

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

Leonardo Tombesi da Rocha

**SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO MÁLICO SOBRE O DESEMPENHO,  
PARÂMETROS RUMINAIS E METABÓLITOS SANGUÍNEOS DE RUMINANTES:  
ESTUDO META-ANALÍTICO**

Santa Maria, RS  
2022

**Leonardo Tombesi da Rocha**

**SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO MÁLICO SOBRE O DESEMPENHO,  
PARÂMETROS RUMINAIS E METABÓLITOS SANGUÍNEOS DE RUMINANTES:  
ESTUDO META-ANALÍTICO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Zootecnia**.

Orientador: Prof. Dr. Julio Viégas

Santa Maria, RS  
2022

Rocha, Leonardo  
Suplementação com ácido málico sobre o desempenho,  
parâmetros ruminiais e metabólitos sanguíneos de ruminantes:  
estudo meta-analítico / Leonardo Rocha.- 2022.  
94 p.; 30 cm

Orientador: Julio Viégas  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós  
Graduação em Zootecnia, RS, 2022

1. Ácidos orgânicos 2. Produção de leite 3. Ácidos  
graxos voláteis I. Viégas, Julio II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, LEONARDO ROCHA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

**Leonardo Tombesi da Rocha**

**SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO MÁLICO SOBRE O DESEMPENHO,  
PARÂMETROS RUMINAIS E METABÓLITOS SANGUÍNEOS DE RUMINANTES:  
ESTUDO META-ANALÍTICO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Zootecnia**.

Aprovado em 29 de abril de 2022.

Documento assinado digitalmente  
 JULIO VIEGAS  
Data: 06/12/2022 17:18:47-0300  
Verifique em <https://verificador.itl.br>

---

**Julio Viégas, Dr. (UFSM)  
(Presidente/ Orientador)**

Documento assinado digitalmente  
 LUCIANA POTTER  
Data: 07/12/2022 11:01:19-0300  
Verifique em <https://verificador.itl.br>

---

**Luciana Pötter, Dra. (UFSM)  
(Videoconferência)**

Documento assinado digitalmente  
 PAULO SANTANA PACHECO  
Data: 10/12/2022 18:36:19-0300  
Verifique em <https://verificador.itl.br>

---

**Paulo Santana Pacheco, Dr. (UFSM)**

Documento assinado digitalmente  
 GILMAR ROBERTO MEINERZ  
Data: 20/12/2022 11:44:28-0300  
Verifique em <https://verificador.itl.br>

---

**Gilmar Roberto Meinerz, Dr. (UFFS)**



---

**Marcos Speroni Ceron, Dr. (UNIFENAS)  
(Videoconferência)**

Santa Maria, RS  
2022

## RESUMO

### SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO MÁLICO SOBRE O DESEMPENHO, PARÂMETROS RUMINAIS E METABÓLITOS SANGUÍNEOS DE RUMINANTES: ESTUDO META-ANALÍTICO

AUTOR: Leonardo Tombesi da Rocha

ORIENTADOR: Julio Viégas

A tese teve como objetivo determinar, através de meta-análise, os efeitos da suplementação com ácido málico sobre o desempenho, parâmetros ruminais, metabólitos sanguíneos e digestibilidade de frações da dieta de ruminantes. Apenas estudos que apresentarem resultados para um grupo controle vs. ácido málico/malato foram considerados. O efeito da adição do ácido orgânico foi avaliado através do método do tamanho de efeito. A análise de meta-regressão foi utilizada para encontrar covariáveis capazes de explicar a heterogeneidade observada nos resultados. No primeiro artigo, o objetivo foi avaliar o efeito do ácido orgânico sobre a produção e composição do leite de vacas holandesas. A suplementação com malato não afetou a ingestão de matéria seca, gordura e proteína no leite. Entretanto, foi observado aumento na produção de leite nos animais do grupo suplementado com malato. A meta-regressão indicou que covariáveis relacionadas a ingestão de concentrado interferem na magnitude do efeito relacionado à suplementação. No segundo artigo, o objetivo foi determinar o efeito da suplementação com malato no desempenho, características de carcaça, balanço de nitrogênio e parâmetros ruminais de cordeiros. A suplementação aumentou o ganho médio diário e reduziu a conversão alimentar de cordeiros, sendo esse efeito reduzido em função de elevadas doses de malato. O malato não afetou a digestibilidade da dieta, a meta-regressão indicou que a ingestão de amido como um fator interferente. Ainda, o uso de malato aumentou a produção de ácidos graxos voláteis totais (AGV) e foi capaz de elevar o pH ruminal de cordeiros. No terceiro artigo, o objetivo foi determinar os efeitos da suplementação com ácido málico/malato sobre parâmetros ruminais, sanguíneos e sobre a digestibilidade de frações da dieta de bovinos. A suplementação com malato/ácido málico aumentou o pH ruminal e também a concentração propionato e ácidos graxos voláteis totais. Além disso, aumentou a digestibilidade da matéria seca, fibra em detergente neutro e proteína, além de aumentar a glicose e diminuir o nível de ácidos graxos não esterificados (AGNE) no sangue sanguíneo. As covariáveis relacionadas a dieta foram importantes para explicar a heterogeneidade dos resultados relacionados a fermentação ruminal, mas não para a variabilidade associada a digestibilidade e parâmetros sanguíneos. Em conclusão, a suplementação com ácido málico é capaz de aumentar o pH e AGVs no rúmen dos ruminantes. A presença de tais efeitos é reforçada pelo melhor desempenho dos animais. Houve efeito do ácido orgânico sobre a digestibilidade total aparente das principais frações da dieta de bovinos, mas não para ovinos. Além disso, a suplementação implicou em aumento da glicose e diminuição de AGNE no sangue. A elevada heterogeneidade dos resultados pode ser explicada, em parte, por fatores associados as dietas fornecidas aos animais.

**Palavras-chave:** Ácidos orgânicos. Malato. Produção de leite. Propionato

## ABSTRACT

### SUPPLEMENTATION WITH MALIC ACID ON PERFORMANCE, RUMINAL PARAMETERS AND BLOOD METABOLITES OF RUMINANTS: META-ANALYTICAL STUDY

AUTHOR: Leonardo Tombesi da Rocha

ADVISER: Julio Viégas

The thesis aimed to determine, through meta-analysis, the effects of malic acid supplementation on performance, ruminal parameters, blood metabolites and diet digestibility on ruminants. Only studies that present results for a control group vs. malic acid/malate were considered. The effect of organic acid addition was evaluated using the effect size method. Meta-regression analysis was used to find covariates capable of explaining the heterogeneity observed in the results. In the first paper, the objective was to evaluate the effect of the organic acid on milk production and composition of Holstein cows. Malate supplementation did not affect the dry matter intake, milk fat and protein. However, an increase in milk production was observed in the animals in the malate-supplemented group. The meta-regression indicated that covariates related to concentrate intake interfere in the magnitude of the effect related to supplementation. In the second paper, the objective was to determine the effect of malate supplementation on performance, carcass traits, nitrogen balance and ruminal parameters of lambs. Supplementation increased the average daily gain and reduced the feed conversion rate of lambs; the effect was reduced due to high doses of malate. Malate did not affect diet digestibility, meta-regression indicated starch intake as an interfering factor. Furthermore, the use of malate increased the production of total volatile fatty acids (VFA) and was able to raise the lambs ruminal pH. In the third paper, the objective was to determine the effects of malic acid/malate supplementation on ruminal parameters, blood metabolites and diet digestibility on cattle. Supplementation with malate/malic acid increased rumen pH and also the concentration of propionate and VFA. In addition, it increased the digestibility of dry matter, neutral detergent fiber and protein, in addition to increasing glucose and decreasing the level of non-esterified fatty acids (NEFA) in blood. Diet-related covariates were important to explain the heterogeneity in the results related to rumen fermentation, but not for the variability associated with digestibility and blood parameters. In conclusion, malic acid supplementation is able to increase pH and VFAs in the rumen of ruminants. The presence of such effects is reinforced by the better performance of the animals. There was an effect of organic acid on the apparent total digestibility of the main diet fractions for cattle, but not for sheep. In addition, supplementation resulted in an increase in glucose and a decrease in blood NEFA. The high heterogeneity of the results can be explained, in part, by factors associated with the diets provided to the animals.

**Keywords:** Malate. Milk production. Organic acids. Propionate

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>10</b>
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	10
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	10
<b>3.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>11</b>
3.1.	ORIGEM E FONTES DE ÁCIDOS MÁLICO .....	11
3.2.	UTILIZAÇÃO DE MALATO EM EXPERIMENTOS IN VITRO.....	12
3.3.	UTILIZAÇÃO DE MALATO EXPERIMENTOS IN VIVO .....	13
3.4.	ÁCIDOS ORGANICOS: RESULTADOS CONTROVERSOS .....	15
<b>4.</b>	<b>ARTIGO 1 META-ANÁLISE E META-REGRESSÃO DO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO MÁLICO E MALATO NA PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE DE VACAS HOLANDESAS EM LACTAÇÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>5.</b>	<b>ARTIGO 2 META-ANÁLISE E META-REGRESSÃO DO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO MÁLICO E SEUS SAIS SOBRE O DESEMPENHO, CARACTERÍSTICAS DE CARÇAÇA, BALANÇO DE NITROGÊNIO E PARÂMETROS RUMINAIS DE CORDEIROS .....</b>	<b>41</b>
<b>6.</b>	<b>ARTIGO 3 META-ANÁLISE E META-REGRESSÃO DO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO MÁLICO OU MALATO SOBRE PARÂMETROS RUMINAIS, DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES E PARÂMETROS SANGUÍNEOS DE BOVINOS.....</b>	<b>60</b>
<b>7.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>87</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>89</b>
	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>90</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O maior objetivo de manipular a fermentação ruminal é elevar a eficiência de fermentação, seja através da maximização dos processos que produzem metabólitos nutricionalmente úteis ao animal, ou pela minimização de processos que resultem em perdas energéticas ou que sejam prejudiciais ao meio ambiente (CARRO; UNGERFELD, 2015). Em meio as ferramentas capazes de alterar o ambiente ruminal estão os aditivos alimentares, que são definidos como ingredientes capazes de produzir resposta favorável, podendo ou não conter nutrientes, contribuindo para um melhor desempenho e saúde animal.

Dentre os aditivos comumente utilizados estão os antibióticos ionóforos, comprovadamente capazes de melhorar a saúde e performance animal e reduzir emissões de metano (GUAN et al. 2006). No entanto, o aumento da preocupação do público consumidor com o uso de antibióticos na alimentação animal, devido ao possível desenvolvimento de super resistência bacteriana, resultou na proibição do uso destes aditivos em diversos países. Desta forma, a comunidade científica e a indústria de alimentos têm procurado ativamente alternativas aos antibióticos promotores de crescimento.

O uso dos ácidos orgânicos como aditivos na nutrição de ruminantes pode levar a benefícios semelhantes aos encontrados com a utilização dos ionóforos e antibióticos promotores de crescimento (ASANUMA et al., 1999). Os ácidos orgânicos são constituintes naturais de diversos alimentos, e contém uma ou mais carboxilas (COOH) em sua molécula, por isso, são denominados ácidos carboxílicos (WANG et al., 2009). Além disso, ocorrem no trato digestivo dos bovinos como parte do metabolismo intermediário dos carboidratos (KOZLOSKI, 2011).

São considerados aditivos seguros por não produzirem resíduos nos produtos de origem animal, sendo ácido málico o principal ácido orgânico ministrado em dietas para ruminantes embora outras moléculas como fumarato, aspartato, ácido succínico e pirúvico apresentem potencial. Na nutrição de ruminantes, o maior interesse do emprego dos ácidos orgânicos é o controle da produção de ácido láctico, por meio do estímulo à população de *Selenomonas ruminantium*, que atua positivamente no consumo do lactato, transformando-o em propionato.

Liu et al (2009), observaram diminuição linear do lactato no rúmen em função da suplementação com ácido málico. A maior captação de lactato implica em aumento no pH ruminal, conforme indicado pelos estudos de Khampa et al (2006a), Khampa (2006b) e Martin et al (1999) que observaram aumento linear no pH em função de diferentes doses de suplementação. O efeito do malato sobre a produção de propionato foi confirmado no estudo

de Malekhhahi et al (2015), ao suplementarem cordeiros com 4g/dia de malato. Concomitantemente, utilizando suplementação de malato de 80g/vaca/dia, Malekhhahi et al (2016) observaram aumento na produção de propionato em vacas leiteiras durante o período de transição.

Entretanto, os resultados dos testes realizados com animais não são homogêneos. A presença ou ausência de um determinado efeito geralmente é atribuída pelos autores a interações com a dieta fornecida. Especula-se que a ingestão de frações como amido ou aquelas relacionadas a fibra possa levar a resultados conflitantes. Assim, a utilização de meta-análise, ferramenta estatística que permite sumarizar resultados de diversos experimentos em uma única estimativa de efeito, pode possibilitar a determinação do real efeito destes AO sobre as variáveis de interesse. Além disso pode determinar, através de análises de sensibilidade como a utilização de subgrupos e meta-regressão, o efeito de covariáveis sobre o resultado meta-analisado.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Determinar, através de meta-análise, os efeitos da suplementação com ácido málico sobre o desempenho, parâmetros ruminais, metabólitos sanguíneos e sobre a digestibilidade de frações da dieta de ruminantes.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar o efeito da suplementação sobre o pH e produção de ácidos graxos voláteis em bovinos e ovinos.

Avaliar a influencia do ácido orgânico sobre variáveis de desempenho em bovinos e ovinos.

Verificar o efeito da suplementação sobre a digestibilidade de frações da dieta de ruminantes.

Determinar o efeito do ácido málico sobre metabólitos sanguíneos de bovinos e ovinos

Estimar a heterogeneidade existente entre os resultados dos estudos

Buscar covariáveis que sirvam para explicar a variabilidade observada entre os resultados dos estudos

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. ORIGEM E FONTES DE ÁCIDOS MÁLICO

Ácidos orgânicos (AO) ou dicarboxílicos são componentes naturais e presentes na maioria dos organismos. A maior parte dos estudos que utilizam ácidos orgânicos como aditivos nutricionais concentram-se na suplementação com ácido málico ou malato, que é a forma de sal do composto. Malato é um ácido orgânico comum encontrado em tecidos vegetais e desempenha papéis centrais no metabolismo das plantas, como na fotossíntese, na manutenção do pH interno, equilíbrio iônico, e o transporte e troca de equivalentes redutores entre compartimentos celulares.

Além disso, esse AO é um intermediário chave no ciclo do ácido cítrico e no ciclo succinato/propionato e, desta forma, participam do processo natural de produção de ácidos graxos voláteis (AGVs) durante a fermentação ruminal (MARTIN, 1999). São considerados drenos ativos de hidrogênio, pois os microrganismos utilizadores destes ácidos, competem com as bactérias metanogênicas pelo H<sub>2</sub>, o que pode refletir na redução da produção de metano e, paralelamente, aumento na produção de AGVs (ASANUMA et al., 1999; LÓPEZ et al., 1999).

Em concentrados baseados em cevada, milho e farelo de soja, a participação do ácido málico representa menos de 0,3% da matéria seca (CARRO et al, 2006; MUNGÓI et al. 2012). Já as pastagens possuem níveis razoáveis destes componentes podendo representar até 10% da matéria seca. De acordo com Callaway et al (1997), o malato pode representar 2,2 a 4,5% da matéria seca de gramíneas e de 2,9 a 7,5% nas leguminosas, sendo essa quantidade dependente do estágio de maturação da forragem. Em forragens maduras, como a palha de cevada o malato representa, em média, 1,2% da matéria seca (CARRO et al, 2006; MUNGÓI et al. 2012). Desta forma, mesmo que o malato não seja suplementado diretamente, forragens podem se tornar veículos para a incorporação de ácidos orgânicos em dietas para ruminantes.

A utilização de malato em dietas para ruminantes surge como uma alternativa ao uso dos ionóforos. Os ionóforos, comprovadamente melhoram a saúde e performance animal, além de reduzir emissões de metano (GUAN et al. 2006). No entanto, o aumento da preocupação do público consumidor com o uso de antibióticos na alimentação animal resultou na proibição do uso destes aditivos em diversos países. Gonzalez-Momita et al (2009) comparando malato com 2 tipos de ionóforos (monensina e lasalocida), concluiu que o malato pode servir como alternativa aos antibióticos para evitar queda no pH ruminal.

### 3.2. UTILIZAÇÃO DE MALATO EM EXPERIMENTOS IN VITRO

Experimentos realizados in vitro indicam que o malato e o ácido málico são capazes de alterar a fermentação ruminal, aumentando a proporção molar de propionato. Este ácido orgânico estimula a absorção e conversão de ácido láctico em ácido propiônico por bactérias *Selenomonas ruminantium* (Carro et al., 1999; López et al., 1999; Carro e Ranilla, 2003; Ok et al 2012). Ainda, através de um segundo mecanismo, estas bactérias podem metabolizar o próprio ácido orgânico até succinato ou propionato (Nisbet e Martin, 1990). Além do ácido propiônico, aumento na concentração de acetato, butirato e, conseqüentemente, ácidos graxos voláteis totais (AGV) também podem ocorrer (Carro e Ranilla, 2003; Ok et al 2012). Entretanto, o efeito sobre outros AGVs, que não o propionato, é bastante variável e possui maior dependência do substrato utilizado para incubação (Gómez et al., 2005)

Concomitantemente a diminuição da presença de lactato, é esperado aumento no pH do fluido ruminal. Martin e Streeter (1995), observaram que a adição de malato diminuiu a presença de lactato em até 8%, resultando em um aumento significativo no pH do fluido. O efeito sobre o pH está intimamente associado com a *S. ruminantium*, responsável pela captação do lactato, cujo crescimento é fortemente influenciado pela presença de malato. Ainda, de acordo com Martin et al (1999), o CO<sub>2</sub> produzido pela bactéria durante a fermentação do lactato a propionato na via succinato-propionato também exerce influência sobre o pH. A literatura sobre o efeito do ácido málico sobre o pH é bem menos expressiva que a do malato, em muitos artigos onde a forma ácida é utilizada a discussão se baseia nos resultados obtidos com o sal. Entretanto, resultados obtidos por Ok et al (2013) indicam que o ácido málico pode não ter efeito sobre essa variável.

Além do efeito sobre o pH e AGV, espera-se que esse ácido orgânico também exerça influência sobre a digestibilidade das frações da dieta. Utilizando malato, Carro et al (1999) observaram aumento no desaparecimento da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO) e fibra em detergente neutro (FDN). O desaparecimento de MO também foi maior no estudo de Garcia-Martinez et al (2003), que utilizou 8mM/L de malato associado a dietas com alta forragem e concentrado. Em um estudo utilizando ácido málico, Sniffen et al (2006) observaram aumento linear no desaparecimento da fibra em detergente ácido (FDA) e FDN, embora não tenham detectado efeito sobre a digestibilidade da MO, MS e proteína bruta (PB). A utilização de ácido málico também não influenciou o desaparecimento de MS no estudo de Ok et al (2013). De

acordo com Gómez et al (2005), os efeitos do ácido orgânico sobre essas variáveis são mais pronunciados quando são utilizadas dietas com maior quantidade de concentrado.

