS, MO e fibra também não responderam à suplementação dessa vitamina (DOREAU; OTTOU, 1996).

A suplementação com niacina teve efeito na dissipação de calor pela superfície corporal de vacas em lactação. Vinte e seis vacas após o pico de lactação foram blocadas por produção e distribuídas a um dos tratamentos: controle ou 12, 24 ou 36 g/dia de niacina (DI COSTANZO; SPAIN; SPIERS, 1997). O tratamento com niacina foi fornecido por 17 dias consecutivos em três períodos distintos, em doses crescentes. A dieta experimental continha 18% de PB. O experimento foi conduzido no verão e as temperaturas média e máxima foram 28,5 °C e 31,4 °C respectivamente. O ITU médio e máximo foi 75 e 85,1. Foi mensurada produção diária de leite e temperaturas retal e de superfície corporal, na cauda e na garupa. O tratamento com niacina não teve efeito sobre a produção de leite ou temperatura retal. Vacas

que consumiram niacina tiveram menor temperatura de superfície corporal, tanto na cauda quanto na grupa. Vacas suplementadas com niacina perderam menos peso ( $P = 0,06$ ) e tiveram maior teor de glicose plasmática.

A niacina pode melhorar a resistência de vacas leiteiras ao calor por aumento da perda evaporativa de calor pela pele. Em trabalho com vacas em lactação em câmaras climáticas a suplementação com niacina protegida aumentou a taxa de perda de água pela pele e diminuiu as temperaturas retal e vaginal (ZIMBELMAN; BAUMGARD; COLLIER, 2010). Os animais foram mantidos em condições de estresse térmico por sete dias, no entanto o ITU não excedeu 72. Não houve diferenças de produção entre animais suplementados e controle. Os mesmos autores realizaram outro estudo com 229 vacas multíparas em lactação, suplementadas com 12 g/dia de niacina protegida ou não em fazenda comercial no Arizona (ZIMBELMAN; COLLIER; BILBY, 2013). Animais tratados tiveram temperatura vaginal mais baixa (38,53 vs. 38,38 °C;  $P < 0,01$ ) e maior produção de leite (38,88 kg/d vs. 40,72 kg/d;  $P < 0,01$ ) durante o período de maior estresse térmico.

Niacina protegida da degradação ruminal foi suplementada a vacas de alta produção em início de lactação no verão da Califórnia em fazenda comercial (WRINKLE; ROBINSON; GARRETT, 2012). Foi administrada dose de 15 g/d de niacina protegida ou controle. Foi mensurada temperatura no úbere, a frequência respiratória e o escore de respiração (*panting score*) para descrever o grau de estresse por calor sofrido pelos animais. Não houve diferença em produção de leite (48,83 kg/d) e consumo entre tratamentos. A niacina provocou queda no percentual de gordura e a secreção de energia no leite. Vacas tratadas com niacina tiveram menor frequência respiratória ( $P = 0,02$ ), menor escore de respiração ( $P < 0,01$ ) e temperatura na superfície do úbere ( $P = 0,03$ ).

#### **4.2 Niacina e o metabolismo energético**

A niacina protegida suplementada a vacas no peri-parto modificou o metabolismo de lipídeos, diminuiu o balanço energético negativo calculado, o percentual de gordura do leite e o escore linear de células somáticas (YUAN et al., 2012). Trinta vacas secas em terço final da gestação foram bloqueadas por data esperada do parto e alocadas ao tratamento controle ou suplementado com 12 g/d de niacina protegida da degradação ruminal adicionada à dieta. Foram dosados no plasma o teor de glicose, AGNE, beta-hidroxibutirato e atividade da enzima superóxido dismutase. Os animais foram avaliados por 21 dias antes do parto previsto e nos 21 primeiros dias em lactação. A concentração plasmática de AGNE foi mais baixa para

o grupo suplementado com niacina nas primeiras duas semanas pós-parto. Esse resultado foi atribuído ao efeito inibidor da lipólise da niacina.

Niacina fornecida via oral diminui a mobilização de lipídeos em vacas em início de lactação, por ação possivelmente mediada por aumento da insulina no plasma, e já foi usada como tratamento para cetose subclínica (FRONK; SCHULTZ, 1979). Vacas em transição foram suplementadas com 6 g/d de niacina adicionada à dieta por quinze dias antes do parto e 12 g/d de niacina por 28 dias após o parto, contra o grupo controle não suplementado (DUFVA et al., 1983). O fornecimento de niacina no peri-parto aumentou o teor de glicose plasmática ( $P < 0,05$ ) pré-parto e tendeu ( $P = 0,10$ ) a menor concentração plasmática de beta-hidroxiacetato e AGNE pós-parto. Em um segundo experimento relatado nesse mesmo trabalho, com vacas em início de lactação, foram testadas as doses de 3, 6 ou 12 g/d de niacina. A dose de 6 g/d de niacina aumentou a concentração plasmática de glicose ( $P < 0,05$ ). A queda do teor de AGNE no sangue foi linear com o aumento da dose de niacina ( $P < 0,05$ ). A produção de leite foi numericamente mais alta nos animais suplementados em ambos experimentos, mas sem significância estatística. O fornecimento de 12 g/d de niacina pós-parto aumentou o percentual de proteína no leite na primeira semana de lactação.

Foram utilizadas seis vacas não lactantes fistuladas no rúmen em dois experimentos para verificar o efeito antilipolítico do ácido nicotínico. Os animais foram submetidos a restrição alimentar por 48 h para promover o balanço energético negativo e a mobilização de reserva lipídica corporal (PIRES; GRUMMER, 2007). No primeiro experimento ácido nicotínico foi infundido em uma única dose no abomaso 48 h após o início da restrição alimentar. As doses de ácido nicotínico foram: 6, 30 ou 60 mg/kg de peso vivo. No tratamento controle apenas água foi infundida. A restrição alimentar foi efetiva em aumentar a concentração plasmática de AGNE, de 198  $\mu\text{Eq/L}$  no início da restrição alimentar para 546  $\mu\text{Eq/L}$  com 48 h de restrição ( $P < 0,05$ ). A infusão de ácido nicotínico foi eficaz em reduzir transitoriamente a concentração de AGNE no sangue nas três doses estudadas. No entanto, após 6 h da infusão a concentração de AGNE chegou a 1.800  $\mu\text{Eq/L}$ . As duas doses mais elevadas de niacina causaram decréscimo de AGNE por mais tempo, mas resultaram em maior aumento de AGNE 6 h após a infusão. A concentração plasmática de glicose e insulina foi mais elevada em animais tratados durante a fase de aumento de AGNE pós-infusão, evidenciando estado de resistência à insulina causado pela concentração elevada de AGNE.

Em segundo experimento, Pires e Grummer (2007) infundiram no abomaso 0, 4,9 ou 8,3 mg/h de ácido nicotínico durante 9 h, correspondente a doses de 0, 6 mg/kg/h e 10 mg/kg/h. O objetivo foi verificar se o fornecimento contínuo de ácido nicotínico poderia

manter baixa a concentração plasmática de AGNE. Ambas doses foram efetivas em manter baixa a concentração plasmática de AGNE. Apesar da redução da lipólise, não foi observado efeito dos tratamentos na concentração de glicose plasmática, provavelmente porque mesmo com a restrição alimentar, vacas não-lactantes foram capazes de manter nível plasmático normal de glicose. Os autores concluíram que o ácido nicotínico é um potente inibidor da lipólise em bovinos, mas seu efeito depende do suprimento constante para a absorção pós-ruminal. Fontes de ácido nicotínico protegidas da degradação ruminal poderiam ser usadas como estratégia para prevenir a mobilização excessiva de tecido adiposo em vacas periparturientes.

A suplementação com niacina não protegida aumentou a glicose plasmática em animais sob estresse por calor (DI COSTANZO; SPAIN; SPIERS, 1997). Diferente dos experimentos com niacina suplementar citados acima, neste estudo vacas estavam pós-pico de lactação. Nesse caso não esperava-se balanço energético negativo acentuado. A melhora no status energético induzida pela niacina foi atribuída ao alívio do estresse por calor, pois há alto gasto energético para manter a temperatura corporal nessas condições.

## REFERÊNCIAS

- AL IBRAHIM, R. M. et al. The effect of body condition score at calving and supplementation with *Saccharomyces cerevisiae* on milk production , metabolic status , and rumen fermentation of dairy cows in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 11, p. 5318–5328, 2010
- AHMAD, F.; MOAT, A. G. Nicotinic acid biosynthesis in prototrophs auxotrophs of *Saccharomyces cerevisiae* and tryptophan. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 241, n. 4, p. 775–780, 1966.
- ALLEN, M. S.; YING, Y. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on ruminal starch digestion are dependent upon dry matter intake for lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 11, p. 6591–605, 2012.
- ALLEN, J. D.; HALL, L. W.; COLLIER, R. J. Effect of core body temperature, time of day, and climate conditions on behavioral patterns of lactating dairy cows experiencing mild to moderate heat stress. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 1, p. 118–127, 2015.
- ARMSTRONG, D. V. Heat stress interaction with shade and cooling. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 7, p. 2044–2050, 1994.
- ASCHENBACH, J. R. et al. Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 10, p. 1092–1107, 2011.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**: volume 1. 15. ed. Arlington: AOAC, 1990. 1117 p.
- BACH, A.; IGLESIAS, C.; DEVANT, M. Daily rumen pH pattern of loose-housed dairy cattle as affected by feeding pattern and live yeast supplementation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 136, n. 1–2, p. 146–153, 2007.
- BANDARANAYAKA, D. D.; HOLMES, C. W. Changes in the composition of milk and rumen contents in cows exposed to a high ambient temperature whit controlled feeding. **Tropical Animal Health and Production**, v. 8, n. 1, p. 38–46, 1976.
- BAUMGARD, L. H. et al. Postabsorptive carbohydrate adaptations to heat stress and monensin supplementation in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 11, p. 5620–5633, 2011.
- BAUMGARD, L. H.; RHOADS JR, R. P. Effects of heat stress on postabsorptive metabolism and energetics. **Annual Review of Animal Bioscience**, v. 1, n. 1, p. 311–337, 2012.
- BAUMGARD, L. H.; RHOADS, R. P. Ruminant Nutrition Symposium : Ruminant production and metabolic responses to heat stress. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 1, p. 1855–1865, 2015.
- BAUMGARD, L. H.; RHOADS, R. P. The effects of heat stress on nutritional and management decisions. **Proceedings of the Western Dairy Management Conference**, v. 1, n. 1, p. 191–202, 2007.

- BEAUDET, V. et al. Effects of dietary nitrogen levels and carbohydrate sources on apparent ruminal synthesis of some B vitamins in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 4, p. 2730–2739, 2016.
- BEEDE, D. K.; COLLIER, R. J. Potential nutritional strategies for intensively managed cattle during thermal stress. **Journal of Animal Science**, v. 62, n. 2 p. 543–554, 1986.
- BERMAN, A. et al. Upper critical temperatures and forced ventilation effects for high-yielding dairy cows in a subtropical climate. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 6, p. 1488–1495, 1985.
- BERRY, I. L.; SHANKLIN, M. D.; JOHNSON, H. D. Dairy shelter design based on milk production decline as affected by temperature and humidity. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**, Bethesda, v. 7, p. 329-331, 1964.
- BITENCOURT, L. L. et al. Diet digestibility and performance of dairy cows supplemented with live yeast. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 3, p. 301–307, 2011.
- BLAZQUEZ, N. B. et al. Rate of discharge and morphology of sweat glands in the perineal, lumbodorsal and scrotal skin of cattle. **Research in Veterinary Science**, v. 57, n. 3, p. 277–284, 1994.
- BOHMANOVA, J.; MISZTAL, I.; COLE, J. B. Temperature-humidity indices as indicators of milk production losses due to heat stress. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 4, p. 1947–1956, 2007.
- BRADFORD, B. J. et al. Invited review: Inflammation during the transition to lactation: New adventures with an old flame. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 10, p. 6631–6650, 2015.
- BRUNO, R. G. S. et al. Effect of feeding *Saccharomyces cerevisiae* on performance of dairy cows during summer heat stress. **Animal Feed Science and Technology**, v. 150, n. 3, p. 175–186, 2009.
- CALLAWAY, E. S.; MARTIN, S. A. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 9, p. 2035–2044, 1997.
- CARRO, M. D.; LEBZIEN, P.; ROHR, K. Influence of yeast culture on the in vitro fermentation (Rusitec) of diets containing variable portions of concentrates. **Animal Feed Science and Technology**, v. 37, n. 3–4, p. 209–220, 1992.
- CASTAGNINO, D. S. et al. Particle length of silages affects apparent ruminal synthesis of B vitamins in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 8, p. 6229–6236, 2016.
- CHANDLER, J. L. R.; CHOLSON, R. K.; SCOTT, T. A. Studies on de novo biosynthesis of NAD in *Escherichia coli* I. Labelling patterns from precursors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subjects**, v. 222, n. 2, p. 523–526, 1970.
- CHAUCHEYRAS, F. et al. Effects of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* (Levucell SC), a microbial additive for ruminants, on lactate metabolism in vitro. **Canadian Journal of**

**Microbiology**, v. 42, n. 9, p. 927–933, 1996.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F. et al. Fate of Levucell SC I-1077 yeast additive during digestive transit in lambs. **Reproduction, Nutrition, Development**, v. 38, n. 3, p. 275–280, 1998.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F. et al. Use of yeast probiotics in ruminants: effects and mechanisms of action on rumen pH, fibre degradation, and microbiota according to the diet. In: Rigobelo, E. C. (Org.). *Probiotic in Animals*. 1. ed. 2012. p. 119–162.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; WALKER, N. D.; BACH, A. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: past, present and future. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, n. 1, p. 5–26, 2008.