### 3.3. UTILIZAÇÃO DE MALATO EXPERIMENTOS IN VIVO

Apesar da captação de lactato pela *S ruminantium* ser o ponto inicial de praticamente todos os mecanismos que envolvem a suplementação com ácido málico ou malato, essa variável é pouco explorada nos estudos, principalmente quando o efeito foi avaliado em ovinos. Apenas o Carro et al (2005), analisou o efeito do malato sobre a captação de lactato no rúmen, obtendo resposta não significativa ao fornecer o ácido orgânico para cordeiros alimentados com dietas de alto grão. Em bovinos, Liu et al (2009), observaram diminuição linear do lactato no rúmen em função da suplementação com ácido málico. Essa resposta vai de encontro aos resultados de Martin et al (1999), Carrasco et al (2012), Vyas et al (2015) e Malekkhahi et al (2015) que não observaram efeito do ácido orgânico sobre a presença de lactato no rúmen.

O efeito da suplementação com malato sobre o pH já foi confirmado pelos estudos de Khampa et al (2006a), Khampa (2006b) e Martin et al (1999) que observaram aumento linear no pH em função de diferentes doses de suplementação. Carrasco et al. (2012) não observaram efeito da suplementação sobre o pH no rúmen de novilhas independentemente da forma de suplementação (sal ou ácido). Ausência de efeito também foi o resultado dos estudos de Kung et al (1982), Devant et al. (2006), Foley et al. (2009), Liu et al (2009), Malekkhahi et al. (2015) Vyas et al (2015). Apesar da ausência de efeito, de acordo com Vyas et al (2015) a utilização de ácido málico pode evitar quedas abruptas no pH de novilhas alimentadas com dieta de alto grão.

O fornecimento de concentrado altamente fermentável implica na proliferação de bactérias como a *Streptococcus bovis*, responsáveis pela produção de lactato no rúmen. Quando presente em quantidades elevadas, o lactato pode levar a redução no pH ruminal e, consequentemente, favorecer a ocorrência de acidose ruminal (MALEKKHAHI et al. 2015). No rúmen, as bactérias *Selenomonas ruminantium* são capazes de utilizar o lactato como fonte de carbono com a condição de que haja presença de precursores do oxaloacetato, como o malato. Este ácido pode seguir o ciclo reverso da via succinato-propionato e fornecer o oxaloacetato necessário para que haja gliconeogênese a partir do ácido láctico (CARRO; UNGERFELD, 2015). A fermentação de lactato no rúmen tem como resíduos finais também os ácidos graxos voláteis, principalmente o ácido propiônico (KOZLOSKI, 2011).

O efeito do malato sobre a produção de propionato foi confirmado no estudo de Malekhhahi et al (2015), ao suplementarem cordeiros com 4g/dia de malato. Entretanto, Carro et al (2005) e Toprak et al (2019) não observaram efeito desse ácido orgânico sobre o propionato. Adicionalmente, no estudo de Gonzalez-Momita et al (2009), houve apenas tendência estatística de aumento dessa variável. Utilizando suplementação de malato de 80g/vaca/dia, Malekhhahi et al (2016) observaram aumento na produção de propionato em vacas leiteiras durante o período de transição. Os mesmos autores, utilizando vacas em acidose subclínica, não observaram efeitos benéficos da adição de malato sobre a produção de propionato. Khampa et al. (2006), Sniffen et al. (2006) e Kung et al. (1972) também não observaram efeitos reais da adição de malato sobre a produção propionato em bovinos.

O ácido propiônico é um dos principais precursores da lactose. A quantidade total de lactose sintetizada no úbere está intimamente associada com a quantidade de leite que é produzida/vaca/dia. Conforme já comprovado pelos estudos de Malekhhahi et al. (2016) e Liu et al. (2009) os ácidos orgânicos, principalmente o malato, possuem a característica de aumentar a produção de propionato a partir do aumento da utilização do lactato presente no rúmen. Desta forma, é possível especular que estes ácidos sejam capazes de aumentar a produção de leite de vacas em lactação. Entretanto, as respostas da edição de ácido málico sobre a produção de leite não são consistentes. Sniffen et al. (2006), encontraram respostas significativas na produção de leite de vacas holandesas, com os resultados indo de 36,8 para 38,3 litros/dia para os tratamentos controle, ou com 50g de malato dissódico por animal/dia, respectivamente. Wang et al. (2009), utilizando 3 níveis de inclusão de malato (70, 140 e 210 g/vaca/dia), relataram aumento na produção de leite e de gordura durante os primeiros 63 dias de lactação. Entretanto, Devant et al. (2007) não detectaram mudanças na produção, ao utilizar suplementação de 84 g/vaca/dia. Kung et al. (1982), observaram que a suplementação com 140 g/vaca/dia não aumentou a produção de leite, mas foi capaz de aumentar a persistência da lactação.

Em experimentos com cordeiros, Flores (2003) observou que a suplementação com malato aumentou o ganho de peso, a conversão alimentar, a digestibilidade aparente da dieta e o pH ruminal, além de redução no consumo de matéria seca. Entretanto, Mungói et al (2012), concluíram que a suplementação com malato não afeta o consumo de matéria seca, além de ter diminuído a digestibilidade aparente da matéria seca e matéria orgânica de dietas para cordeiros. De acordo com Elmali et al (2012), a utilização de ácido málico em doses de 3 ou 6g/kg não tem efeito sobre o desempenho, parâmetros ruminais ou digestibilidade da dieta em cordeiros. Estes resultados vão ao encontro dos obtidos por Loya-Olguin et al (2019), embora os autores tenham observado maior área de olho de lombo nos animais suplementados com ácido málico.

Os efeitos da suplementação com ácido málico sobre parâmetros sanguíneos também é um assunto abordado em muitos trabalhos. No estudo de Wang et al (2009), a utilização do ácido orgânico aumentou a glicose além de diminuir a presença de ácidos graxos não esterificados (AGNE) no sangue de vacas em início de lactação. Tais alterações nessas variáveis podem indicar maior absorção de propionato no rúmen, além de menor catabolismo de reservas corporais. Esses resultados vão ao encontro daqueles obtidos por El-Zaiat et al (2019), cuja suplementação com 30g/dia de ácido málico resultou em maior glicose circulante e menor AGNE em vacas leiteiras. Entretanto, Hernandez et al (2011) e Carrasco et al (2012), não observaram efeito sobre essas variáveis, resultado que independe da forma química utilizada para suplementação.

#### 3.4. ÁCIDOS ORGÂNICOS: RESULTADOS CONTROVERSOS

Frente a todos os pontos apresentados, fica claro que a adição de malato ou ácido málico na dieta de ruminantes gera resultados bastante controversos. É comum nos artigos discussões sobre os fatores que levaram a ausência de um efeito específico. De acordo com Wang et al. (2009), esses fatores são, geralmente, relacionados com a dieta fornecida aos animais. Dentre os principais fatores listados pelos autores estão: volumoso utilizado (gramínea ou leguminosa), maturidade da pastagem, forma de fornecimento do volumoso (feno, pastejo, silagem, entre outros), a quantia de carboidrato prontamente fermentável, a porção da proteína que é degradável no rúmen, e a relação volumoso concentrado; além disso a forma de química com que ácido orgânico é suplementado (ácido málico ou na forma de sal) também deve ser considerada. Nas tabelas 1 e 2, estão compiladas informações sobre a forma de suplementação, características do volumoso e concentrado, além da composição calculada das dietas dos experimentos utilizando o ácido orgânico em ovinos e bovinos, respectivamente.

De acordo com Callaway et al. (1997), o malato pode representar 2,2 a 4,5% da matéria seca de gramíneas e de 2,9 a 7,5% nas leguminosas, sendo essa quantidade decrescente conforme a idade da planta avança. Além disso, forragens conservadas como fenos e silagens apresentam menor conteúdo deste componente. Assim, dependendo do tipo e forma do volumoso escolhido, é possível que a suplementação com malato esteja ocorrendo próxima ou acima do limite em que seu efeito atinja o platô, já que a concentração de malato na dieta basal estaria alta.

A quantia de carboidrato, a proteína degradável no rúmen, e a relação volumoso concentrado são fatores que interferem também no efeito dos ácidos orgânicos, uma vez que a

síntese de proteína microbiana no rúmen é dependente da disponibilidade de carboidratos e nitrogênio (N) para os microrganismos (KOZLOSKI, 2011). Dentre estes microrganismos, estão as bactérias *Selenomonas ruminantium*, capazes de utilizar o lactato como fonte de carbono com a condição de que haja presença de precursores do oxaloacetato, como o malato. A presença deste ácido orgânico estimula a captação de ácido láctico pela *S. ruminantium*, mas não promove o crescimento destas bactérias na ausência de lactato (NISBET; MARTIN, 1990). Desta forma, a presença de concentrado altamente fermentável, que eleve os níveis de ácido láctico no rúmen, pode ser um fator chave para observar o efeito da suplementação com malato. Estudos *in vitro* e *in vivo* realizados por Carro et al (1999) e Flores et al (2003) indicam que os níveis e características fermentativas do concentrado podem interferir na magnitude do efeito do ácido orgânico sobre variáveis de interesse zootécnico.

Quando utilizados como aditivos nutricionais, os ácidos orgânicos podem ser fornecidos aos ruminantes na forma de ácidos, mas sua manipulação é problemática devido a sua natureza corrosiva e por diminuírem o pH ruminal (LIU et al. 2009). Desta forma, uma alternativa é o uso de sais (especialmente sais de sódio), que são fácil manipulação e não são abrasivos, embora sejam mais onerosos que os ácidos. Se analisarmos os estudos separadamente, existe a sensação de que a forma química pode influenciar na resposta animal. Entretanto, estudos que compararam os efeitos da suplementação com ácido málico ou sais de malato, sob as mesmas condições de alimentação, não observaram diferenças no desempenho animal e variáveis fermentativas (CARRASCO et al., 2012) ou metabólitos sanguíneos (CASTILLO et al., 2007; HERNÁNDEZ et al., 2011; CARRASCO et al., 2012).

Tabela 1 – Forma química, cereal e forragem principal, dose de suplemento e composição calculada da ração total misturada em experimentos com ovinos suplementados com ácido málico ou malato

<b>Autor</b>	<b>Forma</b>	<b>Cereal</b>	<b>Forragem</b>	<b>Dose (g/dia)</b>	<b>PB (%)</b>	<b>FDN (%)</b>	<b>FDA (%)</b>	<b>Amido (%)</b>	<b>EE (%)</b>
Gonzalez-Momita et al. 2009	Sal	Sorgo	Casca de soja	2.11	15.70	19.30	8.28	48.61	2.79
Loya-Olguin et al. 2019	Ácido	Sorgo	Palha de milho	3.93	14.01	16.44	5.76	44.36	3.88
Mungói et al. 2012 A	Sal	Trigo	Palha de cavada	1.93	18.60	13.70	5.50	43.00	2.80
Mungói et al. 2012 B	Sal	Cevada	Palha de cavada	2.05	17.00	14.00	5.70	44.00	3.80
Toprak et al. 2019 A	Sal	Cevada	Feno de alfafa	4.43	17.67	27.50	12.15	49.30	3.31
Toprak et al. 2019 B	Sal	Cevada	Feno de alfafa	9.44	17.36	28.96	11.87	45.96	3.09
Malekkhahi et al. 2015	Sal	Cevada	Silagem de milho	3.54	15.00	36.00	27.00	32.00	3.00
Elmali et al. 2012 A	Ácido	Cevada	Feno	3.92	14.49	30.30	13.28	33.26	3.19
Elmali et al. 2012 B	Ácido	Cevada	Feno	7.84	14.49	30.30	13.28	33.26	3.19
Carro et al. 2006 A	Sal	Cevada	Palha de milho	3.37	15.50	15.00	4.95	50.11	2.56
Carro et al. 2006 B	Sal	Cevada	Palha de milho	7.31	15.50	15.00	4.95	50.11	2.56
Flores 2004 A	Sal	Cevada	Palha de milho	1.90	18.30	15.70	6.20	40.32	3.14
Flores 2004 B	Sal	Milho	Palha de milho	1.83	18.50	12.00	5.47	40.99	3.01
Flores 2004 C	Sal	Cevada	Palha de milho	1.91	18.30	15.70	6.20	40.32	3.14
Flores 2004 D	Sal	Milho	Palha de milho	1.83	18.50	12.00	5.47	40.99	3.01
Flores 2004 E	Sal	Cevada	Palha de milho	2.28	18.30	15.70	6.20	40.32	3.14
Flores 2004 F	Sal	Milho	Palha de milho	2.18	18.50	12.00	5.47	40.99	3.01
Moharrery and Asadi 2009	Sal	Cevada	Feno de alfafa	7.07	14.92	31.20	17.88	27.41	1.88
Cuesta et al. 2003	Sal	Cevada	Palha de cavada	3.50	14.55	16.76	5.13	50.11	2.56

Tabela 2 – Forma química, cereal e forragem principal, dose de suplemento e composição calculada da ração total misturada em experimentos com bovinos suplementados com ácido málico ou malato

<b>Autor</b>	<b>Forma</b>	<b>Cereal</b>	<b>Forragem</b>	<b>Dose (g/dia)</b>	<b>PB (%)</b>	<b>FDN (%)</b>	<b>FDA (%)</b>	<b>Amido (%)</b>	<b>EE (%)</b>
Kung Jr. et al. 1982 A	Ácido	Milho	Silagem de milho	70.00	11.18	24.71	13.95	35.77	1.99
Kung Jr. et al. 1982 B	Ácido	Milho	Silagem de milho	105.00	11.18	24.71	13.95	35.77	1.99
Kung Jr. et al. 1982 C	Ácido	Milho	Silagem de milho	140.00	11.18	24.71	13.95	35.77	1.99
Kung Jr. et al. 1982 D	Ácido	Milho	Silagem de milho	42.00	8.76	25.54	13.76	46.78	2.77
Kung Jr. et al. 1982 E	Ácido	Milho	Silagem de milho	84.00	8.76	25.54	13.76	46.78	2.77
Martin et al. 1999 A	Sal	Milho	Casca de algodão	27.00	11.39	19.10	9.93	49.60	2.95
Martin et al. 1999 B	Sal	Milho	Casca de algodão	54.00	11.39	19.10	9.93	49.60	2.95
Martin et al. 1999 C	Sal	Milho	Casca de algodão	80.00	11.39	19.10	9.93	49.60	2.95
Sniffen et al. 2006	Sal	Milho	Feno de alfafa	50.00	18.20	31.80	21.40	29.40	2.70
Khampa et al. 2006 A	Sal	Mandioca	Palha de arroz	9.00	8.61	41.14	23.86	34.90	3.51
Khampa et al. 2006 B	Sal	Mandioca	Palha de arroz	18.00	8.61	41.14	23.86	34.90	3.51
Khampa et al. 2006 C	Sal	Mandioca	Palha de arroz	27.00	8.61	41.14	23.86	34.90	3.51
Devant et al. 2007	Sal	-	-	84.00	14.31	32.84	16.93	30.16	3.16
Foley et al. 2009 A	Ácido	Cevada	Silagem	34.00	15.60	23.10	13.80	28.10	2.50
Foley et al. 2009 B	Ácido	Cevada	Silagem	65.40	15.60	23.10	13.80	28.10	2.50
Foley et al. 2009 C	Ácido	Cevada	Silagem	32.38	15.57	23.09	13.82	28.12	2.47
Foley et al. 2009 D	Ácido	Cevada	Silagem	64.85	15.57	23.09	13.82	28.12	2.47
Foley et al. 2009 E	Ácido	Cevada	Silagem	98.25	15.57	23.09	13.82	28.12	2.47
Wang et al. 2009 A	Ácido	Milho	Silagem de milho	70.00	16.50	42.40	27.10	31.70	1.50
Wang et al. 2009 B	Ácido	Milho	Silagem de milho	140.00	16.50	42.40	27.10	31.70	1.50
Wang et al. 2009 C	Ácido	Milho	Silagem de milho	210.00	16.50	42.40	27.10	31.70	1.50
Liu et al. 2009 A	Ácido	Milho	Palha de milho	70.20	8.29	55.82	21.85	14.78	1.72
Liu et al. 2009 B	Ácido	Milho	Palha de milho	140.40	8.29	55.82	21.85	14.78	1.72
Liu et al. 2009 C	Ácido	Milho	Palha de milho	210.60	8.29	55.82	21.85	14.78	1.72

Hernández et al. 2011 A	Sal	Cevada	Palha de cevada	30.80	13.83	37.30	16.62	28.51	3.87
Hernández et al. 2011 B	Ácido	Cevada	Palha de cevada	26.80	13.83	37.30	16.62	28.51	3.87
Hernández et al. 2011 C	Sal	Cevada	Palha de cevada	28.40	13.83	37.30	16.62	28.51	3.87
Carrasco et al. 2012 A	Ácido	Cevada	Palha de cevada	9.38	16.61	21.59	8.35	37.04	9.76
Carrasco et al. 2012 B	Sal	Cevada	Palha de cevada	9.12	16.61	21.59	8.35	37.04	9.76
Vyas et al. 2015 A	Ácido	Cevada	Silagem de cevada	89.00	9.74	16.86	6.57	45.32	1.57
Vyas et al. 2015 B	Ácido	Cevada	Silagem de cevada	177.00	9.74	16.86	6.57	45.32	1.57
Malekkhahi et al. 2016 A	Sal	Milho	Silagem de milho	80.00	17.69	27.64	16.66	29.90	2.23
Malekkhahi et al. 2016 B	Sal	Milho	Silagem de milho	80.00	20.93	32.50	18.25	45.53	2.74
El-Zaiat et al. 2019	Ácido	Milho	Silagem de milho	30.00	17.16	32.29	19.06	36.70	5.60

#### 4. ARTIGO 1 META-ANÁLISE E META-REGRESSÃO DO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO MÁLICO E MALATO NA PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE DE VACAS HOLANDESAS EM LACTAÇÃO

Leonardo Tombesi da Rocha; Tiago João Tonin; Larissa Schumacher, Stela Naetzold Pereira; Julio Viégas;

##### Resumo

O objetivo deste estudo foi verificar, por meio de meta-análise, o efeito da utilização de ácido málico e malato sobre a produção e composição do leite de vacas holandesas. A base de dados foi composta através da inclusão de teses e artigos publicados que avaliaram o efeito da inclusão de ácido málico e malato sobre a produção e composição do leite. Apenas estudos que apresentarem resultados para um grupo controle vs. ácido málico ou malato foram considerados. O efeito da adição do ácido orgânico (AO) foi avaliado através do método do tamanho de efeito (TE). A heterogeneidade foi verificada através do teste Q de Cochran. A base de dados final foi composta por 16 estudos. Foram utilizados 642 animais com peso vivo médio de  $626,44 \pm 14,54$ kg, e nível de produção de  $29,36 \pm 4,92$ . Não houve efeito da suplementação com AO sobre a ingestão de matéria seca (IMS) (TE= -0,120; 95% IC= -0,280; 0,039; P= 0,139). A meta-regressão indicou que o consumo de concentrado (%PV) interfere significativamente no efeito do AO sobre a IMS. Foi observado efeito do AO sobre produção de leite (PL) (TE= 0,218; 95% CI= 0,007; 0,426, P= 0,043). A heterogeneidade observada para produção de leite foi de 25,36% (P= 0,188) A meta-regressão indicou que o concentrado energético ingerido (CE<sub>ING</sub>, kg/dia; CE<sub>ING</sub>, %PV) afeta o TE do malato sobre a PL. Não houve efeito da suplementação com malato sobre a quantidade de gordura no leite (GDL) (SMD= 0,195 95% CI= -0,081 – 0,471; P= 0,211) e proteína no leite (PTL) (SMD= 0,00; 95% CI= -0,174 – 0,174; P= 0,467). A heterogeneidade para essas variáveis foi de 58% (P<0,05) e 10,26 (P>0,05) para GDL e PTL, respectivamente. O consumo de concentrado proteico (CP<sub>ING</sub>, kg/dia; CP<sub>ING</sub>, %PV) foi apontado como fator interferente para GDL, enquanto para PTL apenas o CE<sub>ING</sub>, %PV foi significativo. A suplementação com ácido málico ou malato não afetou a ingestão de matéria seca, gordura e proteína no leite. Entretanto, foi observado aumento na produção de leite nos animais do grupo suplementado (tamanho do efeito 0,218). Através da meta-regressão ficou evidenciado que covariáveis relacionadas a ingestão de concentrado interferem diretamente na magnitude do efeito relacionado à suplementação com malato.

**Palavras-chave:** Ácido málico. Ácido orgânico. Concentrado proteico. Concentrado energético. Tamanho do efeito.

### **Abstract**

The aim of this study was to verify, through meta-analysis, the effect of malic acid/malate supplementation on milk production and composition of Holstein cows. The database was composed through the inclusion of theses and published papers that evaluated the effect of malate inclusion on milk production and composition. Only studies that present results for a control group vs. malic acid or malate were considered. The effect of the organic acid (AO) was evaluated using the effect size (ES) method. Heterogeneity was verified using the Cochran Q test. The final database consisted of 16 studies. A total of 642 animals with a average live weight of  $626.44 \pm 14.54$ kg and a production level of  $29.36 \pm 4.92$  were used. There was no effect of AO supplementation on dry matter intake (DMI) (ES= -0.120; 95% CI= -0.280; 0.039; P= 0.139). Meta-regression indicated that concentrate consumption (%BW) significantly interferes with the AO effect on DMI. Malate effect on milk production (PL) was observed (ES= 0.218; 95% CI= 0.007; 0.426, P= 0.043). The heterogeneity observed for milk production was 25.36% (P= 0.188) The meta-regression indicated that the energy concentrate ingested (CE<sub>ING</sub>, kg/day; CE<sub>ING</sub>, %BW) affects the TE of malate on the PL. There was no effect of malate supplementation on the amount of milk fat (MFAT) (SMD= 0.195 95% CI= -0.081 – 0.471; P= 0.211) and milk protein (PTL) (SMD= 0.00; 95% CI= -0.174 - 0.174; P=0.467). The heterogeneity for these variables was 58% (P<0.05) and 10.26 (P>0.05) for GDL and PTL, respectively. The consumption of protein concentrate (CP<sub>ING</sub>, kg/day; CP<sub>ING</sub>, %BW) was identified as an interfering factor for MFAT, while for PTL only CE<sub>ING</sub>, %BW was significant. Malate or malic acid supplementation did not affect the intake of dry matter, fat and protein in milk. However, an increase in milk production was observed in the animals in the malate-supplemented group (ES 0.218). Through meta-regression, it was evidenced that covariates related to concentrate intake directly interfere in the magnitude of the effect related to AO supplementation.

**Keywords:** Effect size. Energy concentrate. Malic acid. Organic acid. Protein concentrate

## Introdução

No início dos anos 2000, houve um aumento na quantidade de pesquisas buscando substitutos para os antibióticos que eram amplamente utilizados na produção animal. Tal busca decorreu da crescente preocupação da população com a qualidade da alimentação e, também, da inquietação da comunidade científica que temia casos de super resistência bacteriana causada por esses aditivos.

Dentre estes produtos estão os ionóforos, antibióticos que deprimem ou inibem seletivamente o crescimento de microrganismos, sendo capazes de aumentar a produção de leite e diminuir o consumo de matéria seca, além de melhorar a eficiência da produção. (DUFFIELD et al. 2008). Entretanto, os ionóforos aparecem em uma lista da União Europeia contendo aditivos banidos da produção animal. Assim, diversas alternativas foram propostas como substitutas à esta substância, dentre elas o malato.

O malato é um constituinte natural de diversos alimentos e ocorre no trato digestivo dos ruminantes como parte do metabolismo intermediário dos carboidratos (KOZLOSKI, 2011). Esse ácido orgânico foi amplamente avaliado *in vitro*, apresentando efeitos significativos na redução do pH, aumentando a digestibilidade de frações da dieta e na produção de ácidos graxos voláteis, além de ser capaz de reduzir produção de metano (CALLAWAY & MARTIN, 1996; CARRO & RANILLA, 2003; MARTIN & STREETER 1995; MARTIN et al., 2000)). Além disso, estudos *in vivo* indicam que o malato pode atuar aumentando a produção de leite e a persistência da lactação de vacas leiteiras (KUNG et al. 1982; EL-ZAIAT et al., 2019).

Embora exista um volume considerável de estudos avaliando o efeito de utilização de malato sobre a produção e composição do leite, os resultados destes experimentos parecem ser inconclusivos. De acordo com Wang et al. (2009), as razões destas inconsistências podem estar relacionadas com a dieta fornecida aos animais, ou seja, possuem natureza experimental. Além disso, é possível que alguns estudos não tivessem número adequado de repetições e, conseqüentemente, poder estatístico para demonstrar diferenças nas medidas de produção.

Falta de poder estatístico resulta em aumento do risco de perder um verdadeiro efeito de tratamento (LOVATTO et al., 2007). Diante disso, a técnica de meta-análise foi proposta como método para sumarizar estimativas de efeito, especialmente quando numerosos estudos têm sido realizados em diferentes locais, por diferentes pesquisadores, utilizando diferentes desenhos experimentais e que, quando consideradas individualmente, não fornecem provas conclusivas de efeito.

Frente ao exposto, o objetivo deste estudo foi verificar, por meio de meta-análise, o efeito da utilização de malato sobre a produção e composição do leite de vacas holandesas em lactação.

### **Materiais e métodos**

A base de dados foi composta através da inclusão de teses e artigos publicados que avaliaram o efeito da inclusão de malato sobre a produção e composição do leite de vacas holandesas. A revisão da literatura foi conduzida através dos motores de busca Web of Science, Science Direct e Google Acadêmico, utilizando as palavras chave: ácidos orgânicos, ácido málico, malato e bovinos. Além disso, as referências de cada artigo encontrado foram revisadas em busca de mais trabalhos relevantes para a pesquisa.

Para serem incluídos na meta-análise, os estudos deveriam ser originais e conter média e uma medida de dispersão das variáveis de interesse. Se não presentes no artigo, os desvios padrão de cada estudo foram calculados através das medidas de variabilidade apresentadas nos artigos. Apenas estudos que apresentarem resultados para um grupo controle e tratamento (suplementação com malato) foram considerados. Experimentos independentes, apresentados em um mesmo artigo, foram incluídos como um estudo diferente. Quando, eventualmente, outros tratamentos foram utilizados em combinação com malato, estes também foram incluídos como estudos separados. Da mesma forma, diferentes doses de malato em um mesmo experimento foram incluídos como um novo estudo.

Os dados foram selecionados das seções material e métodos e resultados de cada artigo e tabulados em uma base elaborada em planilha eletrônica. As informações incluídas foram relacionadas a estudo, periódico, ano, delineamento, dose, relação volumoso:concentrado, composição química da ração, consumo de matéria seca, produção de leite, proteína e gordura no leite. Nos artigos onde a composição das dietas não foi determinada, a mesma foi calculada considerando os níveis de inclusão dos alimentos com a respectiva composição bromatológica encontrada na literatura. Tendo isso em vista, apenas foram incluídos aqueles estudos que apresentaram a composição química da dieta ou que forneceram informações para que a mesma fosse estimada.

O efeito da adição do malato sobre as variáveis de interesse foi avaliado através do método do tamanho de efeito. Para cada variável, o tamanho de efeito ( $y$ ) foi calculado como a diferença entre o grupo tratamento (malato) e o grupo controle dividida pelo desvio padrão agrupado. O tamanho do efeito foi calculado a partir de um modelo de efeitos aleatórios A

heterogeneidade foi verificada através do teste Q de Cochran. Concomitantemente, a estatística  $I^2$  foi utilizada para determinar quanto da variabilidade total (%) ocorreu em função da variabilidade entre estudos (HIGGINS & THOMPSON, 2003).

A análise de meta-regressão foi usada para explorar os efeitos lineares de covariáveis apontadas na literatura como possíveis fatores interferentes nos resultados dos estudos. Foram testadas as seguintes variáveis explicativas: peso vivo (kg), consumo de forragem (kg/dia), consumo de forragem verde (kg/dia), consumo de forragem desidratada, consumo de forragem fermentada (kg/dia), consumo de concentrado (kg/dia), consumo de concentrado (%PV), consumo de concentrado proteico (PB>18%, kg/dia), consumo de concentrado energético (PB<18%), consumo de proteína bruta (kg/dia), consumo de FDN (kg/dia), consumo de FDA (kg/dia) e relação volumoso:concentrado.

Forest plots foram utilizados para apresentar a média e intervalo de confiança dos estudos graficamente. Neste tipo de figura, o losango apresentado ao final da imagem representa o efeito de uma variável independente Y sobre a dependente X, determinado a partir dos resultados da análise de todos os estudos e seus respectivos pesos. Quando o losango se apresentou à esquerda da linha central (média padronizada) sem tocá-la, considerou-se que o efeito foi negativo, favorecendo o controle. Quando apresentado à direita da linha central, considerou-se o efeito como positivo, em favor do malato. A análise “leave one out” foi utilizada como teste de sensibilidade. Todas as análises foram realizadas através do pacote estatístico OpenMetaAnalyst.

## Resultados

A base de dados final foi composta por 16 estudos, com ano de publicação variando de 1978 a 2019. Ao todo, foram utilizados 642 animais, com peso vivo médio de  $626,44 \pm 14,54$ kg, e nível de produção de  $28,82 \pm 4,74$  e  $29,90 \pm 5,11$ kg de leite/vaca/dia, para os tratamentos controle e malato, respectivamente. As doses de suplementação com malato variaram de 30g/vaca/dia a 480 g/vaca/dia.

Os resultados da diferença média padronizada e os intervalos de confiança a 95% para ingestão de matéria seca (IMS) podem ser visualizados na Figura 1. O tamanho geral do efeito é representado pelo losango localizado na porção inferior do gráfico. A resposta obtida apresentou efeito homogêneo, conforme indicado pela análise de heterogeneidade ( $I^2 = 2,42$ ;  $P = 0,425$ ). A posição do diamante na figura indicou que não houve efeito da suplementação com malato sobre a IMS (TE=  $-0,120$ ; 95% CI=  $-0,280$ ;  $0,039$ ;  $P = 0,139$ ). Dentre as variáveis

explicativas avaliadas através da meta-regressão, apenas o consumo de concentrado (%PV) foi significativo, influenciando a dimensão da resposta obtida para IMS em função da suplementação com malato (Figura 2), os resultados observados para as demais variáveis podem ser visualizados na Tabela 1. A análise “leave one out” indicou que não há estudos que influenciaram o tamanho ou a direção do efeito geral.

O forest plot apresentado na Figura 3 reflete o efeito da suplementação com malato sobre a produção de leite de vacas holandesas. O losango na porção final da figura demonstra que há de efeito do malato sobre essa variável (TE= 0,218; 95% CI= 0,007; 0,426, P= 0,043). Apesar do resultado não significativo para heterogeneidade (P= 0,188), 25,36% da variação observada entre os resultados de experimentos com suplementação de malato ocorreram em função da variabilidade entre estudos. A análise de meta-regressão indicou que as covariáveis: concentrado energético ingerido (CE<sub>ING</sub>, kg/dia; CE<sub>ING</sub>, %PV), afetaram a magnitude da diferença na resposta de produção de leite devido a suplementação com malato (Figura 4). Não foram observados estudos que influenciaram o tamanho ou a direção do efeito geral, através da análise de sensibilidade (Figura 5).

O efeito da suplementação com malato sobre a gordura do leite é apresentado na Figura 6. O efeito geral não foi significativo (TE= 0,195; 95% CI= -0,081 – 0,471; P= 0,167). A heterogeneidade apresentou valor significativo nesta variável (P= 0.02), e indicou que a variação entre os estudos representou 58,9% da variabilidade em experimentos com suplementação com malato. Dentre as covariáveis testadas na análise de meta-regressão, foram observados valores significativos apenas para aquelas relacionadas ao consumo de concentrado proteico (CP<sub>ING</sub>, kg/dia; CP<sub>ING</sub>, %PV) (Figura7).

Não houve efeito da suplementação com malato sobre a porcentagem de proteína no leite (TE= 0.00; 95% CI= -0,174 – 0.174; P= 0,467) (Figura 8). A análise de heterogeneidade indicou que a resposta obtida apresentou efeito homogêneo (I<sup>2</sup>= 10.26; P= 0,336). Novamente, a ingestão de concentrado energético (%PV) foi detectada como uma das variáveis capazes de afetar a magnitude da diferença na resposta obtida (Figura 9), resultando em menor tamanho de efeito observado nos estudos em função do maior consumo de concentrado energético (PB<18%).

## Discussão

O objetivo deste estudo foi determinar os efeitos da suplementação com malato sobre a ingestão de matéria seca, produção de leite, assim como proteína e gordura no leite de vacas

em lactação. Além disso, como proposta secundária, determinar covariáveis que poderiam ser fatores interferentes na resposta obtida com a adição de malato.

A suplementação com malato não influenciou a IMS dos animais. Esse resultado está de acordo com o observado por Foley et al. (2006), Wang et al. (2006) e Malekkhahi et al. (2016). Entretanto, essa é a primeira vez em que tal informação foi obtida através de meta-análise. Embora não significativo, o tamanho de efeito obtido (-0.120) indicaria uma diminuição irrisória no consumo em função da suplementação com malato, considerando os valores determinados por Cohen (1988) para tamanho de efeito. Estudos como os de El-Zaiat et al. (2019) e Foley et al. (2009), indicam que pode haver redução da IMS em razão da suplementação com malato devido, principalmente, à má palatabilidade desse ingrediente. A partir da análise de meta-regressão foi estabelecido que, dentre as variáveis testadas, apenas a ingestão de concentrado (%PV) foi significativa. De acordo com a equação obtida ( $SMD = 0.576 - 0.664x$ ;  $P < 0.05$ ) para cada ponto percentual a mais de concentrado ingerido o tamanho do efeito sobre a IMS regride em 0.664. É sabido que em função de um efeito aditivo, o fornecimento de concentrado implica em maior consumo de alimento (Lawrence et al., 2015). Assim, é possível que a presença de concentrado acabe por mitigar a provável redução na IMS causada pelo consumo de malato.

Foi possível confirmar o efeito do malato sobre a produção de leite. Um dos principais resultados esperados devido à suplementação com este ácido orgânico é que, em função da sua presença, haja aumento na produção de propionato no rúmen (CASTILLO et al., 2004). Desta forma, a partir de uma sequência de eventos bioquímicos, a suplementação com malato aumentaria a produção de leite, uma vez que o propionato é o principal precursor da lactose, componente que afeta diretamente o volume de leite (COSTA et al. 2019). O tamanho de efeito observado foi de 0,218, de acordo com Cohen (1988) valores acima de 0,2 são considerados como um efeito moderado. Esse valor significa que a média do grupo tratamento (malato) está 0.218 desvios padrões acima do controle. Além disso, o intervalo de confiança indicou que esse efeito pode variar de 0,007 a 0,428. Novamente, a meta-regressão indicou que a ingestão de concentrado energético, em g/dia ou quando expressa em função do peso vivo, foram as únicas covariáveis a apresentarem resultados significativos. A inclinação das equações (Tabela 1) indicou que existe uma relação positiva entre as duas variáveis, ou seja, o aumento no consumo desse tipo de concentrado aumenta o tamanho do efeito observado do malato sobre a produção de leite. A presença do malato em combinação com a alta quantidade de amido neste substrato, estimula a produção de succinato e (ou) propionato por bactérias *S. ruminantium* (CASTILLO et al., 2004).

De acordo com nosso estudo, a suplementação com malato não afeta a quantidade de gordura (% ou g/kg) de vacas holandesas. Embora não haja motivos específicos para que o ácido málico atue nessa variável, era esperado que houvesse redução na quantidade de gordura do leite. Isso ocorreria em função da relação inversamente proporcional que existe entre a quantidade de leite e seus componentes (DARABIGHANE et al., 2020). Apesar disso, nenhum dos estudos incluídos na análise apresentaram resultados significativos para gordura no leite (SNIFFEN et al 2006; FOLEY et al., 2006; MALEKKHAHI et al. 2016). É possível especular que, como o tamanho do efeito do malato sobre a produção de leite é relativamente baixo, tal incremento não é suficiente para gerar diferenças que possam ser detectadas estatisticamente. Diferentemente das outras variáveis, a meta-regressão indicou que a ingestão de concentrado proteico (%PV) reduz o tamanho do efeito do malato sobre a gordura do leite (SMD= 0.463 - 0.750x). De acordo com Huhtanen & Rinne (2007) a utilização de suplementação proteica na dieta pode levar ao aumento na porcentagem de gordura do leite, resultado inverso daquele esperado pela adição de malato.

A quantidade de proteína no leite não foi influenciada pela suplementação com malato. Esse resultado se assemelha ao obtido por El-Zaiat et al (2019), Foley et al (2009) e Wang et al. (2009). Em razão da maior produção de leite, era esperado uma pequena redução na proteína do leite, embora esta variável seja menos susceptível a variação quando comparada com a gordura (MURPHY & O'MARA, 1992). Essa afirmação poder ser ilustrada a partir do tamanho de efeito nulo observado para a PTL. A heterogeneidade ( $I^2$ ) observada para a variável foi de 10.72%, valor que pode ser considerado pouco importante (Higgins et al., 2003). Através da análise de meta-regressão foi determinado que a ingestão de concentrado energético em kg/dia (1.071 - 0.162x,  $P < 0.01$ ) ou em %PV (1.088 - 1.018x,  $P < 0.01$ ) atua reduzindo o efeito do malato sobre a proteína do leite. De acordo com a meta-análise realizada por Huhtanen & Rinne (2007), a suplementação energética exerce efeito positivo sobre a quantidade de proteína no leite, destacando que a suplementação com gorduras possui efeito mais contundente em comparação com os carboidratos.

### **Conclusão**

A suplementação com malato não afeta a ingestão de matéria seca, gordura e proteína no leite. Entretanto, foi observado aumento na produção de leite nos animais do grupo suplementado com malato (tamanho do efeito 0.218). Através da meta-regressão ficou

evidenciado que covariáveis relacionadas a ingestão de concentrado interferem diretamente na magnitude do efeito relacionado à suplementação com malato.