CHEN, J. M.; SCHÜTZ, K. E.; TUCKER, C. B. Cooling cows efficiently with water spray : Behavioral, physiological, and production responses to sprinklers at the feed bunk. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 6, p. 4607–4618, 2016.

CHEN, X. B.; GOMES, M. J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: an overview of the technical details. In: International Feed Resources Unit, 1992, Aberdeen. **Proceedings...** Aberdeen: [s.n.], 1992. p. 1-20.

CHUNG, Y. et al. Differing effects of 2 active dried yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strains on ruminal acidosis and methane production in nonlactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2431–2439, 2011.

COLLIER, R. J. et al. Influences of environment and its modification on dairy animal health and production. **Journal of Dairy Science**, v. 65, n. 11, p. 2213–2227, 1982.

COLLIER, R. J.; ZIMBELMAN, R. B. Heat stress effects on cattle: what we know and what we don't know. **Proceedings of 22nd Southwest Nutrition and Management Conference**, p. 76–83, 2007.

CONSTABLE, P. D. Acid-base assessment when and how to apply the Henderson-Hasselbalch equation and strong ion difference theory. **Veterinary Clinics of NA: Food Animal Practice**, v. 30, n. 2, p. 295–316, 2014.

COOKE, K. M.; BERNARD, J. K.; WEST, J. W. Performance of lactating dairy cows fed whole cottonseed coated with gelatinized starch plus urea or yeast culture. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 1, p. 360–364, 2007.

DEGHAN-BANADAKY, M. et al. Effects of live yeast supplementation on mid-lactation dairy cows performances, milk composition, rumen digestion and plasma metabolites during hot season. **Journal of Applied Animal Research**, v. 41, n. 2, p. 137–142, 2013.

DEHORITY, B. A. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 48, n. 1, p. 182-185, 1984.

- DESNOYERS, M. et al. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 4, p. 1620–1632, 2009.
- DEVRIES, T. J.; DOHME, F.; BEAUCHEMIN, K. A. Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: feed sorting. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 10, p. 3958–3967, 2008.
- DEVRIES, T. J.; CHEVAUX, E. Modification of the feeding behavior of dairy cows through live yeast supplementation. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 10, p. 6499–6510, 2014.
- DI COSTANZO, A.; SPAIN, J. N.; SPIERS, D. E. Supplementation of nicotinic acid for lactating Holstein cows under heat stress conditions. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 6, p. 1200–6, 1997.
- DOREAU, M.; OTTOU, J. F. Influence of niacin supplementation on in vivo digestibility and ruminal digestion in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 12, p. 2247–2254, 1996.
- DUFVA, G. S. et al. Effect of niacin supplementation on milk production and ketosis of dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 11, p. 2329–2336, 1983.
- ELLIS, J. E.; WILLIAMS, A. G.; LLOYD, D. Oxygen consumption by ruminal microorganisms: protozoal and bacterial contributions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 10, p. 2583–2587, 1989.
- ERASMUS, L. J. et al. Influence of prepartum and postpartum supplementation of a yeast culture and monensin, or both, on ruminal fermentation and performance of multiparous dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 122, n. 3, p. 219–239, 2005.
- ERASMUS, L. J.; BOTHA, M. P.; KISTNER, A. Effect of yeast culture supplement on production, rumen fermentation, and duodenal nitrogen flow in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 1, p. 3056–3065, 1992.
- ERDMAN, R. A.; SHARMA, B. K. Effect of yeast culture and sodium bicarbonate on milk yield and composition in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 7, p. 1929–1932, 1989.
- FERNANDEZ, M. V. S. et al. Heat stress increases insulin sensitivity in pigs. **Physiological Reports**, v. 3, n. 8, p. 1–12, 2015.
- FERRARETTO, L. F.; SHAVER, R. D.; BERTICS, S. J. Effect of dietary supplementation with live-cell yeast at two dosages on lactation performance, ruminal fermentation, and total-tract nutrient digestibility in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 7, p. 4017–28, 2012.
- FINCH, V. A.; BENNETT, I. L.; HOLMES, C. R. Sweating response in cattle and its relation to rectal temperature, tolerance of sun and metabolic rate. **Journal of Agricultural Science**, v. 99, n. 3, p. 479–487, 1982.

- FOLEY, P. A. et al. Effect of DL-malic acid supplementation on feed intake, methane emissions, and performance of lactating dairy cows at pasture. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 7, p. 3258–3264, 2009.
- FOSTER, J. W.; MOAT, A. G. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Biosynthesis and Pyridine Nucleotide Cycle Metabolism in Microbial Systems. **Microbiological Reviews**, v. 44, n. 1, p. 83–105, 1980.
- FOX, D. G.; TYLUTKI, T. P. Accounting for the effects of environment on the nutrient requirements of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 11, p. 3085–3095, 1998.
- FRONK, T. J.; SCHULTZ, L. H. Oral nicotinic acid as a treatment for ketosis. **Journal of Dairy Science**, v. 62, n. 11, p. 1804–1807, 1979.
- FUQUAY, J. W. et al. Modifications in freestall housing for dairy cows during the summer. **Journal of Dairy Science**, v. 62, n. 4, p. 577–583, 1979.
- FUQUAY, J. W. Heat stress as it affects animal production. **Journal of Animal Science**, v. 52, n. 1, p. 164–174, 1981.
- GARCÍA, C. C. G. et al. Effect of a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) and monensin on ruminal fermentation and digestion in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v. 83, n. 2, p. 165–170, 2000.
- GEBREMEDHIN, K. G. et al. Sweating rates of dairy and feedlot cows under stressful thermal environments. Proceedings of the ASABE Conference, **Livestock Environment**, v. 8, n. 1, p. 745–753, 2008.
- GILLE, A. et al. Nicotinic Acid: pharmacological effects and mechanisms of action. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 79–106, 2008.
- GÓMEZ, J. A.; TEJIDO, M. L.; CARRO, M. D. Influence of disodium malate on microbial growth and fermentation in rumen simulation technique fermenters receiving medium and high concentrate diets. **British Journal of Nutrition**, v. 93, n. 4, p. 479–484, 2005.
- GOMIDE, D. R. Resposta digestiva de bovinos a doses de levedura autolisada. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)** – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- GUEDES, C. M. et al. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* yeast on ruminal fermentation and fibre degradation of maize silages in cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, n. 1, p. 27–40, 2008.
- HALES, J. R. S.; FINDLAY, J. D. The oxygen cost of thermally-induced and CO<sub>2</sub>-induced hyperventilation in the ox. **Respiration Physiology**, v. 4, n. 1, p. 353–362, 1968.
- HALL, M. B. Analysis of starch, including maltooligosaccharides, in animal feeds: A comparison of methods and a recommended method for AOAC collaborative study. **Journal of Association Official Analytical Chemistry**, Washington, v. 92, p. 42–49, 2009.

- HARRISON, G. A. et al. Influence of addition of yeast culture supplement to diets of lactating cows on ruminal fermentation and microbial populations. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 11, p. 2967–2975, 1988.
- HRISTOV, A N. et al. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on ruminal fermentation and nutrient utilization in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 2, p. 682–92, 2010.
- HUBER, J. T. et al. Heat stress interactions with protein, supplemental fat, and fungal cultures. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 30, p. 2080–2090, 1994.
- JOHNSON, K. G. Sweating rate and the electrolyte content of skin secretions of *Bos taurus* and *Bos indicus* cross-bred cows. **The Journal of Agricultural Science**, v. 75, n. 3, p. 397–402, 1970.
- KADZERE, C. T. et al. Heat stress in lactating dairy cows: a review. **Livestock Production Science**, v. 77, n. 1, p. 59–91, 2002.
- KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**, 1ª Edição, 139 p., Ed. UFSM, 2002.
- KUNG JR, L. et al. Effects of a live yeast culture and enzymes on in vitro ruminal fermentation and milk production of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 9, p. 2045–2051, 1997.
- LEE, S. S., ROBINSON, F. M.; WANG, Y. Rapid Determination of Yeast Viability. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, (11), 641–649, 1981.
- LEONARDI, C.; ARMENTANO, L. E. Effect of quantity, quality, and length of alfalfa hay on selective consumption by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 2, p. 557-564, 2003.
- LEONARDI, C.; ARMENTANO, L. E. Short communication: Feed selection by dairy cows fed individually in a tie-stall or as a group in a free-stall barn. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 5, p. 2386-2389, 2007.
- LINN, J.; RAETH-KNIGHT, M. Yeast in dairy cattle diets. **Proceedings of the 2005 Four State Dairy Nutrition and Management Conference**. p. 85-90. 2005.
- LIU, J. et al. Feeding glycerol-enriched yeast culture improves performance, energy status, and heat shock protein gene expression of lactating Holstein cows under heat stress. **Journal of Animal Science**, v. 92, n. 6, p. 2494–2502, 2014.
- LIU, Q. et al. Effects of malic acid on rumen fermentation , urinary excretion of purine derivatives and feed digestibility in steers. **Animal**, v. 3, n. 1, p. 32–39, 2009.
- LLORENTE, B.; DUJON, B. Transcriptional regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* DAL5 gene family and identification of the high affinity nicotinic acid permease TNA1 (TGR260w). **FEBS Letters**, v. 475, n. 3, p. 237–241, 2000.

- LONGUSKI, R. A.; YING, Y.; ALLEN, M. S. Yeast culture supplementation prevented milk fat depression by a short-term dietary challenge with fermentable starch. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 1, p. 160–7, 2009.
- LUND, A. Yeasts and moulds in the bovine rumen. **Journal of General Microbiology**, v. 81, n. 10, p. 453–462, 1974.
- LYNCH, H. A.; MARTIN, S. A. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture and *Saccharomyces cerevisiae* live cells on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 10, p. 2603–2608, 2002.
- MAIA, A. S. C.; DASILVA, R. G.; BATTISTON LOUREIRO, C. M. Sensible and latent heat loss from the body surface of Holstein cows in a tropical environment. **International Journal of Biometeorology**, v. 50, n. 1, p. 17–22, 2005.
- MARDEN, J. P. et al. How does live yeast differ from sodium bicarbonate to stabilize ruminal pH in high-yielding dairy cows? **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 9, p. 3528–35, 2008.
- MARTIN, S. A.; NISBET, D. J. Effect of direct-fed microbials on rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 1, p. 1736–1744, 1992.
- MCDOWELL, R. E. et al. Effect of heat stress on energy and water utilization of lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 52, n. 2, p. 188–194, 1969.
- MENDOZA, G. D.; BRITTON, R. A.; STOCK, R. A. Influence of ruminal protozoa on site and extent of starch digestion and ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 6, p. 1572–1578, 1993.
- MICHALET-DOREAU, B.; MORAND, D. Effect of yeast culture *Saccharomyces cerevisiae* SC CNCM on ruminal fermentation during adaptation to high-concentrate feeding. **Proceedings of 4<sup>th</sup> Recontres autour des Recherches sur les Ruminants**. v. 4, p. 121, Paris, 1997.
- MILLER-CUSHON, E. K.; DEVRIES, T. J. Feed sorting in dairy cattle: Causes, consequences, and management. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 1, p. 1–12, 2017.
- MILLER, B. L.; MEISKE, J. C.; GOODRICH, R. D. Effects of grain source and concentrate level on B-vitamin production and absorption in steers. **Journal of Animal Science**, v. 62, n. 2, p. 473–483, 1986.
- MILLER-WEBSTER, T. et al. Influence of yeast culture on ruminal microbial metabolism in continuous culture. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 8, p. 2009–2014, 2002.
- MISHRA, M. et al. Effect of diet and ambient temperature-humidity on ruminal pH, oxidation reduction potential, ammonia and lactic acid in lactating cows. **Journal of Animal Science**, v. 30, n. 6, p. 1023–1028, 1970.

MOALLEM, U. et al. The effects of live yeast supplementation to dairy cows during the hot season on production, feed efficiency, and digestibility. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 1, p. 343–51, 2009.

MORAN, C. A. Functional components of cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* applications for yeast glucan and mannan. In: Lyons, T. P.; Jaques, K. A. (Org.). **Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries**. Nottingham University Press, 2004. p. 504.

MOSONI, P. et al. Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2676–2685, 2007.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL et al. **Effect of environment on nutrient requirements of domestic animals**. National Academies Press, 1981.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL et al. **Nutrient requirements of dairy cattle: 2001**. National Academies Press, 2001.

NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J.; MCINTOSH, F. M. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. **British Journal of Nutrition**, v. 76, n. 2, p. 249–261, 1996.

NEWBOLD, C. J.; MCINTOSH, F. M.; WALLACE, R. J. Changes in the microbial population of a rumen-simulating fermenter in response to yeast culture. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 78, n. 2, p. 241–244, 1998.

NISBET, D. J.; MARTIN, S. A. Effect of dicarboxylic acids and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on lactate uptake by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 11, p. 3515–3518, 1990.

NISBET, D. J.; MARTIN, S. A. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* on lactate utilization by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. **Journal of Animal Science**, v. 69, n. 12, p. 4628–4633, 1991.

NOCEK, J. E.; HOLT, M. G.; OPPY, J. Effects of supplementation with yeast culture and enzymatically hydrolyzed yeast on performance of early lactation dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 8, p. 4046–4056, 2011.

O'BRIEN, M. D. et al. Metabolic adaptations to heat stress in growing cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 38, n. 1, p. 86–94, 2010.

OBA, M.; ALLEN, M. S. Effects of intraruminal infusion of sodium, potassium, and ammonium on hypophagia from propionate in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 4, p. 1398–1404, 2003.

OEZTUERK, H. Effects of live and autoclaved yeast cultures on ruminal fermentation in vitro. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 18, n. 1, p. 142–150, 2009.

- OLIVEIRA, B. M. L. et al. Suplementação de vacas leiteiras com *Saccharomyces cerevisiae* cepa KA500. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 5, p. 1174–1182, 2010.
- ORTEGA, M. V.; BROWN, G. M. Precursors of nicotinic acid in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 235, p. 2939-2945, 1960.
- OWENS, F. N.; BERGEN, W. G. Nitrogen metabolism of ruminant animals: historical perspective, current understanding and future implications. **Journal of Animal Science**, v. 57, n. 8, suppl. 2, p. 498-518, 1983.
- PLATA, F. et al. Effect of a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on neutral detergent fiber digestion in steers fed oat straw based diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 49, n. 3–4, p. 203–210, 1994.
- PEARCE, S. C. et al. Heat stress reduces intestinal barrier integrity and favors intestinal glucose transport in growing pigs. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. 1–9, 2013.
- PINLOCHE, E. et al. The effects of a probiotic yeast on the bacterial diversity and population structure in the rumen of cattle. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013.
- PIRES, J. A. A.; GRUMMER, R. R. The use of nicotinic acid to induce sustained low plasma nonesterified fatty acids in feed-restricted holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 8, p. 3725–3732, 2007.
- PIVA, G. et al. Effects of yeast on dairy cow performance, ruminal fermentation, blood components, and milk manufacturing properties. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 9, p. 2717–2722, 1993.
- POPPY, G. D. et al. A meta-analysis of the effects of feeding yeast culture produced by anaerobic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* on milk production of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 10, p. 6027–41, 2012.
- PURWANTO, B. P. et al. Diurnal patterns of heat production and heart rate under thermoneutral conditions in Holstein Friesian cows differing in milk production. **The Journal of Agricultural Science**, v. 114, n. 2, p. 139–142, 1990.
- RHOADS, M. L. et al. Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 5, p. 1986–1997, 2009.
- RHOADS, M. L. et al. Effects of heat stress and nutrition on lactating Holstein cows: II. Aspects of hepatic growth hormone responsiveness. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 1, p. 170–179, 2010.
- RUNGRUANG, S. et al. A dose-response evaluation of rumen-protected niacin in thermoneutral or heat stress lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 8, p. 1-12, 2014.

- SALVATI, G. G. S. et al. Response of lactating cows to live yeast supplementation during summer. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 6, p. 4062–73, 2015.
- SANCHEZ, W. K.; MCGUIRE, M. A.; BEEDE, D. K. Macromineral nutrition by heat stress interactions in dairy cattle: review and original research. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 7, p. 2051–2079, 1994.
- SANTSCHI, D. E. et al. Effects of the forage to concentrate ratio on B-vitamin concentrations in different ruminal fractions of dairy cows. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 85, n. 3, p. 389–400, 2005.
- SCHINGOETHE, D. J. *et al.* Feed efficiency of mid-lactation dairy cows fed yeast culture during summer. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 12, p. 4178–4181, 2004.
- SCHLEGER, A. V.; TURNER, H. G. Sweating rates of cattle in the field and their reaction to diurnal and seasonal changes. **Crop and Pasture Science**, v. 16, n. 1, p. 92-106, 1965.
- SCHNEIDER, P. L.; BEEDE, D. K.; WILCOX, C. J. Effects of supplemental potassium and sodium chloride salts on ruminal turnover rates, acid-base and mineral status of lacting dairy cows during heat stress. **Journal of Animal Science**, v. 66, n. 1, p. 126–135, 1988a.
- SCHNEIDER, P. L.; BEEDE, D. K.; WILCOX, C. J. Nycterohemeral patterns of acid-base status, mineral concentrations and digestive function of lactating cows in natural or chamber heat stress environments. **Journal of Animal Science**, v. 66, n. 6, p. 112–125, 1988b.
- SCHWAB, E. C. et al. Dietary forage and nonfiber carbohydrate contents influence B-vitamin intake, duodenal flow, and apparent ruminal synthesis in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 1, p. 174–187, 2006.
- SENAC, T.; HAHN-HAGERDAL, B. Intermediary metabolite concentrations in xylulose and Glucose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 120–126, 1990.
- SHWARTZ, G. et al. Effects of a supplemental yeast culture on heat-stressed lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 3, p. 935–942, 2009.
- SCOTT, R. et al. The presence of oxygen in rumen liquor and its effects on methanogenesis. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 55, n. 1, p. 143–149, 1983.
- SPORTY, J. et al. Quantitation of NAD<sup>+</sup> biosynthesis from the salvage pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 26, n. 7, p. 363-369, 2009.
- ST-PIERRE, N. R.; COBANOV, B.; SCHNITKEY, G. Economic losses from heat stress by US livestock industries. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 31, p. E52–E77, 2003.
- STRYER L. **Bioquímica**, 4ª Edição, 1114 p., Editora Guanabara, 1996.
- THOM, E. C. Cooling degree days. **Air Conditioning, Heating and Ventilating**, New York, v. 55, p. 65-69, 1958.

UNGERFELD, E. M.; FORSTER, R. J. A meta-analysis of malate effects on methanogenesis in ruminal batch cultures. **Animal Feed Science and Technology**, v. 166–167, n. 1, p. 282–290, 2011.

VAIJINATH, K. S.; KASHYAP, M. L. Mechanism of action of niacin. **The American Journal of Cardiology**, v. 101, n. 8, p. 20–26, 2008.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3583–3597, 1991.

VEIRA, D. M. The role of ciliate protozoa in nutrition of the ruminant. **Journal of Animal Science**, v. 63, n. 5, p. 1547–1560, 1986.

VYAS, D. et al. The effects of active dried and killed dried yeast on subacute ruminal acidosis, ruminal fermentation, and nutrient digestibility in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 92, n. 2, p. 724–732, 2014.

WALLACE, R. J.; NEWBOLD, C. J. Microbial feed additives for ruminants. In: Wallace, R. J.; Cheeson, A. (Org.). **Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding**, Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, p. 101–125, 2007.

WANG, L. et al. Yeast culture and vitamin E supplementation alleviates heat stress in dairy goats. **Asian Australasian Journal of Animal Science**, v. 29, n. 6, p. 814–822, 2016.

WARNER, A. C. I. Enumeration of rumen micro-organisms. **Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 119–128, 1962.

WEST, J. W. Nutritional strategies for managing the heat-stressed dairy cow. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 21–35, 1999.

WEST, J. Physiological effects of heat stress on production and reproduction. **Proceedings Tri-State Dairy Nutrition Conference**, Fort Wayne, p. 1–10, 2002.

WEST, J. W. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 6, p. 2131–44, 2003.

WHEELOCK, J. B. et al. Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 2, p. 644–655, 2010.

WIEDMEIER, R. D.; ARAMBEL, M. J.; WALTERS, J. L. Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. **Journal of Dairy Science**, v. 70, n. 10, p. 2063–2068, 1987.

WILDMAN, E. E. et al. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. **Journal of Dairy Science**, v. 65, n. 3, p. 495–501, 1982.

WILLIAMS, P. E. V.; TATI, G. M. I.; NEWBOLD, C. J. Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows and fermentation patterns in the rumen of steers. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 69, n. 7, p. 3016–3026, 1991.

- WOHLT, J. E.; CORCIONE, T. T.; ZAJAC, P. K. Effect of yeast on feed intake and performance of cows fed diets based on corn silage during early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 5, p. 1345–1352, 1998.
- WOHLT, J. E.; FINKELSTEIN, A. D.; CHUNG, C. H. Yeast culture to improve intake, nutrient digestibility, and performance by dairy cattle during early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 4, p. 1395–1400, 1991.
- WRINKLE, S. R.; ROBINSON, P. H.; GARRETT, J. E. Niacin delivery to the intestinal absorptive site impacts heat stress and productivity responses of high producing dairy cows during hot conditions. **Animal Feed Science and Technology**, v. 175, n. 1, p. 33-47, 2012.
- YOON, I. K.; STERN, M. D. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* cultures on ruminal fermentation in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 3, p. 411–417, 1996.
- YOUSEF, M. K. **Stress physiology in Livestock**. Boca Raton: CRC Press, 1985.
- YUAN, K. et al. Effect of rumen-protected niacin on lipid metabolism, oxidative stress, and performance of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 5, p. 2673–2679, 2012.
- YUAN, K. et al. Yeast product supplementation modulated feeding behavior and metabolism in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 1, p. 1–9, 2015(a).
- YUAN, K. et al. Yeast product supplementation modulated humoral and mucosal immunity and uterine inflammatory signals in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 1, p. 1–11, 2015(b).
- ZANELLO, G. et al. *Saccharomyces cerevisiae* modulates immune gene expressions and inhibits ETEC-mediated ERK1/2 and p38 signaling pathways in intestinal epithelial cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. 1–13, 2011.
- ZAWORSKI, E. M. et al. Effects of feeding various dosages of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 5, p. 3081–3098, 2014.
- ZHU, W. et al. Effects of supplemental levels of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on lactation performance in dairy cows under heat stress. **Asian Australasian Journal of Animal Science**, v. 29, n. 6, p. 801–806, 2016.
- ZIMBELMAN, R. A re-evaluation of the impact of temperature humidity index (THI) and black globe humidity index (BGHI) on milk production in high producing dairy cows. **Proceedings of the ...**, p. 158–169, 2009.
- ZIMBELMAN, R. B.; BAUMGARD, L. H.; COLLIER, R. J. Effects of encapsulated niacin on evaporative heat loss and body temperature in moderately heat-stressed lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 6, p. 2387–94, 2010.

ZIMBELMAN, R. B.; COLLIER, R. J.; BILBY, T. R. Effects of utilizing rumen protected niacin on core body temperature as well as milk production and composition in lactating dairy cows during heat stress. **Animal Feed Science and Technology**, v. 180, n. 1–4, p. 26–33, 2013.

ZINN, R. A. I.; OWENS, F. N.; STUART, R. L. B-vitamin supplementation of diets for feedlot calves. **Journal of Animal Science**, v. 65, n. 1, p. 267–277, 1987.

## Capítulo 2 – ARTIGO

**Artigo formatado de acordo com as normas para submissão ao periódico Journal of Dairy Science**

**Interpretative Summary: Supplementation of dead yeast culture to lactating dairy cows during hot season.** Dias et al. Yeast-based products fed to lactating dairy cows may improve digestion efficiency, milk yield, lactation performance, and are beneficial to animals subjected to heat stress. Annually American dairy industry loses more than \$ 800 million due to heat stress, and heat load can be detrimental to animal health and welfare. Yeast product contained dead and live yeast cells enhanced lactation performance and alleviated heat stress of dairy cows during summer. Our study evaluated the response of dairy cows under heat stress to dead yeast product supplementation.

Running Head: *Yeast Culture for Dairy Cows*

**Supplementation of dead yeast culture to lactating dairy cows during hot season**

**J. D. L. Dias,\* R. B. Silva,\* T. Fernandes,\* E. F. Barbosa,\* L. E. C. Graças,\* R. C.**

**Araujo,† R. A. N. Pereira,‡ M. N. Pereira\*<sup>1</sup>**

\*Department of Animal Sciences, University of Lavras, Lavras, MG 37200-000, Brazil

†GRASP Indústria e Comércio Ltda, Curitiba, PR 81200-110, Brazil

‡Minas Gerais Ag Research Enterprise, Epamig-URESM, Lavras, MG 37200-000, Brazil

<sup>1</sup>Corresponding author: Marcos Neves Pereira

Departamento de Zootecnia

Campus Universitário, C.P. 3037

Universidade Federal de Lavras, Brazil 37200-000

---

<sup>1</sup> Corresponding author: phone - +55 35 3829 1689, email – mpereira@dzo.ufla.br

## ABSTRACT

The supplementation of dairy cows with yeast-based products may increase diet digestibility, plasma niacin concentration, heat dissipation, and lactation performance. Our objective was to evaluate the response of Holstein cows in late lactation ( $234 \pm 131$  days in milk) to dead yeast culture (YC, 15 g/d, Factor SC, GRASP, *Saccharomyces cerevisiae*) during Brazilian summer (temperature-humidity index  $> 68$  for 92.2% of time). Thirty-two cows were individually fed a standard total mixed ration for 14 d and treatments Control (CTL) or YC for 35 d, in a covariate adjusted complete randomized block design. Response was evaluated in week 5 or as repeated measures over time. Cows were milked 3 x/d and treatments were orally dosed with yeast or placebo prior to each milking. Plasma niacin evaluated at d 35 of experimental period was 1.50 and 1.66  $\mu\text{g/mL}$  on CTL and YC, respectively. The YC reduced rectal temperature, respiration rate, and skin temperature, evaluated 2 x/wk at 0730, 1500, and 2200 h. The YC tended to increase the sweating rate evaluated weekly at 1500 h. The proportion of cows with rectal temperature  $\geq 39.2$  °C on CTL and YC was, respectively: 8 and 0 % at 0730 h, 52 and 25 % at 1500 h, and 35 and 26 % at 2200 h (GENMOD of SAS). Plasma glucose in weeks 3 and 5 was increased by YC. The total tract apparent digestibility of nutrients, plasma urea-N concentration, ruminal volatile fatty acids profile, urinary allantoin excretion, and ingestion, sorting, and chewing behaviors were not affected by treatment. Cows on YC rejected less feed particles  $> 19$  mm in the morning, in the afternoon were more selective against long feed particles and in favor of particles  $< 8$  mm, and sort against short particles at night. Milk yield was 30.5 kg/d for CTL and 30.2 kg/d for YC. The YC reduced dry matter intake (19.4 vs. 20.3 kg/d) and the digestible organic matter consumed (13.9 vs. 15.6 kg/d). The YC increased the milk to dry matter intake ratio (1.64 vs. 1.50), and tended to increase energy-corrected milk over digestible organic matter intake (1.98 vs. 1.81). The covariate adjusted body weight (648 kg) and body condition score (3.0) did not differ. Milk solids yield

and concentration, linear somatic cell score, and milk urea-N also did not differ. The YC increased plasma niacin concentration, body heat loss, and feed efficiency of late lactation dairy cows by reducing intake at a similar milk yield.