### Referências bibliográficas

- ALFEREZ, J. C. M. Production and intake response of dairy cows fed four levels of malic acid. 1978. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal) - Utah State University, Logan, UT, 1978.
- CALLAWAY, T. R., MARTIN, S. A. Effects of organic acid and monensin treatment on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation of cracked corn. **Journal of Animal Science**, Oxford, v. 74, n. 8, p. 1982-1989, 1996. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/74/8/1982/4637414>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- CARRO, M. D., RANILLA, M. J. Effect of the addition of malate on in vitro rumen fermentation of cereal grains. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, n. 89, n. 1, p. 181-188, 2003. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/british-journal-of-nutrition/article/25B1D019BD212C1BC7BDB65DA3C20BC3>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- CASTILLO, C. et al. Organic acids as a substitute for monensin in diets for beef cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v. 115, n. 1, p. 101–116, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0377840104000355>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- COHEN, J. **Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences**. 2 ed. Hillsdale: Lawrence Erlbaum Associates, Publishers. 1988. 579p.
- COSTA A. et al. Invited review: Milk lactose—Current status and future challenges in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 7, p. 5883-5898, 2019. Disponível em: [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(19\)30424-2/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(19)30424-2/fulltext). Acesso em: 9 fev. 2022.
- DARABIGHANE, B. et al. Replacing alfalfa hay with dry corn gluten feed alters eating behavior, nutrient digestibility, and performance of lactating dairy cows, **Italian Journal of Animal Science**, v. 19, n. 1, p. 1264-1274, 2020. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/epub/10.1080/1828051X.2020.1830722>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- DUFFIELD, T. F., RABIEE, A. R., LEAN, I. J. A Meta-Analysis of the Impact of Monensin in Lactating Dairy Cattle. Part 2. Production Effects. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 4, p. 1347–1360, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030208712621>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- EL-ZAIAT, H. M. et al. Enhancing lactational performance of Holstein dairy cows under commercial production: malic acid as an option. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 2, p. 885-892, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.9259>. Acesso em: 9 fev. 2022.

- 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. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030209706423>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- FOLEY, P. A. et al. Effect of DL-malic acid supplementation on feed intake, methane emission, and rumen fermentation in beef cattle. **Journal of Animal Science**, Oxford, v. 87, n. 3, p. 1048–1057, 2009. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/87/3/1048/4731155>. Acesso em: 9 fev. 2022
- HIGGINS, J. P., THOMPSON, S, G. Measuring inconsistency in meta-analyses. **The BMj**, v. 327, n. 1, p. 557-560, 2003. Disponível em: <https://www.bmj.com/content/327/7414/557>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica de ruminantes**. 3 ed. Santa Maria: UFSM, 2011. 216p
- KUNG JR., L. et al. Influence of adding malic acid to dairy cattle rations on milk production, rumen volatile acids, digestibility, and nitrogen utilization. **Journal of Dairy Science**, v. 65, n. 7, p. 1170–1174, 1982. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203028282328X>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- LAWRENCE, D. C. et al. The effect of concentrate feeding amount and feeding strategy on milk production, dry matter intake, and energy partitioning of autumn-calving Holstein-Friesian cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 1, p. 338-348, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030214007668>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- LOVATTO, P. A. et al. Meta-análise em pesquisas científicas - enfoque em metodologias. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, suplemento, p. 285-294, 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbz/a/TxB6XwXygrfKhPTmyyYMJrd/?lang=pt>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- MALEKKHAHI, M. et al. Effects of supplementation of active dried yeast and malate during sub-acute ruminal acidosis on rumen fermentation, microbial population, selected blood metabolites, and milk production in dairy cows, **Animal Feed Science and Technology**, v. 213, n. 1, p. 29-43, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0377840115301085?via%3Dihub>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- MARTIN, S. A., STREETER, M. N., 1995. Effect of malate on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. **Journal of Animal Science**, Oxford, v. 73, n. 7, p. 2141-2145, 1995. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/73/7/2141/4718858?>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- MARTIN, S. A., SULLIVAN, H. M., EVANS, D. J. Effect of sugars and malate on ruminal microorganisms. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 11, p. 2574–2579, 2000. Disponível em: [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(00\)75150-2/pdf](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(00)75150-2/pdf). Acesso em: 9 fev. 2022.
- SNIFFEN, C. J. et al. Effects of malic acid on microbial efficiency and metabolism in continuous culture of rumen contents and on performance of mid-lactation dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 127, n. 1, p. 13–31, 2006. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0377840105003159?via%3Dihub>.  
Acesso em: 9 fev. 2022.

VICINI, J. L. et al. Effect of feeding supplemental fibrolytic enzymes or soluble sugars with malic acid on milk production. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 2, p. 576–585, 2003.  
Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030203736364>. Acesso em: 9 fev. 2022.

WANG, C. et al. Effects of malic acid on feed intake, milk yield, milk components and metabolites in early lactation Holstein dairy cows. **Livestock Production Science**, v. 124, n. 1–3, p. 182-188, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871141309000316>. Acesso em: 9 fev. 2022.

Tabela 1 – Meta-regressão do efeito de covariáveis dietéticas sobre a ingestão de matéria seca, produção de leite, gordura e proteína do leite suplementadas com malato

	Dry matter intake	Milk production	Milk fat	Milk protein
Body weight (BW), kg	-0.231 + 0.001x	-4.751 + 0.008x	5.561 - 0.009x	-1.665 + 0.003x
Dose, g/day	-0.343 - 0.002x	0.487 - 0.002x	0.190 - 0.001x	-0.325 + 0.002x
Forage intake, kg/day	0.362 - 0.058x	-0.431 + 0.061x	-0.516 + 0.055x	0.136 - 0.012x
Fresh forage intake, kg/day	-0.026 - 0.034x	0.197 + 0.004x	0.000 + 0.023x	0.043 - 0.014x
Dry forage intake, kg/day	-0.213 + 0.063x	0.201 + 0.003x	0.101 - 0.014x	-0.084 + 0.062x
Fermented forage intake, kg/day	-0.307 + 0.031x	-0.014 + 0.035x	0.070 - 0.002x	0.035 - 0.003x
Concentrate intake, kg/day	-0.124 + 0.002x	-0.088 + 0.029x	1.007 - 0.092x*	0.190 - 0.017x
Protein concentrate intake, kg/day	-0.358 + 0.064x	0.237 - 0.009x	0.458 - 0.177x**	-0.174 + 0.053x
Energy concentrate intake, kg/day	0.513 - 0.098x	-0.485 + 0.107x*	0.102 - 0.003x	1.071 - 0.162x**
Concentrate intake, %BW	-0.099 - 0.004x	-0.078 + 0.177x	1.052 - 0.609x*	0.210 - 0.123x
Protein concentrate intake, %BW	-0.359 + 0.408x	0.244 - 0.066x	0.463 - 0.750x**	-0.177 + 0.341x
Energy concentrate, %BW	0.576 - 0.664x*	-0.315 + 0.519x*	-0.017 + 0,089x	1.088 - 1.018x**
Crude protein intake, kg/day	0.444 - 0.165x	-0.638 + 0.249x	0.862 - 0.234x	0.165 - 0.046x
Neutral detergent fiber intake, kg/day	-0.295 + 0.027x	-1.701 + 0.270x	0.109 - 0.004x	0.071 - 0.008x
Acid detergent fiber intake, kg/day	-0.383 - 0.041x	-1.216 + 0.326x	0.187 - 0.024x	0.187 - 0.024x
Forage:Concentrate ratio, kg/kg	0.088 - 0.063x	0.861 + 0.133x	0.054 + 0.202x	0.037 + 0.065x

\* P>0.05; \*\* P>0.01

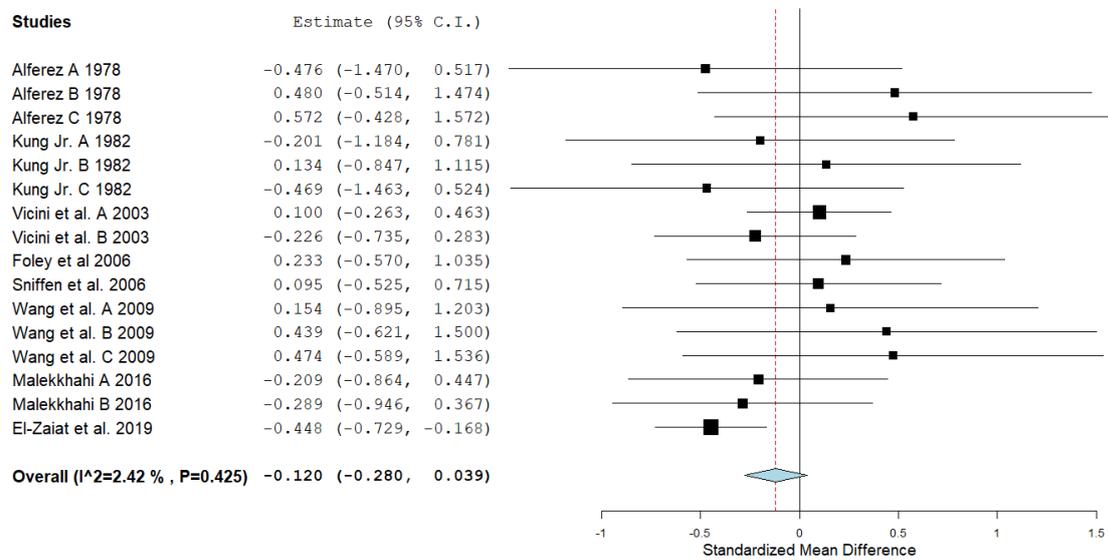


Figura 1 – Efeito da suplementação com malato sobre a ingestão de matéria seca de vacas holandesas em lactação.

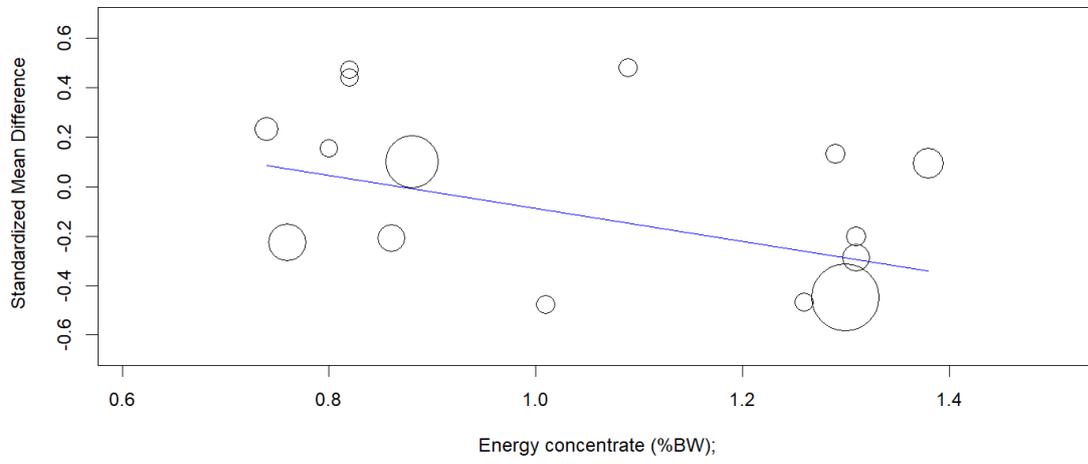


Figura 2 – Meta-regressão do efeito da ingestão de concentrado energético sobre a SMD da ingestão de matéria seca de vacas holandesas em lactação suplementadas com malato.

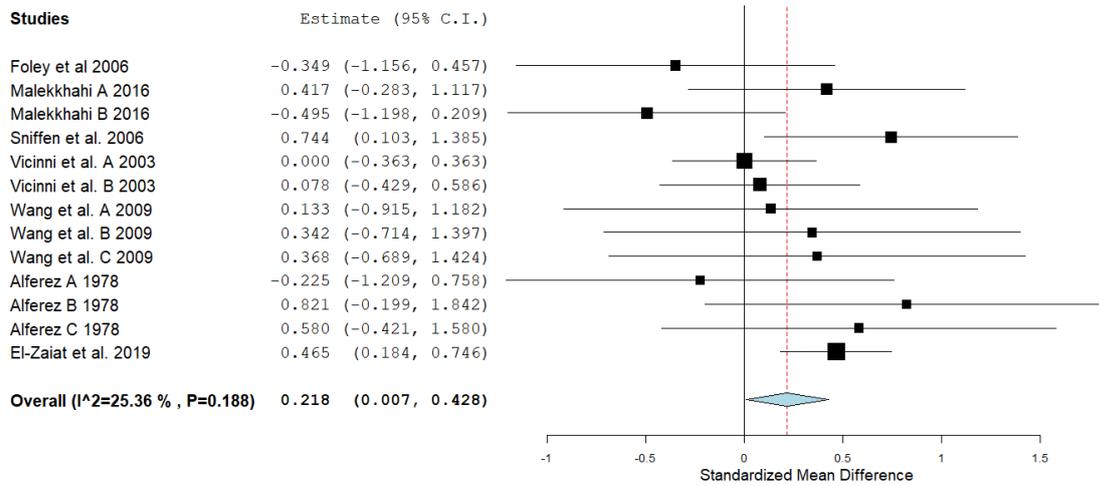


Figura 3 – Efeito da suplementação com malato sobre a produção de leite de vacas holandesas em lactação.

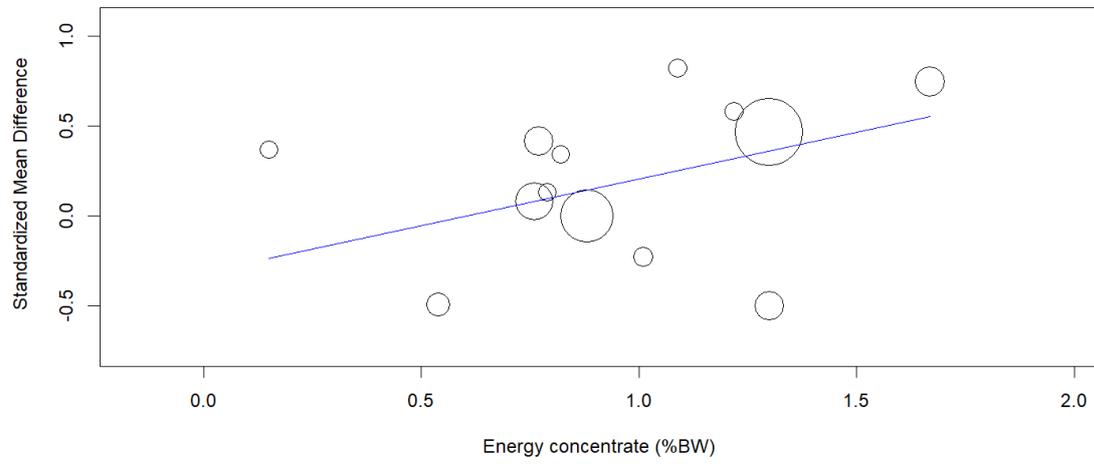


Figura 4 – Meta-regressão do efeito da ingestão de concentrado energético (%PV) sobre a SMD da produção de leite de vacas holandesas suplementadas com malato.

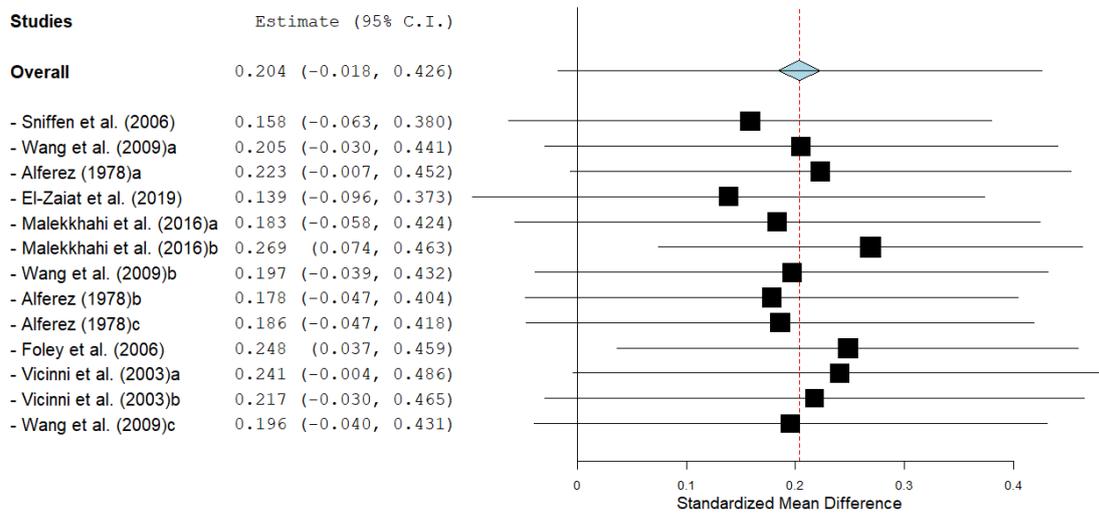


Figura 5 – Análise “leave one out” para produção de leite de vacas holandesas em lactação suplementadas com malato

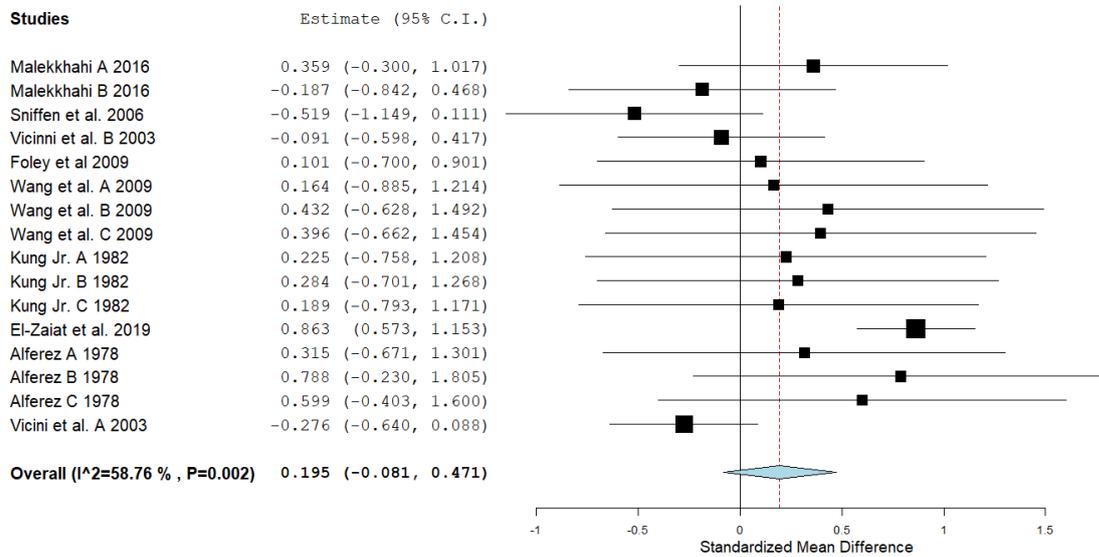


Figura 6 – Efeito da suplementação com malato sobre a porcentagem de gordura do leite de vacas holandesas em lactação.