**Key Words:** feed efficiency, heat stress, niacin, yeast culture

## INTRODUCTION

The beneficial effects of yeast-based products on the performance of lactating dairy cows have been reported (Desnoyers et al., 2009; Poppy et al., 2012). Live (active) and dead yeast and its metabolites can improve ruminal function, inducing gain in nutrient digestibility and ruminal acidosis control (Chaucheyras-Durand et al., 2008). Both live and dead yeasts can stimulate ruminal microorganisms, but ruminal population's response may differ according to yeast viability and supplemental dose. Supplementation with live yeast has improved fibrolytic population (Pinloche et al., 2013), although dead yeast seems to enhance starch and sugar digesters (Jiang et al., 2017). Recently, it has also been shown that the supplementation of dairy cows with live and dead yeast increased the ruminal synthesis of niacin (Salvati et al., 2015), capable of having positive effects on peripheral circulation and heat increment dissipation by evaporative loss (Zimbelman et al., 2010, 2013). Yeast cell wall polysaccharides also have the potential to act positively on the immune function of dairy cows (Zaworski et al., 2014).

The selection for high milk yield has increased the sensitivity of dairy cows to heat stress, since greater yield increases digestible nutrient intake and metabolic heat production (Kadzere et al., 2002). Heat stress causes major financial loss to the global dairy industry by reducing milk yield, reproductive efficiency, and longevity of dairy cows (St. Pierre et al., 2003). Cows subjected to heat stress have reduced feed intake and are more prone to develop ruminal acidosis (Mishra et al., 1970), are more dependent on glucose as energy substrate

(Baumgard and Rhoads, 2015). Heat stress can cause immune deficiency (Bradford et al., 2015), and increased maintenance energy requirement (Fuquay, 1981) on dairy cows.

The positive effect of yeast supplementation on the performance of dairy cows subjected to heat stress has been postulated for a long time (Huber et al., 1994). Cows under heat stress seem to have greater positive response in milk yield to yeast-based products (Bruno et al, 2009; Moallem et al., 2009; Salvati et al., 2015) than would be predicted from meta-analysis of the literature on yeast supplementation (Desnoyers et al., 2009; Poppy et al., 2012). Positive effects of yeast-based products on feed efficiency of dairy cows under heat stress have been observed, driven by increased milk yield at similar intake (Moallem et al., 2009; Liu et al., 2014) or reduced intake at similar yield (Schingoethe et al., 2004). However, when dairy cows were subjected to a short-term thermal challenge in climatic chambers, the supplementation of live yeast and enzymes reduced the rectal temperature, but did not attenuate the negative effect of the excessive heat load on lactation performance, intake, and metabolic variables (Schwartz et al, 2009).

The animal response to yeast supplementation may be dependent on the type of product and its mode of action. Additives classified as dead yeast culture include the cultivation substrate used to grow the microorganism and are not dependent on presence of active yeast cells to have physiological action (Poppy et al., 2012). Yeast culture may provide growth factors for the growth of ruminal microorganisms, capable of inducing gain in nutrient digestibility, reduction in lactic acid accumulation in rumen fluid, and increased synthesis of ruminal niacin, favoring the regulation of body temperature.

We evaluated the effect of dead yeast culture supplementation on lactation performance, intake, feed efficiency, nutrient digestibility, plasma metabolites, body heat dissipation, and chewing and ingestion behavior of dairy cows subjected to heat stress during Brazilian summer.

## MATERIALS AND METHODS

### *Location, Facilities, Cows, and Experimental Design*

The experiment was conducted from November 15<sup>th</sup> to December 28<sup>th</sup>, 2015 in an open-walled, sand-bedded tie-stall barn with fans and high pressure sprinklers at the Better Nature Research Center (<http://www.holandesflamma.com.br/>), located at Ijaci, Minas Gerais, Brazil. The research center is located at 846 m height, 21° 09' 52.41" latitude south, and 44° 55' 52.40" longitude west. The protocol was approved by the University of Lavras Bioethic Committee in Utilization of Animals (protocol 051/16).

Environmental temperature and relative humidity at the center of the barn were measured every 30 min intervals with a digital thermometer (EasyLog-USB-2-LCD. Lascar Electronics, Salisbury, United Kingdom) located 2.5 m from the floor. The temperature-humidity index (**THI**) was calculated according to Yousef (1985):  $THI = T + 0.36 \times DP + 41.2$ ; where T = temperature (°C) and DP = dew point (°C).

Thirty-two Holstein cows ( $234 \pm 131$  DIM at the beginning of the experiment), 10 primiparous, were individually fed the same diet for a 2-wk standardization period and data obtained on d 11 to 14 were used as covariate in the statistical model. Cows were paired blocked based on parity and milk yield and assigned to a treatment for a 35-d comparison period, in a covariate adjusted randomized complete block design with repeated measures over time. Treatments were: Control (**CTL**) or Yeast (**YC**. Yeast culture. Factor SC, GRASP Indústria e Comércio Ltda, Curitiba, Paraná, Brazil). Paper capsules containing 5 g of the YC were orally given to each cow 3 x/d, prior to milking (15 g/cow/d). Cows on CTL received paper only.

The concentrations of viable and non-viable cells per g of product were determined. The yeast culture was rehydrated in peptone water (0.1 %) warmed to 30 °C and allowed to stand

for 10 min before the addition of the same volume of a methylene blue solution (0.01 %). Cell count was performed in a Neubauer chamber with a bright field optical microscope (400x magnification), according to the recommendations of Lee et al. (1981). Non-viable yeast cells stain with the dye. The niacin content of the sample was determined by high performance liquid chromatography in a commercial laboratory (Eurofins Alac, Garibaldi, Rio Grande do Sul, Brazil).

### ***Feed Management, Measurements, and Analytical Procedures***

The composition of the experimental diet is listed in Table 1. The same TMR within each batch was offered to all cows during the comparison period. The TMR was prepared in a stationary mixer (1.2 m<sup>3</sup>, Casalle 1200, São Carlos, São Paulo, Brazil) 2 x/d, animals had access to new feed at 0700 and 1300 h and was manually pushed at least 10 x/d. The DM concentration of the forage was monitored weekly with an electric moisture tester (Koster Crop Tester, Strongsville, OH) for adjustment of ingredients inclusion as needed. Individual cow intake was assessed daily by recording the amount of feed offered and orts (as fed basis). The feed was offered in sufficient quantity to obtain at least 10 % of the offered as daily refusals.

Samples of dietary ingredients were collected daily and composite samples made per week. Likewise, ort samples were collected daily and composited per cow per week. Composite samples were dried in forced-air oven at 55 °C for 72 h and ground through a 1-mm mesh screen (Wiley mill, Thomas Scientific, Swedesboro, NJ). The DM concentration was determined by drying at 100 °C for 24 h. The composition of the consumed diet in nutrients was calculated for each cow based on the composition of offered ingredients and orts on a DM basis. The CP concentration was determined with a micro Kjeldahl apparatus (AOAC International, 2012), ash by incineration at 550 °C for 8 h, the ash-free NDF by filtration in porous crucibles with heat stable alpha-amylase and sodium sulfite (Van Soest et

al., 1991). The ether extract (**EE**) was analyzed as in AOAC International (2012), and starch enzymatically determined according to Hall (2009). The NFC fraction was calculated:  $100 - (\text{CP} + \text{EE} + \text{ash} + \text{NDF})$ .

Cows were milked 3 x/d in an adjacent herringbone parlor starting at 0500, 1300, and 2000 h with milk yield recorded daily. Proportional milk samples from all milkings were obtained on d 11 to 14 of the standardization period and on d 6 and 7 of each week of the comparison period. Milk solids, SCC, and MUN were analyzed by mid-infrared analysis (Bentley Instruments Inc., Chaska, MN) in a commercial laboratory (Laboratory of the Paraná State Holstein Breeders Association, Curitiba, Brazil). Milk energy secretion (**milk E**; Mcal/d) was calculated as:  $[(0.0929 \times \% \text{ fat}) + (0.0547 \times \% \text{ protein}) + (0.0395 \times \% \text{ lactose})] \times \text{kg of milk}$  (NRC, 2001). The secretion of ECM (kg/d) was calculated as:  $\text{milk E}/0.70$  (assumes 0.70 Mcal/kg of milk with 3.7 % fat, 3.2 % protein, and 4.6 % lactose). The 4% FCM (kg/d) was calculated with the Gaines equation (NRC, 2001):  $0.4 \times \text{kg of milk} + 15 \times \text{kg of fat}$ . The BCS was obtained as mean of the same 3 independent evaluators (1 to 5 scale. Wildman et al., 1982) on days 13 of the standardization period and on days 8, 15, 22, 29, and 35 of the comparison period. The BW was measured after the morning milking on d 13 and 14 of the standardization period and d 6 and 7 of each week of the comparison period (mean value was used per week). The BW change was calculated by regressing each cow BW against time, and the slope of each regression was used to define BW change.

Rectal and skin temperatures and the respiration rate were measured on d 4 and 7 of each week of the comparison period starting at 0730, 1500, and 2200 h. Measurements were made randomly within block. Rectal temperature was measured with digital thermometers (G-Tech TH186 Onbo Eletronics, Shenzhen, China. Accuracy of 0.1 °C). The respiration rate (breaths/min) was the mean of 3 consecutive 30 s flank movement countings. The skin temperature of shaved areas of the shoulder and flank were measured with an infrared

thermometer (HighMed 88E, São Paulo, Brazil. Accuracy of 0.1 °C), manually pointed at 20 cm from animal's skin.

The sweating rate was evaluated once per week (d 7) at 1500 h, randomly within block. The colorimetric technique used paper discs impregnated with cobalt chloride (Schleger and Turner, 1965). Filter paper (Whatman n° 1, 11 µm porosity) was immersed in a 10 % cobalt chloride solution and then oven dried at 105 °C for 12 h. Paper discs (0.5 cm diameter) were cut and dried for 2 min. Three discs were placed on histological slides and fixed with transparent adhesive tape. The slides with disks were immediately placed in a sealed glass containing silica. A 3 x 10 cm rectangular area was shaved on the left flank of each cow, 10 cm below the lumbosacral vertebrae, 1 d before the measurement. The tape with the discs was fixed over the shaved area. The time for each disc to change color from blue violet to light pink was recorded and the mean value was used to calculate the sweating rate (g/m<sup>2</sup>/h) as:  $38,446.6/T$ , where T is time in seconds. The body surface area (m<sup>2</sup>) was:  $\text{kg BW}^{0.56} \times 0.15 \text{ m}^2/\text{kg BW}^{0.56}$  (McLean, 1963). The total stored heat was (kcal): Body temperature (°C) x Specific heat of tissue (0.80 kcal/kg/°C) x BW (kg) (Sawka and Castellani, 2007). Body temperature was:  $0.9 \times \text{Rectal temperature} + 0.1 \times \text{Skin temperature}$  (Sawka and Castellani, 2007). The evaporative heat loss (kcal/h) was:  $\text{Sweating rate (g/m}^2\text{/h)} \times \text{Body surface area (m}^2\text{)} \times 0.58 \text{ kcal/g of sweat}$  (Silanikove, 2000).

Jugular blood acid-base balance was analyzed on d 26 at 8 h after morning feeding and was analyzed with an AGS 22 blood gas analyzer (Drake Eletrônica e Comércio Ltda, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil) less than 1 h after sampling. Blood samples were collected within a 30 min period, at random within block in heparinized tubes and kept under refrigeration from sampling to analysis.

The total tract apparent digestibility of DM, OM, NDF, non-NDF OM, and starch were determined on d 27 to 29 by total collection of feces in buckets. Feces were collected

concurrent to defecation during three 8-h sampling periods and weighed. The second and third sampling periods were each delayed by 8 h, thus representing a 24-h collection. Fecal aliquots (equal fresh weight basis) were immediately frozen along the collection period and a composite sample was formed per cow. Composite fecal samples were dehydrated for 72 h at 55 °C in a forced air oven, ground through a 1-mm mesh screen (Wiley mill, Thomas Scientific, Swedesboro, NJ). The DM concentration was determined by drying at 100 °C for 24 h. Concentrations of NDF, ash, and starch were determined as described previously. The daily digestible OM intake (**DOMI**) on d 27 to 29 of experimental period was calculated.