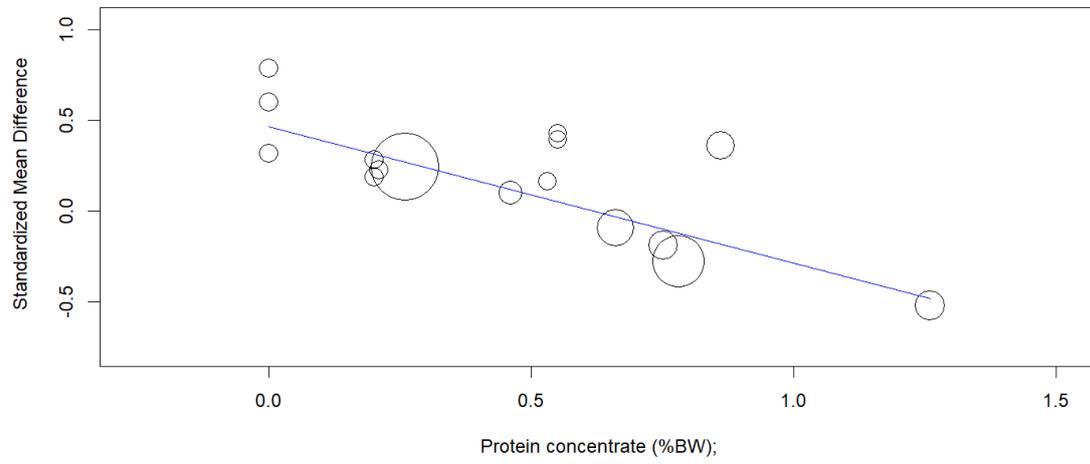


Figura 7 – Meta-regressão do efeito da ingestão de concentrado proteico (%PV) na SMD da gordura do leite de vacas holandesas suplementadas com malato.

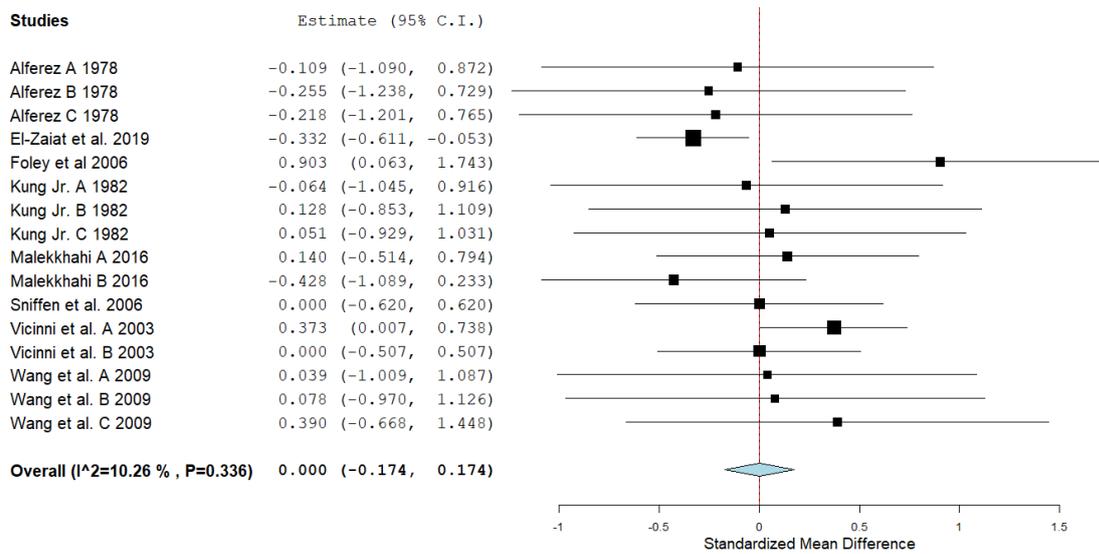


Figura 8 – Efeito da suplementação com malato sobre a proteína no leite de vacas holandesas em lactação.

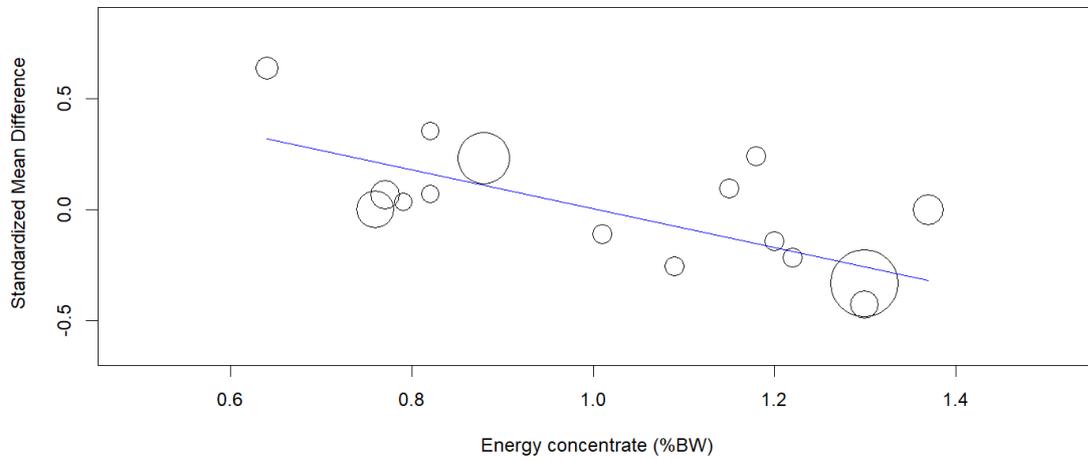


Figura 9- Meta-regressão do efeito da ingestão de concentrado energético (%PV) na SMD da proteína no leite de vacas holandesas suplementadas com malato

## 5. ARTIGO 2 META-ANÁLISE E META-REGRESSÃO DO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO MÁLICO E SEUS SAIS SOBRE O DESEMPENHO, CARACTERÍSTICAS DE CARÇAÇA, BALANÇO DE NITROGÊNIO E PARÂMETROS RUMINAIS DE CORDEIROS

Leonardo Tombesi da Rocha; Tiago João Tonin; Larissa Schumacher; Stela Naetzold Pereira; Julio Viégas

### Resumo

O objetivo deste estudo foi determinar o efeito da suplementação com ácido málico ou malato no desempenho, características de carcaça, balanço de nitrogênio e parâmetros ruminiais de cordeiros. Concomitantemente, através de meta-regressão, buscar covariáveis que interfiram no tamanho do efeito observado. O efeito da adição do ácido orgânico (AO) foi avaliado através do método do tamanho de efeito (TE). O TE foi calculado como a diferença entre o grupo tratamento e o grupo controle dividida pelo desvio padrão agrupado. O efeito médio da suplementação com o AO foi calculado a partir de um modelo de efeitos aleatórios. A análise de meta-regressão foi usada para explorar os efeitos lineares de covariáveis apontadas na literatura como possíveis fontes de variabilidade dos resultados observados. Não foi detectado efeito da suplementação sobre o consumo de matéria seca e peso final. O TE observado para ganho médio diário (GMD) foi 0.418 ( $P < 0.05$ ), o valor de  $I^2$  foi 58.51%. A meta-regressão indicou que o efeito do AO sobre o GMD é reduzido conforme a ingestão de ácido málico/malato (g/kg PV) aumenta. O tamanho de efeito para conversão alimentar (CA) foi -0.604 ( $P < 0.05$ ), o valor de  $I^2$  para esta variável foi de 70.54%. A meta-regressão apontou que a ingestão AO (g/kg PV), foi significativa e atuaria aumentando CA dos cordeiros em função do aumento no consumo de malato. Não foi observado efeito sobre nenhuma das variáveis relacionadas a digestibilidade. A estatística  $I^2$  oscilou de 70 a 90%. A análise de meta-regressão determinou que a ingestão de amido (g/kg PV) reduziu significativamente o efeito do malato sobre a digestibilidade da matéria orgânica. Para digestibilidade da proteína e fibra em detergente neutro nenhuma das covariáveis testadas apresentou resultados significativos, embora a ingestão de amido (g/kg PV) tenha mostrado tendência de redução do efeito observado. A produção total de ácidos graxos voláteis (AGV) também foi aumentada nos animais do grupo malato (TE 0.503;  $P < 0.05$ ). Não foi possível confirmar o efeito do malato sobre a produção de propionato e acetato, enquanto a produção de butirato foi reduzida pela suplementação com malato. Em conclusão, a suplementação com ácido málico/malato aumenta o GMD e reduz a CA de cordeiros, sendo esse efeito reduzido em função de elevadas doses do

suplemento. O AO não afetou a digestibilidade das frações da dieta, a meta-regressão indicou que a ingestão de amido foi um dos fatores interferentes para esse resultado. Ainda, a presença de ácido málico aumentou a produção de ácidos graxos voláteis totais e é capaz de elevar o pH ruminal de cordeiros.

**Palavras-chave:** Ácido orgânico. Ácidos graxos voláteis. pH ruminal

### Abstract

The aim of this study was to determine the effect of malic acid or malate supplementation on performance, carcass traits, nitrogen balance and ruminal parameters of lambs. Concomitantly, through meta-regression, search for covariates that interfere in the size of the observed effect. The effect of the addition of organic acid (OA) was evaluated using the effect size (ES) method. ES was calculated as the difference between the treatment group and the control group divided by the pooled standard deviation. The mean effect of OA supplementation was calculated using a random effects model. Meta-regression analysis was used to explore the linear effects of covariates identified in the literature as possible sources of variability in the observed results. No effect of supplementation on dry matter intake and final weight was detected. The TE observed for average daily gain (ADG) was 0.418 ( $P < 0.05$ ), the value of  $I^2$  was 58.51%. Meta-regression indicated that the effect of AO on ADG is reduced as malic acid/malate (g/kg BW) intake increases. The effect size for feed conversion (FC) was -0.604 ( $P < 0.05$ ), the value of  $I^2$  for this variable was 70.54%. The meta-regression showed that the AO intake (g/kg BW) was significant and would act to increase FC of lambs as a function of the increase in malate intake. No effect was observed on any of the variables related to digestibility. The  $I^2$  statistic ranged from 70 to 90%. Meta-regression analysis determined that starch intake (g/kg BW) significantly reduced the effect of malate on organic matter digestibility. For protein and neutral detergent fiber digestibility, none of the covariates tested showed significant results, although starch intake (g/kg BW) showed a tendency to reduce the observed effect. The total production of volatile fatty acids (VFA) was also increased in the malate group (ES 0.503;  $P < 0.05$ ). It was not possible to confirm the effect of malate on the production of propionate and acetate, while the production of butyrate was reduced by malate supplementation. In conclusion, malic acid/malate supplementation increases ADG and reduces CA in lambs, this effect being reduced as a function of high supplement doses. The AO did not affect the digestibility of the diet fractions, the meta-regression indicated that the starch intake was one of the interfering factors

for this result. Furthermore, the presence of malic acid increased the production of total volatile fatty acids and is capable of raising the ruminal pH of lambs.

**Keywords:** Organic acids. Volatile fatty acids. Ruminal pH

## Introdução

A preocupação crescente da população com a qualidade da alimentação além da inquietação da comunidade científica com o surgimento de casos de super resistência bacteriana fizeram com que pesquisas buscando substitutos para os antibióticos, amplamente utilizados na produção animal, aumentassem exponencialmente.

Embora não haja casos ligando ionóforos, antibióticos que deprimem ou inibem seletivamente o crescimento de microrganismos no rúmen, com casos de resistência bacteriana, estes produtos aparecem em uma lista da União Europeia contendo aditivos a banidos da produção animal (LOYOLA & PAILE, 2006). Assim, diversas alternativas foram propostas como substitutas à esta substância, dentre elas o malato.

O malato é um constituinte natural de diversos alimentos e ocorre no trato digestivo dos ruminantes como parte do metabolismo intermediário dos carboidratos (KOZLOSKI, 2011). Apesar de resultados *in vitro* apresentarem efeitos significativos na redução do pH, aumento na digestibilidade de frações da dieta e na produção de ácidos graxos voláteis, quando testado *in vivo* os resultados encontrados são extremamente conflitantes (PEREZ, 2004; MUNGÓI et al. 2012; ELMALI et al. 2012; LOYA-OLGUIN et al. 2019).

A despeito da considerável quantidade de estudos que avaliaram o efeito do malato sobre o desempenho, características de carcaça, balanço de nitrogênio e parâmetros ruminais de cordeiros, seus resultados mostram-se inconclusivos. As razões para estas inconsistências podem estar relacionadas com fatores dietéticos, dose do produto, entre outros. Além disso, é possível que alguns estudos não tivessem número de repetições adequado e, conseqüentemente, poder estatístico para demonstrar diferenças nas variáveis de interesse.

Falta de poder estatístico resulta em aumento do risco de perder um verdadeiro efeito de tratamento (LOVATTO et al., 2007). Para contornar tal problema, pode-se lançar mão da técnica de meta-análise, descrita como um método capaz de sumarizar estimativas de efeito, preferencialmente quando diferentes estudos têm sido realizados e que, quando consideradas individualmente, não fornecem provas conclusivas de efeito.

Assim, com o objetivo de determinar o efeito da suplementação com malato no desempenho, características de carcaça, balanço de nitrogênio e parâmetros ruminais de cordeiros, foi conduzido o presente estudo. Concomitantemente, com o uso da meta-regressão, objetivou-se, também, buscar covariáveis que interfiram no tamanho do efeito observado.

### **Materiais e métodos**

Para a construção da base de dados, foram incluídos trabalhos publicados que tenham avaliado o efeito da inclusão de malato sobre o desempenho, características de carcaça, balanço de nitrogênio e parâmetros ruminais de cordeiros. A busca por artigos foi realizada nos motores de busca Web of Science, Science Direct e Google Acadêmico, utilizando as palavras chave: ácidos orgânicos, ácido málico, malato e ovinos. Além disso, as referências de cada artigo foram revisadas em busca de novas informações relevantes para a pesquisa.

Os estudos incluídos na meta-análise deveriam ser originais apresentando média e uma medida de dispersão das variáveis de interesse. Se não presentes no artigo, os desvios padrão de cada estudo foram calculados através das medidas de variabilidade apresentadas nos artigos. Apenas estudos que apresentarem resultados para um grupo controle e tratamento (suplementação com malato) foram considerados. Experimentos independentes, apresentados em um mesmo artigo, foram incluídos como uma nova comparação. Tratamentos onde foram utilizadas combinações com malato também foram incluídos como comparações separadas. Da mesma forma, diferentes doses de malato em um mesmo experimento foram incluídos como uma nova comparação.

As informações incluídas foram relacionadas a estudo, periódico, ano, delineamento, dose, relação volumoso:concentrado, composição química da ração, consumo de matéria seca (MS), raça, peso inicial, entre outras. Se não presente nos artigos, a composição das dietas foi calculada. Assim, apenas foram incluídos estudos contendo a composição química das dietas ou que forneceram informações que permitissem estimá-la. As variáveis de interesse incluídas na análise foram aquelas relacionadas ao desempenho, características de carcaça, digestibilidade de frações da dieta, balanço de nitrogênio e parâmetros ruminais, totalizando 22 variáveis. Na versão final da base de dados estão presentes 12 artigos que possibilitaram até 19 comparações.

O efeito da adição do malato foi avaliado através do método do TE. O TE foi calculado como a diferença entre o grupo tratamento (malato) e o grupo controle dividida pelo desvio padrão agrupado. O efeito médio da suplementação com ácido málico ou malato foi calculado

a partir de um modelo de efeitos aleatórios A heterogeneidade foi verificada através do teste Q de Cochran, utilizando a estatística  $I^2$  para determinar quanto da variabilidade total (%) ocorreu em função da variabilidade entre estudos (HIGGINS & THOMPSON, 2003).

A análise de meta-regressão foi usada para explorar os efeitos lineares de covariáveis apontadas na literatura como possíveis fontes de variabilidade dos resultados observados. A análise foi realizada somente quando as variáveis de interesse possuíam ao menos 10 comparações e heterogeneidade significativa ( $P < 0.05$ ) Foram testadas as seguintes variáveis explicativas: consumo de forragem (g/dia), consumo de concentrado (g/dia), consumo de proteína bruta (g/dia e g/kg PV), consumo de FDN (g/dia e g/kg PV), consumo de FDA (g/dia e g/kg PV), consumo de amido (g/dia e g/kg PV), consumo de extrato etéreo (g/dia e g/kg PV) e de malato (g/dia e g/kg PV).

Forest plots foram utilizados para apresentar, graficamente, o tamanho de efeito médio e intervalo de confiança. Neste representação gráfica, o losango apresentado ao final da imagem indica o efeito de uma variável independente Y sobre a dependente X, determinado a partir dos resultados da análise de todos os estudos e seus respectivos pesos. A análise “leave one out” foi utilizada como teste de sensibilidade. Todas as análises foram realizadas através do pacote estatístico OpenMetaAnalyst.

## Resultados

### *Performance e características de carcaça*

Não foi detectado efeito da suplementação com malato sobre as variáveis consumo de matéria seca (CMS) e peso final (PF) (Tabela 1). Entretanto, os tamanhos de efeito para ganho médio diário (GMD) e conversão alimentar (CA) foram alterados pela inclusão do ácido orgânico na dieta (Figura 1). Com exceção da variável PF, os resultados para heterogeneidade foram significativos, com valores de  $I^2$  variando de 30 a 70%. A análise de meta-regressão demonstrou que a dose de malato (g/kg PV) diminuiu significativamente o tamanho do efeito observado para o GMP, enquanto aumentou para a CA (Figura 2).

O peso de carcaça quente e o rendimento de carcaça não foram influenciados pela adição de malato (Tabela 1) e são resultado da meta-análise de 4 trabalhos que totalizaram 6 comparações. A heterogeneidade não foi significativa para ambas as variáveis, conforme indicado pelo valor nulo para a estatística  $I^2$ .

### *Digestibilidade de nutrientes*

O efeito da suplementação com malato sobre a digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica, proteína ( $CP_{DIG}$ ), fibra em detergente neutro ( $NDF_{DIG}$ ), fibra em detergente ácido e energia bruta estão apresentados na tabela 1. Os forest plots apresentados na figura 3 representam o efeito desta suplementação sobre a  $MO_{Dig}$  e  $NDF_{DIG}$ . Não foi observado efeito sobre nenhuma das variáveis, entretanto a estatística  $I^2$  oscilou de 70 a 90%, indicando que a variação entre estudos representou uma porção considerável da variação total observada. A análise de meta-regressão determinou que a ingestão de amido (g/kg PV) reduziu significativamente o efeito do malato sobre a  $MO_{Dig}$ . Para  $CP_{DIG}$  e  $NDF_{DIG}$  nenhuma das covariáveis testadas apresentou resultados significativos, embora a ingestão de amido (g/kg PV) tenha mostrado tendência de redução do efeito observado.

#### *Balanco de nitrogênio*

Os resultados obtidos para as variáveis que compõem o balanço de nitrogênio (N) estão apresentados na tabela 1 e indicaram que a suplementação de malato não altera o consumo de N, o N nas fezes, o N na urina e, por consequência, o balanço de N. Os valores da estatística  $I^2$  indicam a presença de substancial heterogeneidade. Entretanto, em função do número reduzido de estudos, a meta-regressão não foi aplicada para as variáveis relacionadas ao consumo e metabolismo de N.