Total urinary output was collected in buckets, simultaneously to fecal sampling, to estimate the relative ruminal microbial synthesis based on purine derivative excretion (mmol/d). A 20% sulfuric acid solution (200 mL) was added to 20 L buckets and urine was added to it during the collection period. At the end of 3-d collection period, composite urine samples were diluted 1:5 with a 4% sulfuric acid solution and frozen at -20 °C. Allantoin was analyzed according to Chen and Gomes (1992).

Blood samples were obtained from the coccygeal vessels on d 21 and 35 to determine the concentration of niacin in plasma. Blood was obtained 12 h ( $\pm$  10 min) after the morning feeding in vacutainer tubes containing EDTA and was centrifuged at 2,118 x g for 10 min to obtain plasma, which was kept at -20 °C until analysis. Plasma niacin concentration was analyzed with a VitaFast niacin microbiological assay (R-Biopharm, Dharmstadt, Germany). Blood samples were also obtained on d 34 to determine the concentration of plasma urea-N (**PUN**). Samples were obtained immediately before the first daily feeding and at 2 and 4 h ( $\pm$  10 min) after feeding. The PUN was analyzed with a laboratory kit (Urea 500, Doles Reagentes para Laboratórios, Goiânia, Brazil). Plasma glucose concentration was measured on d 21 and 35 on blood samples obtained 12 h after morning feeding with vacutainer tubes

containing EDTA and potassium fluoride. Glucose was analyzed with a laboratory kit (Glicose Enzimática Líquida, Doles Reagentes para Laboratórios, Goiânia, Brazil).

On d 35 ruminal fluid samples were collected with a flexible oro-gastric tube. Samples were obtained 10 h ( $\pm$  50 min) after the morning feeding, at random within block. Ruminal fluid pH was measured immediately (Hanna pH 21 pH/mV meter, Hanna Instruments, Woodsocket, RI). A ruminal fluid sample was frozen in liquid nitrogen to suppress fermentation and stored at  $-20$  °C until preparation for analysis of VFA by gas-liquid chromatography with a HP-FFAP capillary column (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) according to described by Ferreira et al. (2016). Another sample was mixed to a 36 % formaldehyde solution for protozoa counting. The sample for protozoa enumeration was stained and evaluated with an optical microscope in a Neubauer chamber, according to Dehority (1984) and Warner (1962).

Chewing activity and feed sorting behavior were measured on d 30 to 32, in which feed availability at 1300 h was increased to obtain daily refusals around 20 % of offered TMR to exacerbate the expression of sorting behavior (Dohme et al., 2008). Chewing activity was evaluated by visual observation of the buccal activities of each cow at 5-min intervals continuously for three consecutive 24-h periods, the mean of daily values was used per cow. Buccal activities evaluated were: feed ingestion, water ingestion, rumination, and idleness. Ingestion and rumination per unit of DMI were calculated using the intake of the day in which chewing activity was evaluated. A meal was defined by at least two consecutive 5-min ingestion events following at least 10 min of idleness or rumination (Mullins et al., 2012). Intermeal interval was calculated by time not ingesting (rumination + idleness) divided per daily number of meals minus one. The duration of the first daily meal (conditioned meal) was measured with a chronometer. Five previously trained evaluators observed the behavior of all cows after offering feed at 0700 h until the last cow finished its first meal. The proportions of

daily TMR intake between 0700 and 1300 h, 1300 and 1900 h, and 1900 and 0700 h were measured.

Feed sorting behavior was evaluated according to Leonardi and Armentano (2003). The proportion of particles above the 19 mm mesh diameter screen and above and below the 8 mm mesh screen of the Penn State Particle Separator was evaluated at 0600 and 1300 h for the offered TMR and at 1200, 1900, and 0600 h for refusals. Feed refusals at 1200 h were mixed with feed offered at 1300 h for measurement of the offered TMR particle size of each cow. The predicted intake (as-fed basis) of particles on each screen was: % TMR retained on screen x kg of TMR consumed. The observed intake of particles was: % TMR retained on screen x kg of TMR offered - % orts retained on screen x kg of orts. For the calculation of starch and NDF sorting behavior the predicted intake of a nutrient was: % of nutrient in offered TMR DM x kg of DMI. The observed intake was: % of nutrient in offered TMR DM x kg of offered TMR DM - % of nutrient in orts DM x kg of orts DM. The selection index was: 100 x (observed intake/predicted intake). Sorting values below 100% represent selective refusal, above 100% represent preferential intake, and equal to 100 % represent no selection.

### ***Statistical Analysis***

The data were analyzed as repeated measures with the Mixed procedure of SAS statistical software (Littell et al., 1998) with the model:  $Y_{ijk} = \mu + CV + B_i + Y_j + T_k + Y*T_{jk} + e_{ijk}$ . Where:  $\mu$  = overall mean, CV = covariate (measure of the same variable at the end of the standardization period),  $B_i$  = random block effect ( $i = 1$  to 16),  $Y_j$  = fixed treatment effect ( $j = \text{CTL or YC}$ ),  $T_k$  = fixed time effect ( $k = \text{days or weeks}$ ),  $Y*T_{jk}$  = interaction between treatment and time, and  $e_{ijk}$  = residual error. For variables measured only during the comparison period, the same model was used, but without the covariate adjustment. The mean square for the effect of cow nested within treatment was used as the error to test the treatment effect. The best covariance structure was defined by the Akaike's Information Criterion

among first order autoregressive, unstructured, and compound symmetry. Degrees of freedom were estimated by using the Kenward-Roger option in the model statement. The frequency of distribution of rectal temperature  $\geq 39.2$  °C was analyzed with the GENMOD procedure using logistic regression for binomial data. Statistical significance, trends, and weak trends were considered when  $P \leq 0.05$ ,  $P \leq 0.10$ , and  $P \leq 0.15$ , respectively.

## RESULTS

The THI inside the tie stall is reported in Figure 1. The mean THI during the 35-d summer period was 72.7, the proportion of time with THI  $\geq 68$  was 92.2 %, and the average daily THI minimum was 67.6. The daily THI peaked at around 1400 h and the morning raise started at 0600 h. The difference between the minimum and maximum daily THI was 12.9. Thus, the experimental environment was capable of inducing heat stress in lactating dairy cows (Kadzere et al., 2002).

The composition of the experimental diet is in Table 1. The nutrient composition of the consumed CTL and YC TMR was similar. The dosage of yeast culture was precisely force-fed to each cow 3 x/d (15 g/cow/d). The analyzed concentration of niacin in the product was 108 mg/kg, resulting in a supplementation of yeast niacin of 1.62 mg/cow/d on treatment YC. The optical microscopy evaluation of the yeast cells stained with methylene blue showed that no active cells were present (Figure 2). Dead yeast cells were countable and the concentration was  $1.9 \times 10^9$  non-viable cells of *Saccharomyces cerevisiae*/g of growth media, equivalent to  $2.85 \times 10^{10}$  yeast cells/cow/d.

Milk yield and composition, intake, and feed efficiency is in Table 2. The YC reduced DMI ( $P = 0.04$ ) and DOMI ( $P = 0.05$ ), with no effect on lactation performance ( $P \geq 0.21$ ). The milk, ECM, and 4% FCM to DMI ratios were all increased by YC ( $P \leq 0.05$ ). No difference between treatments was observed for the covariate adjusted BW ( $P = 0.18$ ), BCS

( $P = 0.81$ ), and the linear SCC score ( $P = 0.99$ ). The mean SCC equivalent was 185,000 cells/mL of milk.

Plasma niacin concentration was increased by YC (Figure 3), plausibly explaining the positive YC effect on heat dissipation (Tables 3 to 5). The YC reduced ( $P < 0.01$ ) rectal temperature at 1500 h (Table 3), the moment of the day of daily maximum THI relative to 0730 and 2200 h. The rectal temperature at 0730 h also tended ( $P = 0.09$ ) to be reduced by YC and was numerically lower ( $P = 0.17$ ) than CTL at 2200 h. The skin temperature at the shoulder and flank were reduced by YC at all times of measurement ( $P \leq 0.04$ , except for the trend in flank temperature at 0730 h,  $P = 0.07$ ). The respiration rate was reduced ( $P \leq 0.04$ ) by YC at 0730 and 1500 h and tended ( $P = 0.07$ ) to be reduced at 2200 h. The YC reduced ( $P \leq 0.05$ ) the proportion of cows showing rectal temperature  $\geq 39.2$  °C (Table 4), defined as the threshold to suggest the occurrence of heat stress (Rhoads et al., 2009). The reduction in mean daily rectal temperature in response to YC ( $P = 0.04$ ) was accompanied by a weak trend ( $P = 0.13$ ) of increased sweating rate (Table 5). The YC supplementation had no effect on the estimated evaporative heat loss ( $P = 0.21$ ) and total stored heat ( $P = 0.72$ ), numerically higher and lower on YC than CTL, respectively. There was a trend ( $P = 0.10$ ) for cows on YC to have lower  $pO_2$  in jugular blood than CTL (Table 6), probably reflecting the reduction in respiration rate (Table 3). Blood pH and the acid-base status were not affected by treatment ( $P \geq 0.18$ ).

Table 7 reports the total tract digestibility of nutrients and rumen microbial yield, estimated by the daily urinary allantoin excretion. The supplementation of YC did not increase diet digestibility ( $P \geq 0.17$ ). The daily excretion of allantoin in urine did not respond to treatment ( $P = 0.38$ ), however, there was a trend ( $P = 0.10$ ) for increased allantoin to DOMI ratio for cows supplemented with YC, suggestive of gain in the efficiency of microbial synthesis in response to YC supplementation. The similarity ( $P \geq 0.42$ ) in PUN post-morning

feeding (Table 8) and MUN (Table 3) suggests that ruminal protein deamination or N capturing in microbial protein were not affected by YC.

Rumen fermentation profile is in Table 9. The VFA proportions, pH, and protozoa concentration were similar on CTL and YC treatments ( $P \geq 0.27$ ). Based on the absence ( $P = 0.31$ ) of a treatment effect on the acetate to propionate ratio, the weak trend ( $P = 0.13$ ) for higher ECM to DOMI ratio with YC (Table 2), was not driven by increased energetic efficiency of the ruminal fermentation (less methane), but apparently by a systemic mode of action. The supplementation with YC increased ( $P = 0.01$ ) the concentration of plasma glucose at wk 3 and 5 (Figure 4).

Chewing activity and ingestion behavior were not affected ( $P \geq 0.17$ ) by YC supplementation (Table 10). Cow posture, evaluated as daily laying time (Table 10), was also similar ( $P = 0.66$ ). The alleviation of heat stress promoted by YC did not reflect in longer rumination or laying time. Cows on YC rejected less feed particles  $> 19$  mm in the morning ( $P = 0.02$ ), in the afternoon were more selective against long feed particles ( $P = 0.05$ ) and in favor of particles  $< 8$  mm ( $P = 0.03$ ), and sort against short particles at night ( $P = 0.05$ ) (Table 11). There was minor sorting in favor of starch (101) and against NDF (96), but nutrient selection indexes did not differ ( $P \geq 0.82$ ) between treatments (Table 11). Feed availability and orts according to the periods of the day and the daily mean did not vary ( $P \geq 0.18$ ). The subtle differences in particle size sorting behavior did not change the nutrient composition of the consumed diet (Table 1) or the proportion of feed orts per cow (Table 11).

## DISCUSSION

The supplementation of late lactation dairy cows with YC increased the efficiency of converting DMI into milk components by reducing DMI at similar milk and solids secretion. The conversion of DOMI into ECM also tended to be increased by YC. The meta-analysis of

Poppy et al. (2012) supports the concept that YC supplementation reduces DMI of cows in mid to late lactation (- 0.78 kg/d), in agreement with our observation (- 0.90 kg/d), the opposite to the response of early lactation cows (+ 0.62 kg/d). The similar BW and BCS between YC and CTL suggest that body tissue mobilization was not increased by the reduced DMI and DOMI on YC. Apparently, the YC supplementation increased the efficiency of energy usage for lactation and daily net energy intake was metabolic regulated among cows.

The mechanism for the higher feed efficiency on YC than CTL did not involve increased total tract diet digestibility or reduced ruminal acetate to propionate ratio in ruminal fluid (representative of less methane loss per unit of digested energy). The YC supplementation apparently increased the post-absorptive conversion of metabolizable to net energy for lactation. Body temperature regulation is an energy demanding process and it is known that cows subjected to heat stress have alterations in endocrine profile and energy metabolism with higher reliance on glucose as energy substrate for peripheral tissues (Baumgard and Rhoads, 2015).