#### *Parâmetros ruminais*

Na tabela 1, estão apresentadas as estimativas de efeito da suplementação com malato sobre a produção de ácidos graxos voláteis, pH e N amoniacal ( $NH_3N$ ) de cordeiros. De acordo com a meta-análise, o pH dos animais suplementados apresentam valores significativamente maiores quando comparados ao controle ( $TE= 0.364$ ;  $P=0.017$ ), com baixos valores de heterogeneidade ( $I^2=26.47$ ;  $P= 0.177$ ). Não foi possível observar efeitos sobre a presença de acetato e propionato no rúmen, entretanto, o butirato foi significativamente menor quando os animais consumiram malato ( $TE= -0.657$ ,  $P= 0.022$ ). A presença de AGV total foi significativamente maior para os animais do grupo malato, com um tamanho de efeito de 0.543 ( $P= 0.017$ ), com heterogeneidade não significativa ( $I^2= 0.00$ ;  $P= 0.569$ ). O efeito do malato sobre o  $NH_3N$  não foi significativo, resultado que apresentou valores significativos de heterogeneidade ( $I^2= 57.16$ ;  $P= 0.03$ ).

## Discussão

### *Performance e características de carcaça*

Quanto aos resultados observados para CMS, a hipótese inicial era de que a suplementação com malato poderia implicar na redução da ingestão em função, principalmente, da baixa palatabilidade associada ao produto (EL-ZAIAT et al, 2019). Entretanto, em nosso estudo foi observada apenas uma tendência indicando essa redução (ES=-0.225; P=0.073). Esta resposta está de acordo com aquela observada por Mungó et al (2012), Elmali et al. (2012) e Loya-Olguin et al. (2019). Adicionalmente, o valor encontrado para  $I^2$  (26.60) é considerado de pouca importância. De acordo com Higgins & Thompson (2003), o valor da estatística  $I^2$  indica a porcentagem da variabilidade nas estimativas de efeito que ocorre devido à heterogeneidade.

O aumento no GMD observado nos animais do grupo malato está de acordo com os obtidos por (PEREZ et al., 2004). O maior GMD é um dos resultados pretendidos pela suplementação com malato pois este está associado ao aumento da produção de AGV no rúmen, o que pode impactar no ganho (KOZLOSKI, 2011). O tamanho de efeito observado para GMD foi 0.418, de acordo com Higgins & Thompson (2003) valores de ES entre 0 e 0.2 são considerados irrisórios, enquanto aqueles entre 0.2 e 0.8 são moderados. A heterogeneidade indicou, através do valor de  $I^2$ , que 58.51% da variabilidade observada ocorre em função da variabilidade entre estudos. Valores de heterogeneidade superiores a 50% são considerados valores substanciais e estão passíveis de serem investigados por meta-regressão (COHEN, 1988). Esta análise indicou que o efeito do malato sobre o GMD é reduzido conforme a ingestão de malato (g/kg PV) aumenta. Uma das hipóteses possíveis é de que existe uma faixa de ingestão de malato onde seu efeito atinge um platô. Entretanto, o que se percebe é que após este platô existem faixas de consumo onde seu efeito é reduzido. Esse resultado vai ao encontro dos obtidos por Streeter et al. (1994) que observou melhores resultados para GMD para os animais que receberam doses intermediárias (60, 80 e 120g/dia). Ao menos numericamente, o mesmo efeito quadrático pode ser observado nos estudos de Carro et al (2006) e Elmali et al (2012).

O efeito observado da suplementação de malato sobre a CA de cordeiros (Figura 1) está de acordo com os obtidos por Perez (2004). Entretanto, esta é a primeira vez que o resultado é obtido por meta-análise. A redução da CA é um resultado esperado, considerando os efeitos observados para CMS e, principalmente, GMD. O tamanho de efeito foi -0.604 (p=0.016), resposta moderada que pode ser entendida como a média do grupo malato sendo 0.604 desvio padrão menor que a controle (COHEN, 1988). A heterogeneidade para esta variável foi de 70.54%. De acordo com Higgins & Thompson (2003), variáveis com valores significativos,

podem ser submetidas a análises de sensibilidade como formação de subgrupos ou meta-regressão. Assim como para GMD, a ingestão de malato (g/kg PV), foi significativa e atuaria aumentando CA dos cordeiros em função do aumento no consumo de malato (Figura 2).

O tamanho de efeito obtido foi de 0.096, 0.045 e -0.030 para peso final (PF), peso de carcaça quente (PCC) e rendimento de carcaça (RC), respectivamente. Os resultados observados para essas variáveis estão de acordo com os obtidos por Carro (2006), Toprak et al (2012) e Loya-Olguin et al (2019). Tais valores, mesmo que fossem significativos seriam considerados irrisórios. As variáveis apresentaram heterogeneidade baixa, demonstrando que os dados são homogêneos e que não houveram covariáveis interferentes sobre o efeito observado. Em função disso, a análise de meta-regressão não foi aplicada.

#### *Digestibilidade de componentes*

A inclusão de malato não influenciou a digestibilidade de nenhuma das variáveis testadas. Esse resultado vai ao encontro daqueles descritos por Carro et al (2006) e Elmali et al (2012). Entretanto, um dos fatores que levaram o malato a ser testado em dietas de ruminantes foi sua capacidade de aumentar o desaparecimento de matéria orgânica demonstrada nos testes *in vitro* (CARRO et al., 1999). Uma das hipóteses sugeridas por Carro (2006) é que o aproveitamento pós-ruminal acabe anulando os prováveis efeitos positivos que ocorreriam no rúmen. A heterogeneidade observada para estas frações variou de 62 a 94%. Assim, aquelas variáveis com 10 ou mais comparações foram submetidas a meta-regressão (Tabela 2). A análise indicou que o consumo de amido (g/kg PV) reduz significativamente o efeito do malato sobre a  $MO_{DIG}$  enquanto apresentou tendência em reduzir o efeito sobre a  $PB_{DIG}$  e  $FDN_{DIG}$ . De acordo com Luo et al (2017), o aumento na quantidade de amido degradável no rúmen de 62 para 72% é capaz de reduzir a digestibilidade da proteína, FDN, FDA, além de apresentar tendência de redução para MO. Essa é uma informação importante uma vez que a média de concentrado na dieta dos cordeiros foi de 89.81%, chegando a 95% em alguns casos.

#### *Balanço de nitrogênio*

Nenhum efeito foi observado nas variáveis relacionadas ao balanço de N em função da suplementação com malato. Essa resposta está de acordo com a obtida por Carro et al. (2006). Os resultados apresentaram alta heterogeneidade, resultado que pode estar associada ao baixo número de comparações. O baixo número estudos também foi um fator impeditivo para a realização da meta-regressão.

#### *Parâmetros ruminais*

Os resultados observados para o pH ruminal estão de acordo com aqueles obtidos por Perez (2004). De acordo com Nisbet e Martin (1991), a suplementação com malato aumenta a captação de lactato pelas bactérias *Selenomonas ruminantium*, levando a um aumento gradual do pH. O forest plot (Figura 5) indica que o efeito do malato sobre o pH foi moderado, com heterogeneidade não significativa ( $I^2$  26.47).

A produção total de ácidos graxos voláteis (AGV) também foi aumentada nos animais do grupo malato. O tamanho de efeito foi de 0.503, conforme indicado na figura 6 (D). Tais resultados tinham sido demonstrados apenas *in vitro* (CALLAWAY & MARTIN, 1996), embora tendências tenham sido obtidas por Gonzales-Momita et al (2009). As bactérias *S. ruminantium* são capazes de converter lactato em propionato, contanto que haja presença de malato (CARRO et al., 1999). Além disso, o ácido orgânico atuaria na via do succinato, captando  $H^+$  do ambiente ruminal para produzir propionato, aumentando os AGVs totais (CALLAWAY & MARTIN, 1996). Entretanto, não foi possível confirmar o efeito do malato sobre a produção deste AGV (Figura 6 C), bem como do acetato (Figura 6 A). Apenas a produção de butirato (Figura 6 B) foi diminuída pela suplementação com malato. Esse resultado vai de encontro aos obtidos em experimentos *in vitro* (CARRO & RANILLA, 2003; GÓMEZ et al., 2005) e também *in vivo* (CARRO et al., 2006), embora não existam rotas de fermentação do malato para butirato.

### Conclusão

A suplementação com malato aumenta o ganho médio diário e diminui a conversão alimentar de cordeiros, sendo esse efeito reduzido em função de elevadas doses de malato. A adição desse ácido orgânico não afeta a digestibilidade das frações da dieta, a meta-regressão indicou que a ingestão de amido foi um dos fatores interferentes para esse resultado. Ainda, a presença de malato aumentou a produção de ácidos graxos voláteis totais e é capaz de elevar o pH ruminal de cordeiros.

### Referências bibliográficas

CALLAWAY, T. R., MARTIN, S. A. Effects of organic acid and monensin treatment on *in vitro* mixed ruminal microorganism fermentation of cracked corn. **Journal of Animal Science**, Oxford, v. 74, n. 8, p. 1982-1989, ago. 1996. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/74/8/1982/4637414>. Acesso em: 9 fev. 2022.

- CARRO, M. D. et al. Effect of DL-malate on mixed ruminal microorganism fermentation using the rumen simulation technique (RUSITEC). **Animal Feed Science and Technology**, v. 79, n. 1, p. 279-288, 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0377840199000346>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- CARRO, M. D., RANILLA, M. J. Effect of the addition of malate on in vitro rumen fermentation of cereal grains. **British Journal of Nutrition, Cambridge**, n. 89, n. 1, p. 181-188, 2003. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/British-journal-of-nutrition/article/25B1D019BD212C1BC7BDB65DA3C20BC3>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- CARRO, M. D. et al. Effects of malate on diet digestibility, microbial protein synthesis, plasma metabolites, and performance of growing lambs fed a high-concentrate diet, **Journal of Animal Science, Oxford**, v. 84, n. 2, p. 405–410, 2006. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/84/2/405/4804191>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- CASTILLO, C. et al. Organic acids as a substitute for monensin in diets for beef cattle. **Animal Feed Science Technology**, v. 115, n. 1, p. 101–116, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0377840104000355>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- CUESTA, A. et al. Efecto de la inclusión de malato en el pienso de corderos en cebo, sobre la ingestión, la digestibilidad y el rendimiento productivo. **ITEA**, Zaragoza, v. 24, n. 2, p. 762-764, 2003. Disponível em: <https://digital.csic.es/handle/10261/13793>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- ELMALI1, A. D. et al. Effects of supplementation with different amounts of malic acid to Tuj lambs diets on fattening performance, rumen parameters and digestibility. **Revue de édecine Vétérinaire**, v. 163, n. 2, p. 70-75, 2012. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/286550673>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- GÓMEZ-VÁZQUEZ, A. et al. Fibrolitic exogenous enzymes improve performance in steers fed sugar cane and stargrass. **Livestock Production Science**, n. 82, v. 1-2, p. 249-254, 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0301622603000162>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- GONZALEZ-MOMITA, M. L., et al. Nutrient intake, digestibility, mastication and ruminal fermentation of Pelibuey lambs fed finishing diets with ionophore (monensin or lasalocid) and sodium malate, **Small Ruminant Research**, v. 83, n. 1–3, p. 1-6, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0921448808002393>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- HIGGINS, J. P., THOMPSON, S, G. Measuring inconsistency in meta-analyses. **The BMj**, v. 327, v. 1, p. 557-560, 2003. Disponível em: <https://www.bmj.com/content/327/7414/557>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica de ruminantes**. 3 ed. Santa Maria: UFSM, 2011. 216p
- LOVATTO, P. A., et al. Meta-análise em pesquisas científicas: enfoque em metodologias. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, suplemento, p. 285-294, 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbz/a/TxB6XwXygrfKhPTmyyYMJrd/?lang=pt>. Acesso em: 9 fev. 2022.

LOYA-OLGUIN, J. L. et al. DL-malic acid supplementation improves the carcass characteristics of finishing Pelibuey lambs. **Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias**, Mérida, v. 10, n. 2, p. 460-472, 2019. Disponível em: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-11242019000200460](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242019000200460). Acesso em: 9 fev. 2022.

LUO, G. et al. Effects of ruminally degradable starch levels on performance, nitrogen balance, and nutrient digestibility in dairy cows fed low corn-based starch diets. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 30, n.5, p. 653–659. 2017. Disponível em: <https://www.animbiosci.org/journal/view.php?doi=10.5713/ajas.16.0371>. Acesso em: 9 fev. 2022.

MALEKKHAHI, M, et al. Effects of essential oils, yeast culture and malate on rumen fermentation, blood metabolites, growth performance and nutrient digestibility of Baluchi lambs fed high-concentrate diets. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, n. 99, v. 2, p. 221-229, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jpn.12230>. Acesso em: 9 fev. 2022.

MOHARRERY, A., ASADI, E. Effects of supplementing malate and yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on the rumen enzyme profile and growth performance of lambs. **Journal of Animal and Feed Science**. Jablonna, v. 18, n. 2, p. 283-295, 2009. Disponível em: <http://www.jafs.com.pl/10.22358/jafs/66393/2009>. Acesso em: 9 fev. 2022.

MUNGÓI, M. et al. Effect of malate and starch source on digestibility and nutrient balance of growing-fattening lambs, **Animal Feed Science and Technology**, v. 174, n. 3–4, p. 154-162, 2012. Disponível em: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-11242019000200460](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242019000200460). Acesso em: 9 fev. 2022.

NISBET, D. J., S. A. MARTIN. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* culture on lactate utilization by the ruminal bacteria *Selenomonas ruminantium*. **Journal of Animal Science**, Oxford, v. 69, n.11, p. 4628- 4633, 1991. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/69/11/4628/4654491>. Acesso em: 9 fev. 2022.

TOPRAK, N. N. Effects of malate supplementation to the concentrate feed on performance, rumen fermentation and carcass yield of lambs fed forage at restricted and ad-libitum level. Ankara, **Ankara Üniv Vet Fak Derg**, v. 66, n. 1, p. 73-81, 2019. Disponível em: <http://vetjournal.ankara.edu.tr/en/download/article-file/836221>. Acesso em: 9 fev. 2022.

Tabela 1 – Resumo da meta-análise (tamanho do efeito) da suplementação com malato em cordeiros

Trait	Studies	ES(CI)	p-value	I <sup>2</sup>	Het p-value
<i>Performance</i>					
Dry matter intake	19	-0.225 (-0.472; 0.021)	0.073	26.60	0.139
Average daily gain	15	0.418 (0.030; 0.805)	0.035	58.51	0.002
Feed conversion ratio	14	-0.604 (-1.096; -0.111)	0.016	70.54	0.001
Final weight	17	0.096 (-0.119; 0.312)	0.380	0.00	0.995
<i>Carcass traits</i>					
Hot carcass weight	6	0.045 (-0.357; 0.447)	0.830	0.00	0.826
Dressing	6	-0.030 (-0.432; 0.372)	0.880	0.00	0.842
<i>Nutrient digestibility</i>					
Dry matter	9	0.512 (-0.174; 1.197)	0.144	73.68	0.001
Organic matter	10	0.617 (-0.193; 1.427)	0.135	81.21	0.001
Protein	11	0.357 (-0.153; 0.866)	0.179	62.04	0.003
Neutral detergent fiber	10	-0.054 (-0.935; 0.827)	0.904	85.75	0.001
Acid detergent fiber	7	-0.936 (-2.418; 0.546)	0.216	91.06	0.001
Energy	4	-0.244 (-2.413; 1.925)	0.825	93.87	0.001
<i>Nitrogen balance</i>					
Nitrogen intake	6	0.431 (-0.371; 1.232)	0.293	75.02	0.001
Nitrogen in feces	6	-0.221 (-0.914; 0.470)	0.532	67.58	0.009
Nitrogen in urine	8	0.065 (-0.286; 0.397)	0.703	0.00	0.592
Nitrogen retention	8	0.380 (0.276; 1.036)	0.256	71.68	0.001
<i>Ruminal parameters</i>					
pH	13	0.364 (0.065; 0.663)	0.017	26.47	0.177
Acetate	6	-0.081 (-0.506; 0.343)	0.707	6.15	0.377
Butyrate	6	-0.657 (-1.219; -0.094)	0.022	42.16	0.124
Propionate	6	-0.233 (-1.096; 0.631)	0.597	74.67	0.001
Acetate:propionate	6	-0.161 (-1.307; 0.984)	0.783	84.38	0.001
Total VFA	6	0.543 (0.097; 0.909)	0.017	0.00	0.569
NH <sub>3</sub> N	7	-0.503 (-1.165; 0.159)	0.137	57.16	0.030

Tabela 2 – Meta-regressão do efeito da suplementação com malato sobre o desempenho de cordeiros

Covariável		ADG	FCR	OM digestibility	CP digestibility	NDF digestibility
CP	g/dia	0.274+0.001x	0.246-0.005x	-1.415+0.011x	-1.462+0.012x	1.353-0.010x
	g/kg bw	0.327+0.010x	1.107-0.103x	0.818-0.043x	0.356+0.000x	2.080-0.235x
NDF	g/dia	0.533-0.001x	-1.105+0.001x	0.222+0.001x	0.605-0.001x	-0.059+0.005x
	g/kg bw	0.602-0.018x	-1.180+0.054x	0.708-0.030x	1.731-0.102x	-0.154+0.009x
ADF	g/dia	0.453-0.000x	-1.073+0.004x	0.271+0.002x	0.559-0.002x	-0.517+0.006x
	g/kg bw	0.422-0.003x	-0.998+0.082x	0.383+0.005x	0.719-0.076x	-0.391+0.072x
Starch	g/dia	1.115-0.002x	-0.515-0.000x	2.844-0.006x	1.003-0.002x	3.139-0.008x
	g/kg bw	1.011-0.025x	-0.515-0.000x	3.348-0.112x*	0.841-0.029x <sup>T</sup>	2.265+-0.097x <sup>T</sup>
EE	g/dia	0.755-0.011x	-0.192 -0.013x	-0.260+0.023x	0.129+0.008x	1.117-0.046x
	g/kg bw	0.739-0.154x	0.931-0.479x	0.792-0.223x	0..585-0.140x	1.458-0.954x
Dose	g/dia	0.850-0.110x	-1.504+0.207x*	0.709-0.087x	0.806-0.113x	-0.415+0.102x
	g/kg bw	1.026-3.097x*	-1.412+3.880*	0.942-2.659x	1.059-3.352x	-0.122+0.298x

\*p<0.05; <sup>T</sup> tendência (p-value entre 0.05 e 0.1); CP, Crude Protein; NDF, Neutral detergent fiber; ADF, Acid detergent fiber; EE, Ether extract; ADG, Average daily gain; FCR, Feed conversion ratio. OM, Organic matter