The higher plasma niacin concentration in YC than CTL is a plausible explanation for the reduced rectal and skin temperatures and respiration rate, as observed by Salvati et al. (2015) in response to the supplementation of lactating cows with a mixture of dead and live yeast. Cows on YC had + 0.16  $\mu\text{g/mL}$  niacin in plasma than CTL, an increase of similar magnitude to the increase in plasma niacin in response to the supplementation with 12 g/d of niacin in rumen-protected form (Zimbelman et al, 2010). The vasodilatory effects of niacin (Vaijinath and Kashyap, 2008) supports the trend for increased sweating rate (Di Costanzo et al., 1997; Zimbelman et al., 2010) in response to YC supplementation. The concentration of niacin in blood decreases in cows subjected to heat stress (Rungruang et al., 2014), suggesting it is a required nutrient when the need for evaporative heat loss is increased. The sweating rate evaluated with the cobalt chloride technique was of similar magnitude to the evaporative heat

loss of cows under heat stress determined with an evapometer (Zimbelman et al., 2010). The increase in plasma glucose concentration in response to YC was probably the result of reduced glucose utilization by peripheral tissues in animals with alleviated body temperature (Baumgard and Rhoads, 2015), since increased glucose availability in response to YC would not be expected with reduced DOMI at similar ruminal fermentation profile. The reduction in rectal temperature (Bruno et al., 2009; Liu et al., 2014; Zhu et al., 2016) and the increase in plasma glucose (Liu et al., 2014) of dairy cows in response to YC supplementation have been reported. Niacin supplementation also reduced skin temperature, increased plasma glucose concentration, and reduced BW loss in early lactation dairy cows (Di Constanzo et al., 1997; Wrinkle et al., 2012). Heat stress relief and improvement in lactation performance in response to YC have been associated with reduced expression of heat shock protein genes and increased activity of glutathione peroxidase in dairy cows (Liu et al., 2014). The protective effects of YC on heat and oxidative stress and minimizing inflammatory responses are possibly mediated by niacin and a promising field of investigation. The positive response in plasma niacin concentration to dead yeast supplementation shows that the stimulus to ruminal niacin synthesis does not require the supplementation of live (active) microorganisms.

Yeast culture has soluble factors such as organic acids, vitamins, and amino acids capable of stimulating the growth of ruminal bacteria (Callaway and Martin, 1997). Malate has been proposed as an important mediator for the positive effect of dead yeast supplementation on ruminal microbial growth (Newbold et al., 1996). The synthesis of nicotinic acid in anaerobic microbial systems uses 3- and 4-carbon precursors, such as glycerol, propionate, malate, succinate, or fumarate (Foster and Moat, 1980). There was a trend for increased ratio of urinary allantoin to DOMI in response to YC, suggestive of increased efficiency of ruminal microbial synthesis, although no change was detected in the daily allantoin excretion. Increased microbial synthesis without a concomitant increase in OM

digestibility has been reported in response to YC supplementation of dairy cows (Hristov et al., 2010). Increase efficiency of microbial synthesis in the rumen was positively associated to niacin flow to the duodenum of dairy cows (Beaudet et al., 2016). The YC stimulus to the ruminal synthesis of niacin occurred without simultaneous alteration in ruminal fermentation profile, total tract nutrient digestibility, MUN, and PUN, suggesting that plasma niacin concentration may have value as a sensitive marker of rumen function.

It has been proposed that feed sorting behavior of lactating cows would respond to changes in rumen environment (DeVries et al., 2008). The supplementation of dairy cows with live yeast induced refusal of long feed particles, increased the number of meals per day, and reduced the interval between meals (DeVries and Checaux, 2014), possibly due to the stabilization of ruminal pH promoted by yeast. Allen and Ying (2012) also detected an increase in the number of meals and in meal duration in response to YC. The absence of an effect of YC on meal duration and size in our experiment is consistent with the lack of a treatment effect on rumen fermentation profile. The minor difference between treatments in feed particles sorting and the similarity in starch and NDF sorting behavior also supports this observation. The response in rumen fermentation profile to yeast supplementation is not consistent. The meta-analysis of Desnoyers et al. (2009) suggests an expected increase of + 0.03 in rumen pH of ruminants supplemented with yeast products, a trend for a reduction of - 0.8  $\mu$ M in ruminal lactate concentration, and an increase in total tract OM digestibility of + 0.8 % units, all differences of low biological magnitude. In this experiment, there was no evidence that the gain induced in feed efficiency induced by YC was driven by modulation of rumen fermentation profile or total tract nutrient digestibility.

The higher respiration rate of cows on CTL is consistent with the trend for increased  $pO_2$  of jugular blood, although acid-base balance was similar to YC. The alleviation of heat stress by YC supplementation apparently was not of sufficient magnitude to elicit differences

in saliva buffering capacity (Schneider et al., 1988), at similar rumination time. Laying time also did not respond to YC, suggesting that the reduction in body temperature was not capable of affecting cow posture.

The MUN was high (20.4 mg/dL), probably reflecting the protein nature and density of the diet (16.6 % CP in DM). Dietary starch concentration (26.7 % starch in DM) may have contributed to the high MUN by inducing some degree of ruminal acidosis and reduction in the rate of microbial synthesis in both treatments, increasing ruminal ammonia loss by lack of synchrony between protein degradation and bacterial growth. Diets were based on finely chop corn silage supplemented with highly fermentable rehydrated and ensiled corn grain, capable of inducing ruminal VFA accumulation, although stomach-tube rumen pH 10 h post-feeding was in the range of 6.5, apparently normal for TMR-fed lactating cows. Excessive ruminal starch degradation is also suggested by the high value for the total tract starch digestibility (97.8 % of intake) and by the low milk fat concentration (2.95 %), however we cannot ascertain what factors defined the high MUN and the low milk fat test in both treatments.

The supplementation with YC did not affect milk SCC. There was no evidence that YC supplementation could induce gain in non-specific immunomodulation by cell wall polysaccharides and protein (Moran, 2004) in this experiment, although a thoroughly evaluation of the immune response to YC was not performed. Yeast cell wall components may have been extensively degraded in the rumen or simply our cows did not have a high enough SCC (184,000 cells/mL) to benefit from YC supplementation.

## CONCLUSIONS

Improved thermal comfort and increased feed efficiency were observed by feeding dead yeast culture to lactating dairy cows in late lactation subjected to heat stress during Brazilian hot season. Yeast culture supplementation increased plasma niacin and glucose concentration,

reduced rectal and skin temperatures and respiration rate, and increased feed efficiency by reducing DMI at similar milk yield. Nutrient digestibility, rumen fermentation profile, BW, BCS, and chewing behavior were not responsive to the supplement.

### ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank GRASP Indústria e Comércio Ltda. for the funding support, members of Grupo do Leite from University of Lavras for their help during data collection, and Luciana Castelar Tsuda, member of Professor's Alexandre Vaz Pires team, from Department of Animal Science of Luiz Queiroz College of Agriculture of University of São Paulo for VFA analysis.

### REFERENCES

- Allen, M. S., and Y. Ying. 2012. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on ruminal starch digestion are dependent upon dry matter intake for lactating cows. *J. Dairy Sci.* 95:6591–6605.
- AOAC International. 2012. Official Methods of Analysis. 19th ed. AOAC International. Gaithersburg, MD.
- Baumgard, L. H., and R. P. Rhoads. 2015. Ruminant production and metabolic responses to heat stress. *J. Anim. Sci.* 90:1855–1865.
- Beaudet, V., R. Gervais, B. Graulet, P. Nozière, M. Doreau, A. Fanchone, and D. D. S. Castagnino. 2016. Effects of dietary nitrogen levels and carbohydrate sources on apparent ruminal synthesis of some B vitamins in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99:2730–2739.
- Bradford, B. J., K. Yuan, J. K. Farney, L. K. Mamedova, and A. J. Carpenter. 2015. Invited review: inflammation during the transition to lactation: new adventures with an old flame. *J. Dairy Sci.* 98:6631–6650.
- Bruno, R. G. S., H. M. Rutigliano, R. L. Cerri, P. H. Robinson, and J. E. P. Santos. 2009. Effect of feeding *Saccharomyces cerevisiae* on performance of dairy cows during summer heat stress. *Anim. Feed Sci. Technol.* 150:175–186.
- Callaway, E. S., and S. A. Martin. 1997. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *J. Dairy Sci.* 80:2035–2044.
- Chaucheyras-Durand, F., N. D. Walker, and A. Bach. 2008. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: past, present and future. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145:5–26.
- Chen, X. B., and M. J. Gomes. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: an overview of technical details. *Int. Feed Res. Unit, Occasional Publ.* Rowett Research Institute, Aberdeen, United Kingdom.
- Di Costanzo, A., J. N. Spain, and D. E. Spiers. 1997. Supplementation of nicotinic acid for lactating Holstein cows under heat stress conditions. *J. Dairy Sci.* 80:1200–1206.

- Dehority, B. A. 1984. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:182-185.
- Desnoyers, M., S. Giger-Reverdin, G. Bertin, C. Duvaux-Ponter, and D. Sauvant. 2009. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. *J. Dairy Sci.* 92:1620–1632.
- Devries, T. J., and E. Chevaux. 2014. Modification of the feeding behavior of dairy cows through live yeast supplementation. *J. Dairy Sci.* 97:6499–6510.
- Devries, T. J., F. Dohme, and K. A. Beauchemin. 2008. Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: feed sorting. *J. Dairy Sci.* 91:3958–3967.
- Dohme, F., T. J. Devries, and K. A. Beauchemin. 2008. Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: ruminal pH. *J. Dairy Sci.* 91:3554–3567.
- Ferreira, E. M., A. V. Pires, I. Susin, M. V. Biehl, R. S. Gentil, M. O. M. Parente, D. M. Polizel, C. V. M. R. Ribeiro, and E. Almeida. 2016. Nutrient digestibility and ruminal fatty acid metabolism in lambs supplemented with soybean oil partially replaced by fish oil blend. *Anim. Feed Sci. Technol.* 216:30–39.
- Foster, J. W., and A. G. Moat. 1980. Nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and pyridine nucleotide cycle metabolism in microbial systems. *Microbiol. Rev.* 44:83–105.
- Fuquay, J. W. 1981. Heat stress as it affects animal production. *J. Anim. Sci.* 52:164–174.
- Hall, M. B. 2009. Analysis of starch, including maltooligosaccharides in animal feeds: a comparison of methods and a recommended method for AOAC collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 92:42-49.
- Hristov, A. N., G. Varga, T. Cassidy, M. Long, K. Heyler, S. K. R. Karnati, B. Corl, C. J. Hovde, and I. Yoon. 2010. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on ruminal fermentation and nutrient utilization in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93:682–692.
- Huber, J. T., G. Higginbotham, A. Gomez-Alarcon, R. B. Taylor, K. H. Chen, S. C. Chan, and Z. Wu. 1994. Heat stress interactions with protein, supplemental fat, and fungal cultures. *J. Dairy Sci.* 77:2080–2090.
- Jiang, Y., I. M. Ogunade, S. Qi, T. J. Hackmann, C. R. Staples, and A. T. Adesogan. 2017. Effects of the dose and viability of *Saccharomyces cerevisiae*. Diversity of ruminal microbes as analyzed by Illumina MiSeq sequencing and quantitative PCR. *J. Dairy Sci.* 100:325–342.
- Kadzere, C. T., M. R. Murphy, N. Silanikove, and E. Maltz. 2002. Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Livest. Prod. Sci.* 77:59–91.
- Lee, S. S., F. M. Robinson., and Y. Wang. 1981. Rapid determination of yeast viability. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 11:641–649.
- Leonardi, C., and L. E. Armentano. 2003. Effect of quantity, quality, and length of alfalfa hay on selective consumption by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:557–564.
- Littell, R. C., P. R. Henry, and C. B. Ammerman. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.* 76:1216-1231.
- Liu, J., G. Ye, Y. Zhou, Y. Liu, L. Zhao, X. Chen, D. Huang, S. F. Liao, and K. Huang. 2014. Feeding glycerol-enriched yeast culture improves performance, energy status, and heat shock protein gene expression of lactating Holstein cows under heat stress. *J. Anim. Sci.* 92:2494–2502.
- McLean, J. A. 1963. The partition of insensible losses of body weight and heat from cattle under various climatic conditions. *J. Physiol.* 167:427–447.
- Mishra, M., F. A. Martz, R. W. Stanley, H. D. Johnson, J. R. Campbell, and E. Hilderbrand. 1970. Effect of diet and ambient temperature-humidity on ruminal pH, oxidation

- reduction potential, ammonia and lactic acid in lactating cows. *J. Anim. Sci.* 30:1023–1028.
- Moallem, U., H. Lehrer, L. Livshitz, M. Zachut, and S. Yakoby. 2009. The effects of live yeast supplementation to dairy cows during the hot season on production, feed efficiency, and digestibility. *J. Dairy Sci.* 92:343–351.
- Moran, C. A. 2004. Functional components of cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* applications for yeast glucan and mannan. Pages 283–296 in *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries*. T.P. Lyons and K.A. Jacques, ed. Nottingham University Press, Thrumpton, United Kingdom.
- Mullins, C. R., L. K. Mamedova, M. J. Brouk, C. E. Moore, H. B. Green, K. L. Perfield, J. F. Smith, J. P. Harner, and B. J. Bradford. 2012. Effects of monensin on metabolic parameters, feeding behavior, and productivity of transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:1323–1336.
- Newbold, C. J., R. J. Wallace, and F. M. McIntosh. 1996. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *Br. J. Nutr.* 76:249–261.
- NRC. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, DC.
- Pinloche, E., N. McEwan, J. P. Marden, C. Bayourthe, E. Auclair, and C. J. Newbold. 2013. The effects of a probiotic yeast on the bacterial diversity and population structure in the rumen of cattle. *PLoS ONE*. 8:1–10.
- Poppy, G. D., A. R. Rabiee, I. J. Lean, W. K. Sanchez, K. L. Dorton, and P. S. Morley. 2012. A meta-analysis of the effects of feeding yeast culture produced by anaerobic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* on milk production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:6027–6041.
- Rhoads, M. L., R. P. Rhoads, M. J. VanBaale, R. J. Collier, S. R. Sanders, W. J. Weber, B. A. Crooker, and L. H. Baumgard. 2009. Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. *J. Dairy Sci.* 92:1986–1997.
- Rungruang, S., J. L. Collier, R. P. Rhoads, L. H. Baumgard, M. J. De Veth, and R. J. Collier. 2014. A dose-response evaluation of rumen-protected niacin in thermoneutral or heat-stressed lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 97:5023–5034.
- Salvati, G. G. S., N. N. Morais Júnior, A. C. S. Melo, R. R. Vilela, F. F. Cardoso, M. Aronovich, R. A. N. Pereira, and M. N. Pereira. 2015. Response of lactating cows to live yeast supplementation during summer. *J. Dairy Sci.* 98:4062–4073.
- Sawka, M. N., and J. W. Castellani. 2007. How hot is the human body? *J. Appl. Physiol.* 103:419–420.
- Schleger, A. V., and H. G. Turner. 1965. Sweating rates of cattle in the field and their reaction. *Aust. J. Agric. Res.* 16:92–106.
- Schingoethe, D. J., K. N. Linke, K. F. Kalscheur, A. R. Hippen, D. R. Rennich, and I. Yoon. 2004. Feed efficiency of mid-lactation dairy cows fed yeast culture during summer. *J. Dairy Sci.* 87:4178–4181.
- Schneider, P. L., D. K. Beede, and C. J. Wilcox. 1988. Nycterohemeral patterns of acid-base status, mineral concentrations and digestive function of lactating cows in natural or chamber heat stress environments. *J. Anim. Sci.* 66:112–125.
- Shwartz, G., M. L. Rhoads, M. J. VanBaale, R. P. Rhoads, and L. H. Baumgard. 2009. Effects of a supplemental yeast culture on heat-stressed lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 92:935–942.
- Silanikove, N. 2000. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants domestic ruminants. *Livest. Prod. Sci.* 67:1–18.