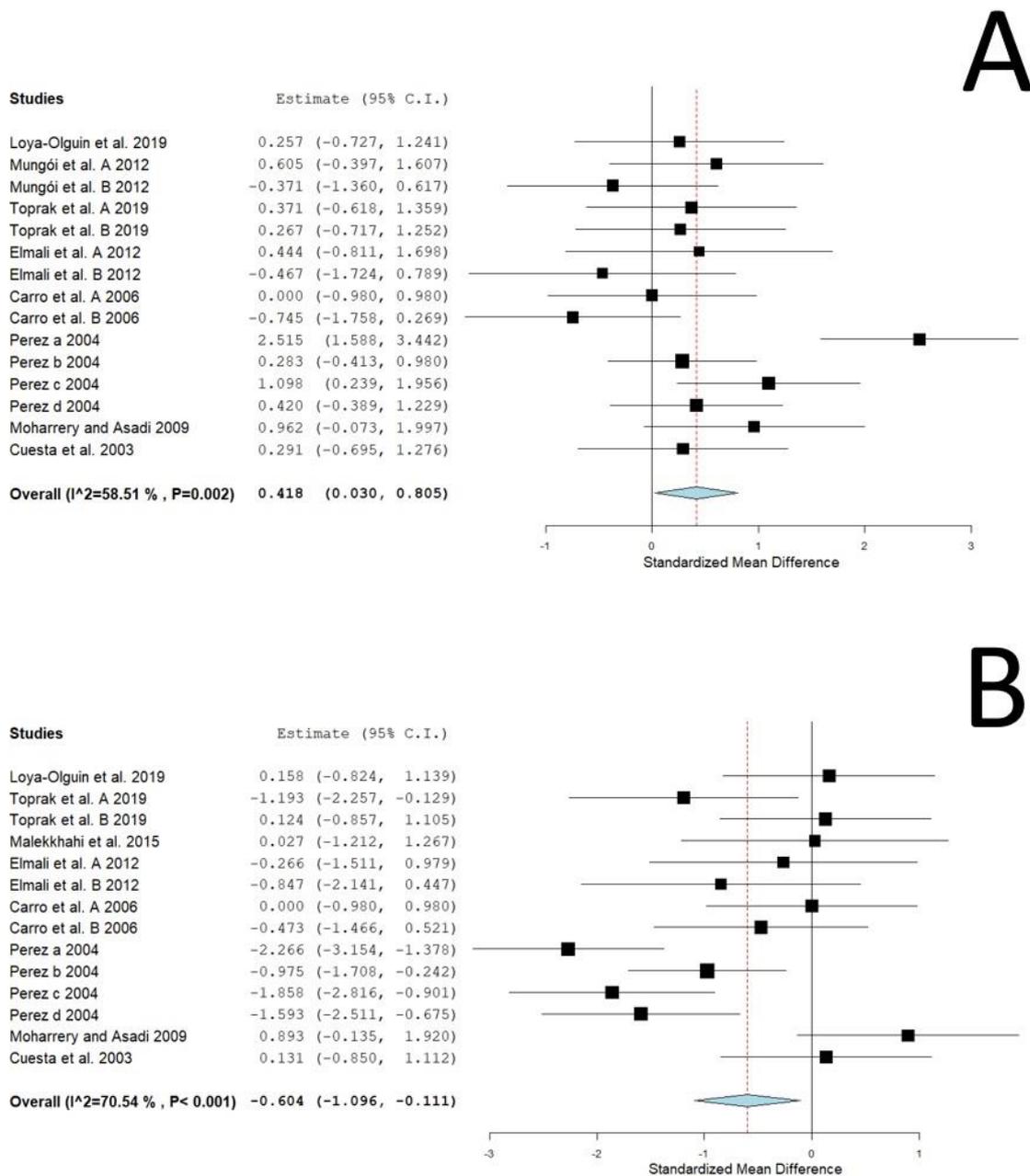


Figura 1 – Forest plot do efeito da suplementação com malato sobre o ganho de peso (A) e conversão alimentar (B) de cordeiros. Quando o losango se apresentou à esquerda da linha central (média padronizada) sem tocá-la, considerou-se que o efeito foi negativo, favorecendo o controle. Quando apresentado à direita da linha central, considerou-se o efeito como positivo, em favor do malato.

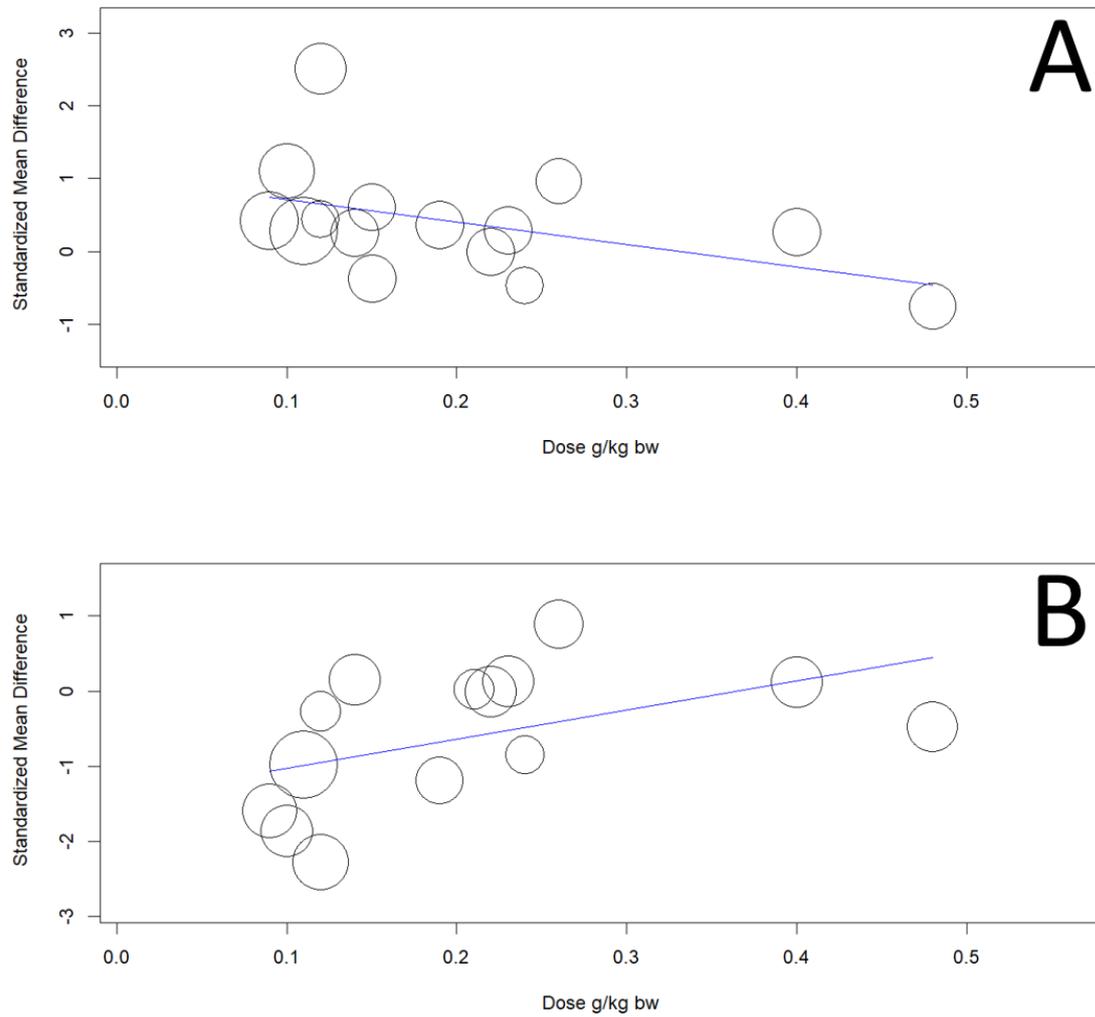


Figura 2 – Meta-regressão do efeito da ingestão de malato (g/kg PV) sobre a diferença média padronizada da suplementação com malato sobre ganho de peso (A) e conversão alimentar (B) em cordeiros.

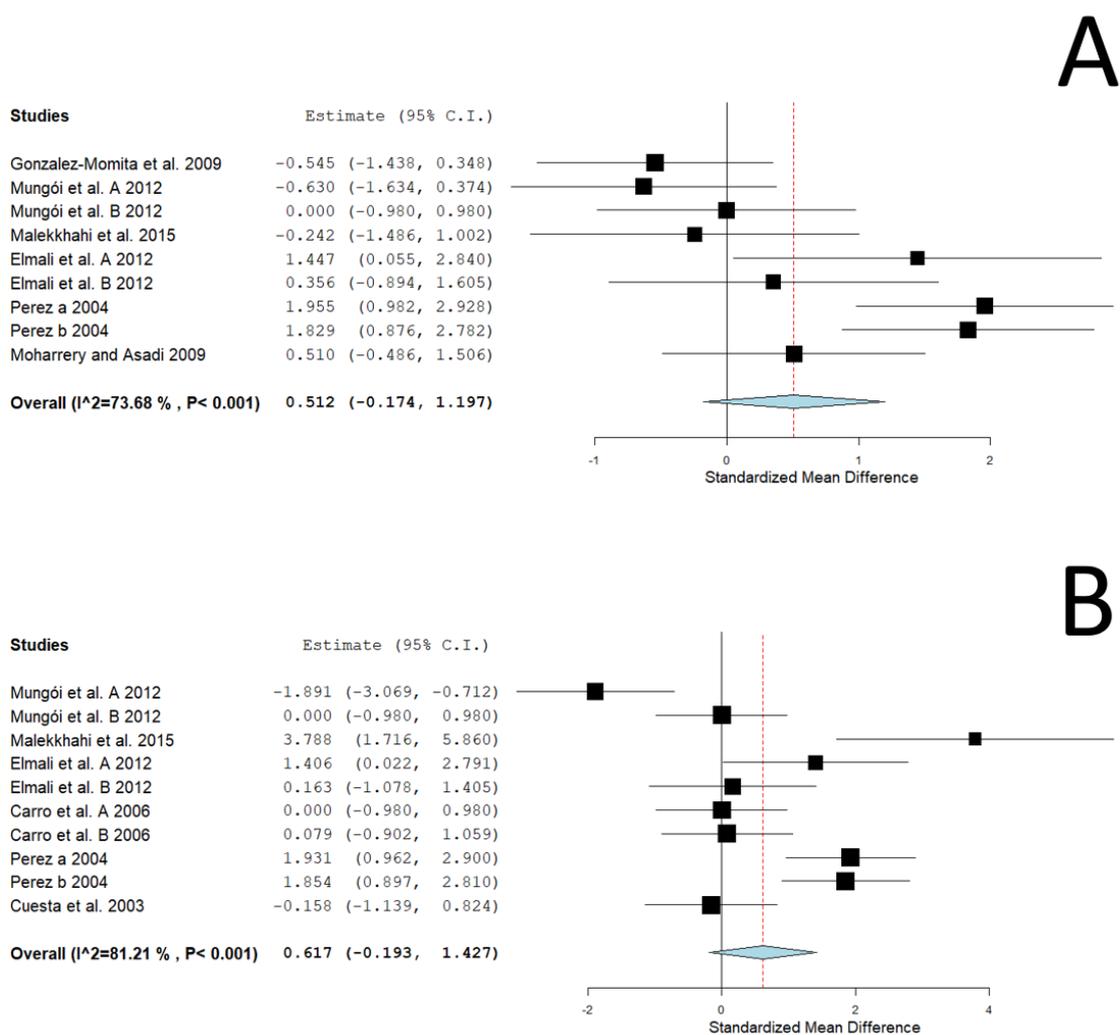


Figura 3 – Forest plot do efeito da suplementação com malato sobre a digestibilidade da matéria seca (A) e matéria orgânica (B) em cordeiros. Quando o losango se apresentou à esquerda da linha central (média padronizada) sem tocá-la, considerou-se que o efeito foi negativo, favorecendo o controle. Quando apresentado à direita da linha central, considerou-se o efeito como positivo, em favor do malato.

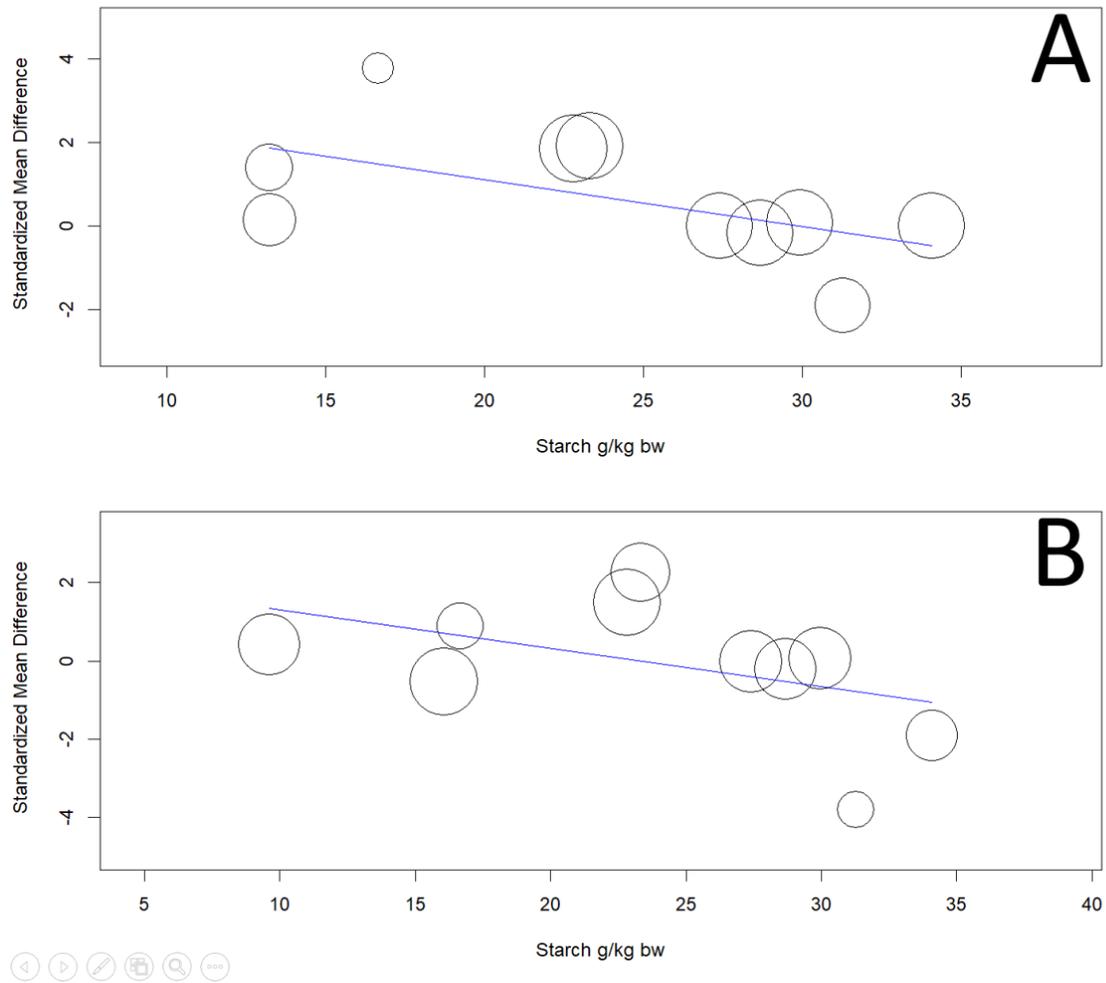


Figura 4 – Meta-regressão do efeito da ingestão de amido (g/kg PV) sobre a diferença média padronizada da suplementação com malato sobre a digestibilidade da matéria orgânica (A) e fibra em detergente neutro (B) em cordeiros.

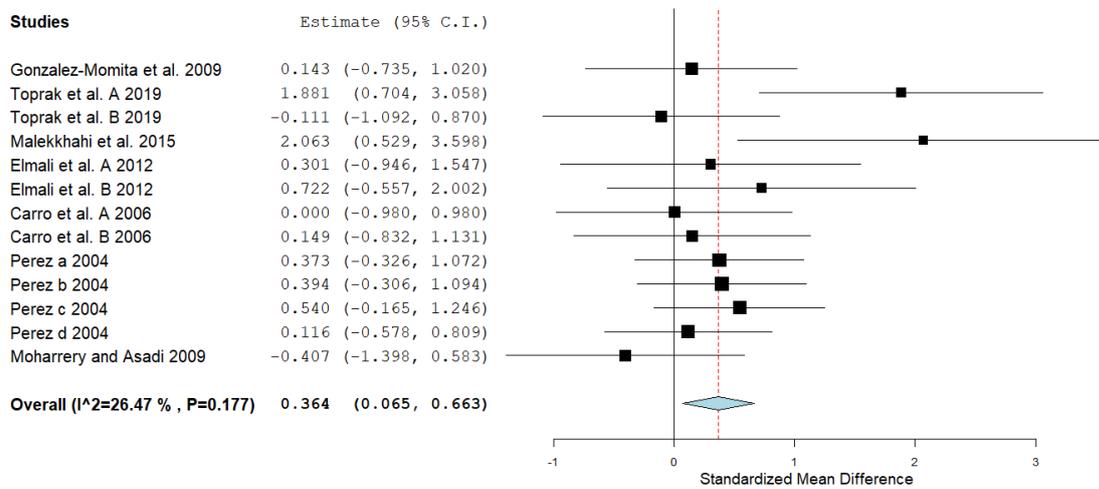


Figura 5 – Forest plot do efeito da suplementação com malato sobre o pH ruminal de cordeiros. Quando o losango se apresentou à esquerda da linha central (média padronizada) sem tocá-la, considerou-se que o efeito foi negativo, favorecendo o controle. Quando apresentado à direita da linha central, considerou-se o efeito como positivo, em favor do malato.

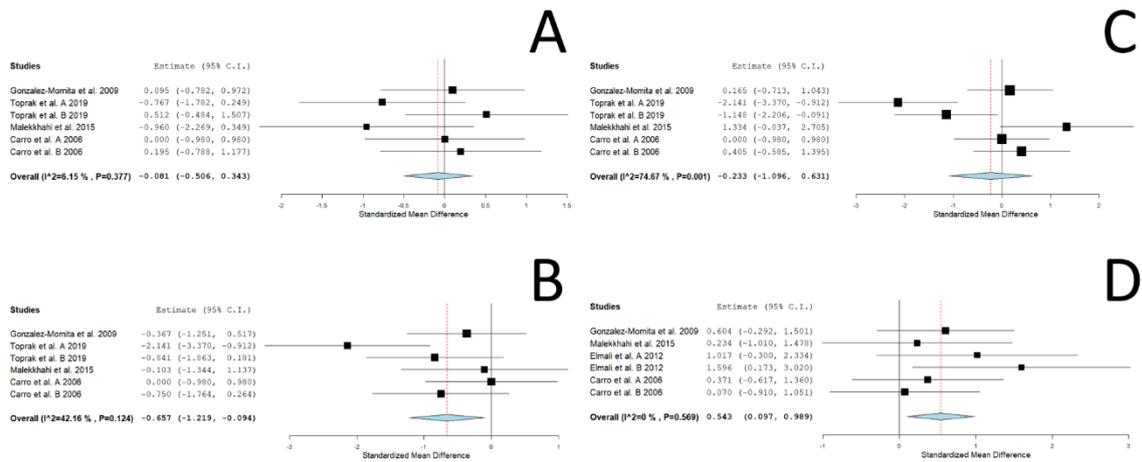


Figura 6 – Forest plot do efeito da suplementação com malato sobre a presença de acetato (A) e butirato (B), propionato (C) e ácidos graxos voláteis totais (D). Quando o losango se apresentou à esquerda da linha central (média padronizada) sem tocá-la, considerou-se que o efeito foi negativo, favorecendo o controle. Quando apresentado à direita da linha central, considerou-se o efeito como positivo, em favor do malato.