- St. Pierre, N. R., B. Cobanov, and G. Schnitkey. 2003. Economic losses from heat stress by US livestock industries. *J. Dairy Sci.* 86:E52–E77.
- Vaijinath, K. S., and M. L. Kashyap. 2008. Mechanism of action of niacin. *Am. J. Cardiol.* 101:20–26.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.
- Warner, A. C. I. 1962. Enumeration of rumen micro-organisms. *Microbiology.* 28:119-128.
- Wildman, E. E., G. M. Jones, P. E. Wagner, R. L. Boman, H. F. Troutt, and T. N. Lesch. 1982. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *J. Dairy Sci.* 65:495-501.
- Wrinkle, S. R., P. H. Robinson, and J. E. Garrett. 2012. Niacin delivery to the intestinal absorptive site impacts heat stress and productivity responses of high producing dairy cows during hot conditions. *Anim. Feed Sci. Technol.* 175:33–47.
- Yousef, M. K. 1985. *Stress Physiology in Livestock*. 1st ed. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.
- Zaworski, E. M., N. A. Fadden, W. K. Sanchez, I. Yoon, and G. Boebe. 2014. Effects of feeding various dosages of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product in transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97:3081–3098.
- Zhu, W., B. X. Zhang, K. Y. Yao, I. Yoon, Y. H. Chung, J. K. Wang, and J. X. Liu. 2016. Effects of supplemental levels of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on lactation performance in dairy cows under heat stress. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 29:801–806.
- Zimbelman, R. B., L. H. Baumgard, and R. J. Collier. 2010. Effects of encapsulated niacin on evaporative heat loss and body temperature in moderately heat-stressed lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 93:2387–2394.
- Zimbelman, R. B., R. J. Collier, and T. R. Bilby. 2013. Effects of utilizing rumen protected niacin on core body temperature as well as milk production and composition in lactating dairy cows during heat stress. *Anim. Feed Sci. Technol.* 180:26–33.

## TABLES AND FIGURES

**Table 1.** Composition in ingredients and particle size of the offered TMR and in nutrients of the consumed TMR (% of DM) on treatments Control (CTL) and Yeast (YC)

	CTL	YC
Corn silage	39.5	
Oat hay	3.9	
Finely ground corn rehydrated and ensiled	17.6	
Soybean meal (46.3 % CP)	14.7	
Whole cottonseed	8.4	
Soypass Cargill (48.1 % CP)	3.9	
Citrus pulp	10.1	
Limestone	0.9	
Magnesium oxide	0.3	
NaCl	0.2	
Minerals and vitamins <sup>1</sup>	0.5	
CP	16.6	16.6
NDF	29.1	29.0
Forage NDF	22.8	22.9
Starch	26.7	26.6
Ash	5.4	5.4
Ether extract	5.0	5.0
NFC <sup>2</sup>	42.8	42.8
DM, % of as fed	44.8	45.0
Feed particles > 19 mm, <sup>3</sup> % as fed	7.3 ± 1.9	
Feed particles 8 - 19 mm, % of as fed	36.7 ± 1.9	
Feed particles < 8 mm, % of as fed	56.0 ± 1.8	

<sup>1</sup>210.5 g/kg Ca; 156 g/kg P; 30.4 g/kg Mg; 39.5 g/kg S; 150 mg/kg Co; 2,000 mg/kg Cu; 5,000 mg/kg Mg; 11,903 mg/kg Zn; 82 mg/kg Se; 200 mg/kg I; 1,000 KUI/kg vit A; 220 KUI/kg vit D; 6,200 UI/kg vit E.

<sup>2</sup>Nonfiber carbohydrates calculated as 100 – (CP + EE + ash + NDF).

<sup>3</sup>Orifice diameter of sieves of the Penn State Particle Separator. Mean ± SD of 30 TMR samples.

**Table 2.** Feed intake, lactation performance, MUN, feed efficiency, BW, BW change, BCS, and linear SCC on treatments Control (CTL) and Yeast (YC)

	CTL	YC	SEM	<i>P</i> -value <sup>1</sup>	
				Treat	Treat x Week <sup>2</sup>
DMI, kg/d	20.3	19.4	0.35	0.04	0.61
DOMI, <sup>3</sup> kg/d	15.6	13.9	0.64	0.05	
Milk, kg/d	30.5	30.2	0.48	0.58	0.42
ECM, kg/d	27.0	27.1	0.34	0.88	0.08
4% FCM, kg/d	25.4	25.6	0.32	0.53	0.09
Fat, %	2.94	2.96	0.036	0.62	0.15
Fat, kg/d	0.885	0.900	0.015	0.42	0.17
Protein, %	3.20	3.17	0.044	0.36	0.50
Protein, kg/d	0.963	0.949	0.008	0.42	0.20
Lactose, %	4.50	4.49	0.027	0.79	0.65
Lactose, kg/d	1.369	1.376	0.015	0.73	0.40
Solids, %	11.57	11.52	0.215	0.47	0.48
Solids, kg/d	3.492	3.503	0.040	0.83	0.11
Casein, %	2.45	2.43	0.079	0.46	0.34
Casein, kg/d	0.751	0.718	0.029	0.21	0.19
MUN, mg/dL	20.2	20.6	0.25	0.48	0.25
Milk/DMI	1.50	1.64	0.087	0.05	0.85
ECM/DMI	1.32	1.38	0.015	0.01	0.40
4% FCM/DMI	1.25	1.31	0.130	0.01	0.42
ECM/DOMI <sup>3</sup>	1.81	1.98	0.075	0.13	
BW, kg	651	646	3.3	0.18	0.39
BW gain, <sup>4</sup> kg/d	0.57	0.48	0.113	0.54	
BCS, 1 to 5	3.00	2.99	0.048	0.81	0.37
Linear SCC, <sup>5</sup> 1 to 9	3.88	3.89	0.181	0.99	0.18

<sup>1</sup> $P < 0.01$  for the effect of experimental week (1 to 5) for all variables, except for Linear SCC ( $P = 0.26$ ) and BCS ( $P = 0.07$ ).

<sup>2</sup>Interaction between treatment and week.

<sup>3</sup>Digestible OM intake and feed efficiency on week 5.

<sup>4</sup>Slope of the linear regression of BW over days 13 and 14 of standardization period and days 6, 7, 13, 14, 20, 21, 27, 28, 34, and of comparison period.

<sup>5</sup>Equivalency of the linear scores. 3.88 = 184,000 cells/mL. 3.89 = 185,000 cells/mL.

**Table 3.** Rectal and skin temperatures and respiration rate on treatments Control (CTL) and Yeast (YC)

	CTL	YC	SEM	<i>P</i> -value	
				Treat	Treat x Day <sup>1</sup>
Rectal temperature					
0730 h, °C	38.46	38.33	0.059	0.09	0.43
1500 h, °C	39.13	38.84	0.069	< 0.01	0.30
2200 h, °C	38.88	38.77	0.066	0.17	0.33
Skin temperature					
Shoulder 0730 h, °C	34.43	34.10	0.124	0.04	0.41
Shoulder 1500 h, °C	34.96	34.56	0.144	0.04	0.90
Shoulder 2200 h, °C	35.40	35.17	0.083	0.03	0.71
Flank 0730 h, °C	34.19	33.88	0.123	0.07	0.91
Flank 1500 h, °C	34.66	34.36	0.107	0.03	0.85
Flank 2200 h, °C	34.98	34.50	0.077	< 0.01	0.22
Respiration rate					
0730 h, breaths/min	55.12	51.16	1.418	0.03	0.87
1500 h, breaths/min	65.48	60.18	2.138	0.04	0.15
2200 h, breaths/min	60.77	55.73	2.325	0.07	0.83

<sup>1</sup>Rectal temperature, skin temperature, and respiration rate measured on d 4 and 7 weekly throughout the 5-week comparison period.

**Table 4.** Proportion of cows (% of total) with rectal temperature  $\geq 39.2$  °C and with at least 1, 2,  $\geq 3$  measurements of rectal temperature  $\geq 39.2$  °C at 0730, 1500, and 2200 h on treatments Control (CTL) and Yeast (YC). Data obtained on d 4 and 7 weekly throughout the 5-week comparison period

	CTL	YC	Est <sup>1</sup>	SE <sup>2</sup>	Odds ratio	95 % CI <sup>3</sup>		P-value
0730								
Total	8.0	0.1	-2.58	1.047	0.07	0.009	0.587	0.01
1	40.0	0.0	-4.66	3.215	0.01	0.000	5.151	0.14
2	26.7	12.5	-0.93	0.955	0.39	0.060	2.554	0.33
$\geq 3$	6.7	0.0	-0.07	1.462	0.93	0.053	16.393	0.96
1500								
Total	52.0	24.4	-1.21	0.246	0.29	0.183	0.482	<
1	100.0	81.3	-1.17	1.217	0.30	0.028	3.643	0.33
2	93.3	56.3	-2.38	1.151	0.09	0.009	0.877	0.03
$\geq 3$	73.3	50.0	-1.01	0.768	0.36	0.080	1.640	0.18
2200								
Total	35.3	25.6	-0.46	0.248	0.63	0.387	1.027	0.05
1	80.0	93.8	1.32	1.218	3.75	0.344	40.806	0.28
2	66.7	81.3	0.77	0.843	2.16	0.415	11.302	0.36
$\geq 3$	60.0	56.3	-0.15	0.729	0.85	0.205	3.579	0.83

<sup>1</sup>Parameter estimate generated with the GENMOD procedure of SAS using logistic regression for binomial data. Control is zero.

<sup>2</sup>Standard error of the estimate.

<sup>3</sup>Profile likelihood 95 % confidence interval for odds ratio.

**Table 5.** Body surface area, sweating rate, rectal temperature, evaporative heat loss, and total stored heat on treatments Control (CTL) and Yeast (YC)

	CTL	YC	SEM	P-value	
				Treat	Treat x Day <sup>1</sup>
Body surface area, m <sup>2</sup>	5.65	5.60	0.124	0.78	0.44
Sweating rate, <sup>2</sup> g/m <sup>2</sup> /h	92.6	103.6	5.41	0.13	0.61
Rectal temperature, <sup>3</sup> °C	38.8	38.6	0.06	0.04	0.27
Evaporative heat loss, kcal/h	303.8	338.5	23.05	0.21	0.56
Total stored heat, kcal	20.1	19.7	0.78	0.72	0.23

<sup>1</sup> $P < 0.01$  for the effect of experimental day for all variables.

<sup>2</sup>Sweating rate was measured weekly on d 7 at 1500 h.

<sup>3</sup>Mean of rectal temperature measured at 0730, 1500, and 2200 h on d 4 and 7 weekly throughout the 5-week comparison period.

**Table 6.** Jugular blood acid-base balance 8 h post-feeding on d 26 on treatments Control (CTL) and Yeast (YC)

	CTL	YC	SEM	<i>P</i> -value
pCO <sub>2</sub> , mm Hg	36.90	37.35	1.123	0.74
pO <sub>2</sub> , mm Hg	30.25	27.69	1.068	0.10
pH	7.365	7.384	0.0142	0.24
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , mmol/L	21.03	22.24	0.732	0.18
Total CO <sub>2</sub> , mmol/L	22.18	23.41	0.752	0.18
Base excess, mmol/L	-3.28	-2.11	0.873	0.25
SatO <sub>2</sub> , <sup>1</sup> %	57.21	50.73	3.656	0.17
O <sub>2</sub> ct, <sup>2</sup> %	12.83	11.35	0.707	0.15

<sup>1</sup>Oxygen saturation, % of oxygen based on total hemoglobin saturation capacity.

<sup>2</sup>Oxygen content, % of oxygen related to the total volume of dissolved gases.

**Table 7.** Total tract apparent digestibility (D) of DM, OM, NDF, starch, and non-NDF OM, urinary allantoin excretion, and Allantoin per DOMI measured on d 27 to 29 on treatments Control (CTL) and Yeast (YC)

	CTL	YC	SEM	<i>P</i> -value
D DM, % of intake	70.1	68.7	1.11	0.36
D OM, % of intake	73.7	72.3	1.03	0.30
D NDF, % of intake	49.6	47.8	0.02	0.51
D Starch, % of intake	98.1	97.5	0.36	0.17
D non-NDF OM, % of intake	84.8	83.9	0.58	0.32
Allantoin, mmol/d	260	287	26.1	0.38
Allantoin/DOMI, mmol/kg	16.9	20.9	1.99	0.10

**Table 8.** Plasma urea-N (PUN) 0, 2, and 4 h post-feeding on d 34 on treatments Control (CTL) and Yeast (YC)

	CTL	YC	SEM	<i>P</i> -value
PUN 0 h, mg/dL	14.3	14.7	0.53	0.52
PUN 2 h, mg/dL	14.7	15.4	0.56	0.42
PUN 4 h, mg/dL	16.1	16.7	0.59	0.52

**Table 9.** Molar proportion of VFA, pH, and protozoa concentration in rumen fluid on d 35 on treatments Control (CTL) and Yeast (YC)

	CTL	YC	SEM	<i>P</i> -value
Acetate, % of VFA	59.9	59.1	0.67	0.43
Propionate, % of VFA	25.2	26.1	0.79	0.43
Butyrate, % of VFA	9.9	9.5	0.21	0.27
Acetate/Propionate	2.44	2.28	0.107	0.31
Valerate	1.93	2.06	0.086	0.28
Iso-valerate	2.22	2.39	0.071	0.48
Iso-butyrate	0.83	0.81	0.027	0.53
pH	6.47	6.51	0.087	0.77
Protozoa, x 10 <sup>4</sup> /mL	5.86	4.81	0.874	0.38

**Table 10.** Chewing activity, intake pattern, and time laying down on d 30 to 32 on treatments Control (CTL) and Yeast (YC)

	CTL	YC	SEM	<i>P</i> -value
Ingestion, min/d	322	333	13.5	0.57
Rumination, min/d	461	455	17.4	0.79
Chewing, <sup>1</sup> min/d	783	779	22.2	0.88
Ingestion, min/kg DMI	14.1	15.5	0.74	0.22
Rumination, min/kg DMI	20.8	23.4	1.25	0.17
Chewing, min/kg DMI	34.4	37.1	1.87	0.27
First meal duration, min	41.9	49.8	4.43	0.18
Meals/d	10.2	10.7	0.48	0.35
Meal duration, min	32.5	32.6	1.26	0.97
Intermeal interval, min	126	120	6.6	0.42
Laying time, min/d	660	678	25.2	0.68

<sup>1</sup>Chewing = ingestion + rumination

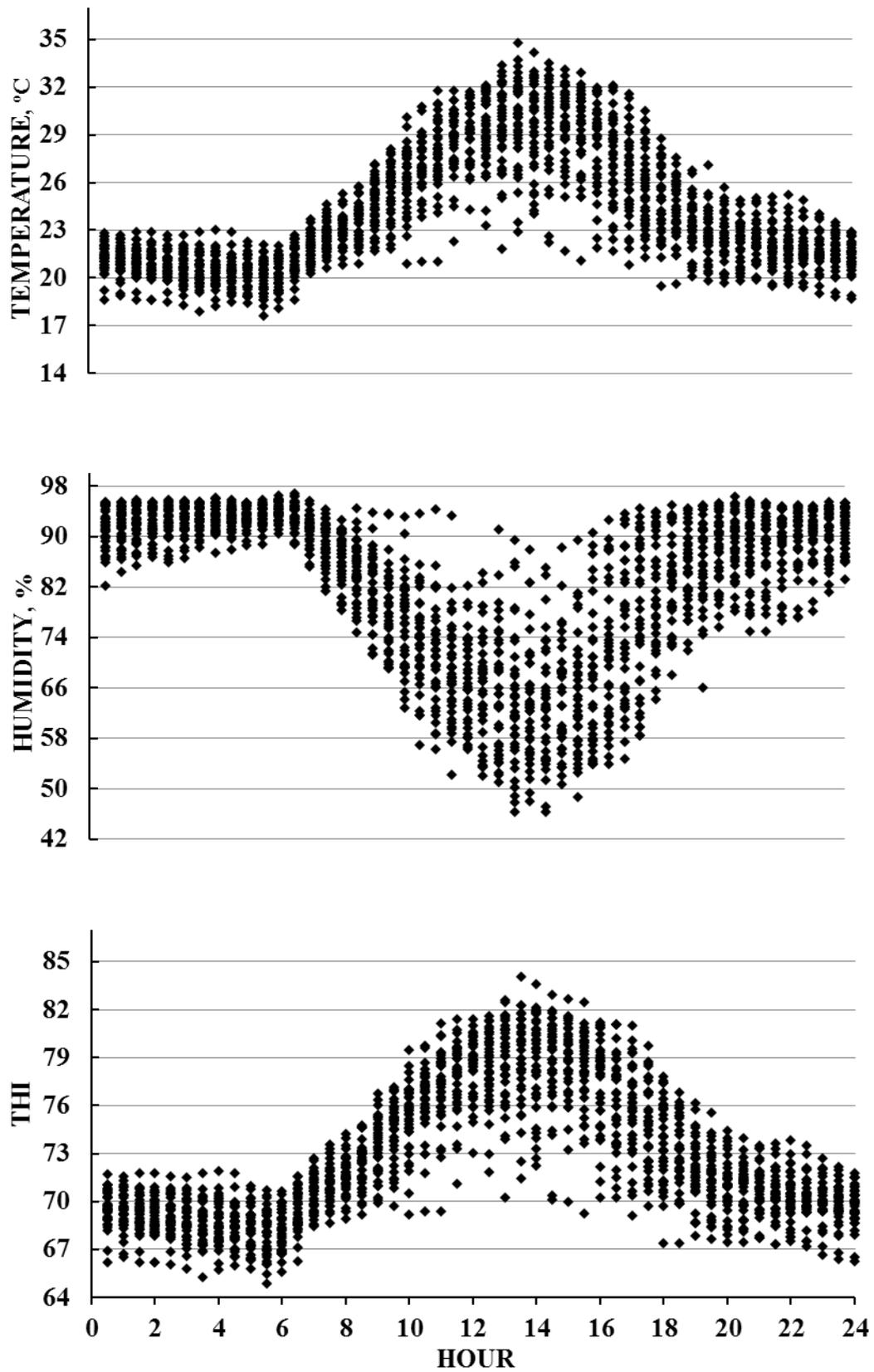
**Table 11.** Proportion of intake in periods of the day and feed sorting behavior on d 30 to 32 on treatments Control (CTL) and Yeast (YC)

	CTL	YC	SEM	<i>P</i> -value
0700 to 1300 h, % of daily intake	36.1	36.8	2.11	0.80
1300 to 1900 h, % of daily intake	41.7	43.1	2.41	0.66
1900 to 0700 h, % of daily intake	22.3	20.1	2.25	0.49
Observed/Predicted, <sup>1</sup> %				
0700 to 1300 h				
> 19 mm	71.9	97.9	7.23	0.02
8 - 19 mm	96.0	96.4	2.27	0.92
< 8 mm	105.3	105.4	1.35	0.98
1300 to 1900 h				
> 19 mm	89.0	65.6	8.05	0.05
8 - 19 mm	100.9	100.0	2.76	0.83
< 8 mm	102.6	109.9	2.29	0.03
1900 to 0700 h				
> 19 mm	121.0	117.7	10.01	0.82
8 - 19 mm	96.0	96.9	4.36	0.88
< 8 mm	101.4	91.3	3.42	0.05
Sorting of starch	101.5	101.6	0.84	0.95
Sorting of NDF	97.1	96.1	0.85	0.82
TMR and refusals (as fed basis)				
TMR 0700 h, kg	28.0	28.0		
Refusal 1300 h, kg	12.9	13.3	1.11	0.80
Refusal 0700 – 1300 h, % of offered	46.1	47.6	0.04	0.79
TMR 1300 h, <sup>2</sup> kg	39.4	36.2	1.81	0.18
Refusal 1900 h, kg	21.7	19.5	1.48	0.28
Refusal 1300 – 1900 h, % of offered	54.9	53.7	0.03	0.76
Refusal 0700 h, kg	12.3	11.6	1.19	0.70
Refusal 1900 – 0700 h, % of offered	56.7	59.3	0.04	0.69
Daily refusal, <sup>3</sup> % of offered	22.5	23.5	2.38	0.77

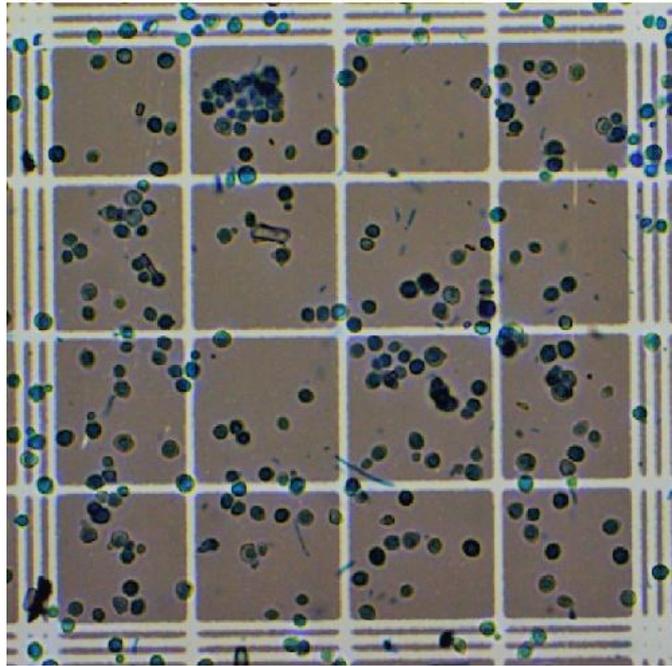
<sup>1</sup> < 100 % = rejection, > 100 % = preferential intake, 100 % = no selection.

<sup>2</sup>TMR 1300 h = Refusal 1300 h + Offered TMR 1300 h.

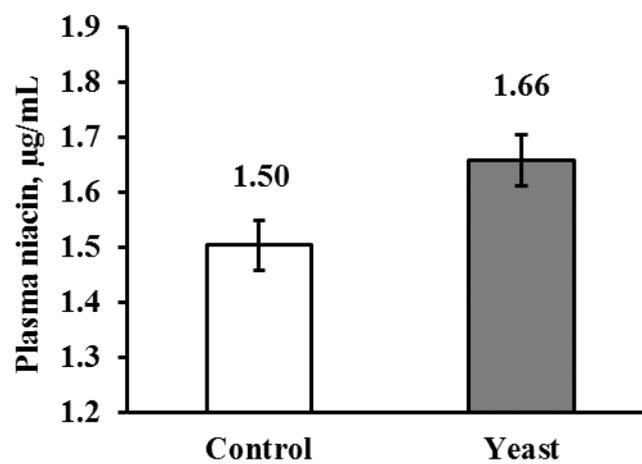
<sup>3</sup>Daily refusal = (Refusal 0700 h/Offered daily TMR) x 100.



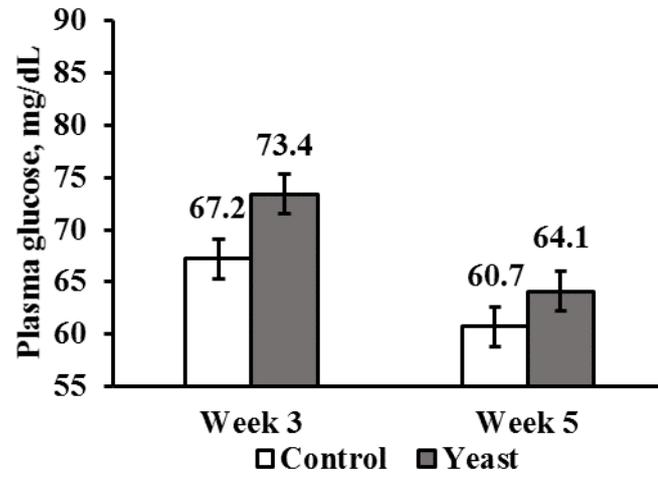
**Figure 1.** Temperature, humidity, and temperature-humidity index (THI) inside the tie stall. Temperature:  $24.1 \pm 3.7$  °C (Mean  $\pm$  SD). Humidity:  $82.4 \pm 12.3$  %. THI:  $72.7 \pm 4.1$ . THI  $\geq$  68: 92.2 % of time. THI  $\geq$  72: 44.6 % of time. Minimum daily THI:  $67.6 \pm 1.2$ . Maximum daily THI:  $80.5 \pm 1.8$ . 1680 recordings at 30-min intervals.



**Figure 2.** Yeast culture in a Neubauer chamber stained with methylene blue indicative of non-viable cells (400x magnification).



**Figure 3.** Plasma niacin concentration on d 35 at 12 h post-feeding on treatments Control and Yeast.  $P = 0.02$ .



**Figure 4.** Plasma glucose concentration on weeks 3 and 5 at 12 h post-feeding on treatments Control and Yeast.  $P = 0.01$  for the effect of treatment,  $P < 0.01$  for the effect of week, and  $P = 0.45$  for the interaction of treatment and week.