## 6. ARTIGO 3 META-ANÁLISE E META-REGRESSÃO DO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDO MÁLICO OU MALATO SOBRE PARÂMETROS RUMINAIS, DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES E PARÂMETROS SANGUÍNEOS DE BOVINOS

Leonardo Tombesi da Rocha; Julio Viégas; Tiago João Tonin; Larissa Schumacher, Stela Naetzold Pereira

### Resumo

O objetivo desse estudo foi determinar, através de meta-análise, os efeitos da suplementação com ácido málico/malato sobre parâmetros ruminais, sanguíneos e sobre a digestibilidade de frações da dieta de bovinos. O efeito da adição do ácido málico/malato foi avaliado através do método do tamanho de efeito (TE), através de um modelo de efeitos aleatórios. Foram realizadas duas análises de sensibilidade: subgrupos e meta-regressão. Os grupos utilizados foram: ácido, animais suplementados com ácido málico; e sal, para animais suplementados com malato. Para a análise de meta-regressão foram testadas covariáveis relacionadas ao consumo das principais frações da dieta. O tamanho do efeito (TE) sobre o pH foi significativo quando foi utilizado o malato, que é a forma de sal do produto (TE= 1.420, IC 0.558; 2.282; P<0.01). A heterogeneidade foi elevada e significativa (P<0.01). A meta-regressão, indicou que o consumo de fibra em detergente neutro (FDN) (g/kg PV) foi significativa (SMD=2.063 -0.051x, P<0.05). A produção de ácidos graxos voláteis totais (AGVs) e propionato foi maior nos animais suplementados, sendo o consumo de amido (g/kg PV) apontado como uma das covariáveis interferentes pela meta-regressão (SMD= -1.033 +0.042x; P<0.05). A relação acetato:propionato foi menor para o grupo suplementado (TE=-1.130; P<0.01), a heterogeneidade foi significativa (I<sup>2</sup>= 81.68, P<0.01), sendo o consumo de amido apontado como responsável pela variação (SMD=-7.483 +0.156x; P<0.01). A glicose no plasma foi afetada pela suplementação (TE= 0.170; P<0.05) com heterogeneidade não significativa (P>0.10). Os ácidos graxos não esterificados (AGNE) foram menores nos animais suplementados (TE=-0.404; P<0.05). A digestibilidade da matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e FDN foram influenciadas pelos tratamentos TE=0.547; 0.422 e 0.635 para MS, PB e FDN, respectivamente. Apesar As covariáveis testadas pela meta-regressão não apresentaram significância para essas variáveis. A suplementação com malato/ácido málico aumenta o pH ruminal. a AGVs, principalmente em função da maior produção de propionato no rúmen. Além disso, aumenta a digestibilidade da MS, FDN e PB, além de aumentar a glicose e diminuir o nível de AGNE no plasma sanguíneo. As covariáveis relacionadas a dieta, utilizadas para

análise de meta-regressão, foram importantes para explicar a heterogeneidade dos resultados relacionados diretamente a fermentação ruminal, mas não para esclarecer a variabilidade associada a digestibilidade e parâmetros sanguíneos.

**Palavras-chave:** Ácido orgânico. Glicose. pH ruminal. Propionato.

### Abstract

The aim of this study was to determine, through meta-analysis, the effects of malic acid/malate supplementation on ruminal and blood parameters and diet digestibility on cattle. The effect of malic acid/malate addition was evaluated using the effect size (ES) method, using a random effects model. Two sensitivity analyzes were performed: subgroups and meta-regression. The groups used were: acid, animals supplemented with malic acid; and salt, for animals supplemented with malate. For the meta-regression analysis, covariates related to the consumption of the main fractions of the diet were tested. The ES on pH was significant when malate, which is the salt form of the product, was used (TE=1.420, IC 0.558; 2.282; P<0.01). Heterogeneity was high and significant (P<0.01). Meta-regression indicated that neutral detergent fiber (NDF) intake (g/kg BW) was significant (SMD=2.063 -0.051x, P<0.05). The production of total volatile fatty acids (VFAs) and propionate was higher in the supplemented animals, with starch consumption (g/kg BW) pointed out as one of the interfering covariates by the meta-regression (SMD= -1.033 +0.042x; P< 0.05). The acetate:propionate ratio was lower for the supplemented group (ES=-1.130; P<0.01), heterogeneity was significant ( $I^2= 81.68$ , P<0.01), and starch consumption was pointed out as responsible for the variation (SMD=- 7.483 +0.156x; P<0.01). Plasma glucose was affected by supplementation (ES=0.170; P<0.05) with non-significant heterogeneity (P>0.10). Non-esterified fatty acids (NEFA) were lower in supplemented animals (ES=-0.404; P<0.05). Dry matter (DM), crude protein (CP) and NDF digestibility were influenced by treatments ES=0.547; 0.422 and 0.635 for DM, CP and NDF, respectively. Despite The covariates tested by meta-regression did not show significance for these variables. Supplementation with malate/malic acid increases rumen pH. to VFAs, mainly due to the higher production of propionate in the rumen. In addition, it increases the digestibility of DM, NDF and CP, as well as increasing glucose and decreasing the level of NEFA in blood plasma. Diet-related covariates used for meta-regression analysis were important to explain the heterogeneity of results directly related to rumen fermentation, but not to clarify the variability associated with digestibility and blood parameters.

**Keywords:** Glucose. Organic acid. Propionate. Ruminal pH

## Introdução

Em função da limitação do uso de ionóforos em dietas para ruminantes, diversos produtos foram testados na tentativa de reproduzir os efeitos positivos que eram possibilitados pela utilização destes antimicrobianos. Dentre as alternativas testadas estão os ácidos orgânicos (AO), ácidos carboxílicos de cadeia curta e que são constituintes naturais de organismos vivos.

Dentre os AO que apresentam potencial para utilização em dietas para ruminantes, destaca-se o ácido málico ( $M_{ACD}$ ). Essa substância, que está presente em animais e plantas como um dos intermediários do ciclo do ácido cítrico, apresenta resultados bastante promissores. Respostas obtidas *in vitro* indicam que esse AO é capaz de aumentar a captação de lactato, aumentar a produção de ácidos graxos voláteis (AGV) (especialmente propionato), além de melhorar a digestibilidade de frações da dieta e reduzir a produção de metano (FOLEY et al., 2009; EL-ZAIAT et al., 2019).

Em experimentos *in vivo* este AO foi capaz de aumentar a presença de AGV no rúmen (KUNG et al., 1982; KHAMPA et al., 2006). Liu et al (2009) observaram aumento da presença de propionato e butirato, além de redução linear do lactato presente no rúmen. Aumento do pH ruminal foi efeito descrito por Martin et al (1999). Além disso, aumento na digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica e proteína foram observadas por El-Zaiat et al (2019). Ainda, alterações importantes em parâmetros sanguíneos foram observados por Wang et al (2006).

Entretanto, os resultados dos testes realizados com animais não são homogêneos. A presença ou ausência de um determinado efeito geralmente é atribuída pelos autores a interações com a dieta fornecida ou com a forma química do AO. Especula-se que a ingestão de frações como amido ou aquelas relacionadas a fibra possa levar a resultados conflitantes. Concomitantemente, a forma química de suplementação também é uma provável fonte de variabilidade, já que o AO pode ser fornecido na forma de ácido (ácido málico) ou sal (malato).

A utilização de meta-análise, ferramenta estatística que permite sumarizar resultados de diversos experimentos em uma única estimativa de efeito, pode possibilitar a determinação do real efeito destes AO sobre as variáveis de interesse. Além disso pode determinar, através de análises de sensibilidade como a utilização de subgrupos e meta-regressão, o efeito de covariáveis sobre o resultado meta-analisado.

Desta forma, o objetivo desse estudo foi determinar, através de meta-análise, os efeitos da suplementação com ácido málico/malato sobre parâmetros ruminais, sanguíneos e sobre a digestibilidade de frações da dieta de bovinos.

### **Materiais e métodos**

Para construção da base de dados, foram incluídos trabalhos publicados que tenham avaliado o efeito da inclusão de malato e ácido málico sobre parâmetros ruminais, sanguíneos e digestibilidade de nutrientes de bovinos. A busca por artigos foi realizada nos motores de busca Web of Science, Science Direct e Google Acadêmico, utilizando as palavras chave: ácidos orgânicos, ácido málico, malato e bovinos. Além disso, as referências de cada artigo foram revisadas em busca de trabalhos relevantes para a pesquisa e que, eventualmente, tenham escapado da triagem.

Os estudos incluídos na meta-análise deveriam ser originais apresentando média e uma medida de dispersão das variáveis de interesse. Se não presentes no artigo, os desvios padrão de cada estudo foram calculados através das medidas de variabilidade apresentadas nos artigos. Apenas estudos que apresentarem resultados para um grupo controle e tratamento (suplementação com ácido orgânico) foram considerados. Experimentos independentes, apresentados em um mesmo artigo, foram incluídos como uma nova comparação. Tratamentos onde foram utilizadas combinações com malato também foram incluídos como comparações separadas. Da mesma forma, diferentes doses de malato em um mesmo experimento foram incluídos como uma nova comparação.

As informações incluídas foram relacionadas a estudo, periódico, ano, delineamento, dose, relação volumoso:concentrado, composição química da ração, consumo de matéria seca, raça, peso inicial, entre outras. Se não presente nos artigos, a composição das dietas foi calculada. Assim, apenas foram incluídos estudos contendo a composição química das dietas ou que forneceram informações que permitissem estimá-la. As variáveis de interesse incluídas na análise foram aquelas relacionadas aos parâmetros ruminais, digestibilidade de frações da dieta e parâmetros sanguíneos totalizando 17 variáveis. A base final foi composta por 19 estudos que possibilitaram 47 comparações.

O efeito da adição do malato foi avaliado através do método do tamanho de efeito (TE). O TE foi calculado como a diferença entre o grupo tratamento (ácido málico ou malato) e o grupo controle dividida pelo desvio padrão agrupado. O efeito médio da suplementação com malato foi calculado a partir de um modelo de efeitos aleatórios. A heterogeneidade foi

verificada através do teste Q de Cochran, utilizando a estatística  $I^2$  para determinar quanto da variabilidade total (%) ocorreu em função da variabilidade entre estudos (Higgins & Thompson, 2002).

Na tentativa de explicar a heterogeneidade, foram realizadas duas análises de sensibilidade: subgrupos e meta-regressão. A análise subgrupos foi realizada dividindo os estudos em dois grupos de acordo com a forma química do suplemento. Os grupos utilizados foram: ácido, para animais suplementados com ácido málico; e sal, para animais suplementados com malato. A análise de meta-regressão foi usada para explorar os efeitos lineares de covariáveis apontadas na literatura como possíveis fontes de variabilidade dos resultados observados. A análise foi realizada somente quando as variáveis de interesse possuísem ao menos 10 comparações e heterogeneidade significativa ( $P < 0.10$ ). Foram testadas as seguintes variáveis explicativas: consumo de proteína bruta (g/kg PV), consumo de FDN (g/kg PV), consumo de FDA (g/kg PV), consumo de amido (g/kg PV), consumo de extrato etéreo (g/kg PV) e consumo do ácido orgânico (g/kg PV).

Forest plots foram utilizados para apresentar o tamanho de efeito médio e intervalo de confiança graficamente. Neste tipo de figura, o losango apresentado ao final da imagem representa o efeito de uma variável independente Y sobre a dependente X, determinado a partir dos resultados da análise de todos os estudos e seus respectivos pesos. A análise “leave one out” foi utilizada como teste de sensibilidade. Todas as análises foram realizadas através do pacote estatístico OpenMetaAnalyst.

## Resultados

### *Parâmetros ruminais*

Não foi observado efeito geral da adição de ácido málico sobre o pH ruminal de bovinos (figura 1), o tamanho de efeito e o intervalo de confiança podem ser observados na tabela 1. A análise de subgrupos indicou que existe diferença na maneira com que o ácido orgânico atua sobre o pH em função da forma de suplementação. Não houve efeito quando a suplementação foi feita na forma de ácido ( $P > 0,05$ ). Entretanto, a resposta foi significativa quando foi utilizado o malato, que é a forma de sal do produto (TE= 1.420, IC 0.558; 2.282;  $P < 0.01$ ). A heterogeneidade observada para essa variável foi elevada e significativa ( $P < 0.01$ ). Dentre as covariáveis testadas na meta-regressão, apenas o consumo de FDN foi significativo, e indicou que o consumo desse tipo de fibra (g/kg PV) atua diminuindo a diferença média padronizada

entre os tratamentos (SMD=2.063 -0.051x, P<0.05). Os resultados observados para as demais covariáveis testadas estão apresentadas na tabela 3.

A produção de ácidos graxos voláteis totais (AGVs) foi maior quando os animais foram suplementados com o ácido orgânico (P<0.05) (figura 2). O tamanho de efeito geral foi de 0.508 (IC 0.055; 0.961), sendo a resposta bastante heterogênea conforme explicitado pela estatística  $I^2$  (73,78; P<0.01). Embora a análise tenha indicado que nenhuma das formas de suplementação afete a produção de VFAs significativamente, houve tendência (P= 0.07) de aumento no efeito quando foi utilizada a forma de ácido (ácido málico). A meta-regressão apontou o consumo de amido (g/kg PV) como uma das covariáveis que podem interferir na diferença média observada entre os tratamentos (SMD= -1.033 +0.042x; P<0.05).

A presença de acetato no rúmen não foi afetada pela adição de ácido orgânico (P>0.05). Essa resposta foi resultado da meta-análise de 9 artigos totalizando 25 comparações. Da mesma forma, a análise de subgrupo indicou que nenhuma das formas de suplementação interfere na produção desse AGV no rúmen (tabela 1). A estatística  $I^2$  indicou que 76.34 de variação observada foi resultado da variabilidade entre estudos. De acordo com a análise de meta-regressão, daquelas covariáveis testadas, apenas a ingestão de amido foi significativa (SMD= -1.726 +0.039x; P<0.01).

A suplementação com ácido orgânico aumentou a produção de propionato no rúmen (figura 3). Além do efeito geral (0.560; P<0.01), a meta-análise indicou efeito positivo (P<0.02) quando a suplementação foi feita na forma de ácido e tendência de aumento (P= 0.08) quando foi utilizada a forma de sal (tabela 1). A análise de meta-regressão, realizada em função da heterogeneidade elevada e significativa, indicou que o consumo de proteína bruta (SMD= -0.395 +0.292x) e amido (SMD= -0.518 +0.028x; P<0.01) são covariáveis que podem levar a um aumento no efeito da suplementação.

Não houve efeito da suplementação com ácido orgânico sobre a produção de butirato no rúmen. O tamanho de efeito geral foi -0.120 (-0.584; 0.345; P>0.05). Da mesma forma, a análise subgrupos indicou ausência de efeito independentemente da forma química utilizada na suplementação (tabela 1). A heterogeneidade associada a esse efeito foi significativa, onde a variabilidade entre estudos representou 76,69 da variabilidade total. Através de meta-regressão, foi determinado que apenas o consumo de extrato etéreo foi significativo. Essa covariável atua diminuindo a diferença média observada entre os tratamentos (SMD= 0.873 -1.382x; P<0.01).

A relação acetato:propionato diminuiu em função da suplementação com o ácido orgânico (figura 4). O tamanho de efeito geral foi -1.130 (IC -2.028; -0.232; P<0.01). Não houve efeito quando os animais foram suplementados com a forma de ácido do produto,

enquanto para o grupo malato (sal), houve tendência de aumento ( $P= 0.06$ ). A heterogeneidade para essa variável foi significativa ( $I^2= 81.68$ ,  $P<0.01$ ). A meta-regressão indicou que o consumo de FDN ( $SMD=1.887 -0.118x$ ;  $P<0.01$ ) e FDA ( $SMD=3.057 -1.463x$ ;  $P<0,01$ ) diminui diferença obtida entre os tratamentos, enquanto o de amido aumenta essa diferença ( $SMD=-7.483 +0.156x$ ;  $P<0.01$ ).

A presença de lactado não foi influenciada pela suplementação. Essa resposta foi resultado da meta-análise de 5 artigos que possibilitaram 12 comparações. Assim como para o efeito geral, os subgrupos formados pelas diferentes formas de suplementação não foram significativos. A variabilidade entre estudos, determinada pela estatística  $I^2$  (70,76), foi significativa e investigada através de meta-regressão. Essa análise determinou que o consumo de FDN foi significativo, diminuindo o efeito da suplementação sobre a presença de lactato. Além disso, o consumo de amido (g/kg PV) apresentou tendência ( $P= 0.07$ ), de acordo com o apresentado na tabela 3.

A suplementação com ácido orgânico não teve efeitos sobre a presença de nitrogênio amoniacal no rúmen ( $NH_3N$ ). O tamanho de efeito geral foi 0.079 (IC -0.227; 0.385;  $P>0,05$ ). Concomitantemente, os subgrupos testados também não indicaram a presença de efeito em função da adição de malato ou ácido málico. A heterogeneidade para essa variável foi significativa ( $P= 0.07$ ). A meta-regressão determinou que o consumo de FDN (g/kg PV) como uma das possíveis fontes dessa variação ( $SMD=1.337 -0.033x$ ;  $P<0.01$ ).

### *Digestibilidade*

A digestibilidade da matéria seca foi influenciada pelos tratamentos (figura 6). O tamanho de efeito geral foi 0.547 (IC 0.027; 1.067.  $P<0.05$ ). A análise de subgrupos indicou que a digestibilidade aumentou quando a suplementação foi feita na forma de ácido, mas não quando utilizado o malato (tabela 2). A heterogeneidade foi elevada e significativa ( $I^2 74.74$ ). Nenhuma das covariáveis testadas pela meta-regressão foi significativa, apenas houve tendência de redução na diferença entre as médias em função do consumo de FDN g/kg PV ( $SMD=1.309 -0.171x$ ).

A suplementação com ácido orgânico não teve efeito sobre a digestibilidade da matéria orgânica. Assim como para o efeito geral, não houve diferença para nenhum dos subgrupos testados (tabela 2). Essa resposta foi obtida pela meta-análise de 5 artigos, resultando em 9 comparações. A heterogeneidade não foi significativa ( $I^2 21.24$ ;  $P>0.05$ ). Em razão da baixa variabilidade e número de estudos, não foi realizada meta-regressão.

A digestibilidade da proteína bruta foi maior para os animais suplementados com ácido orgânico. Esse resultado foi baseado na meta-análise de 6 artigos que permitiram 13 comparações. O tamanho de efeito geral foi 0.422 (IC 0.099; 0.745.  $P < 0.01$ ). A digestibilidade foi maior para os animais que receberam malato. Entretanto, não houve efeito quando foi utilizado o ácido málico. A heterogeneidade não foi significativa, conforme indicado pela valora de  $I^2$  (0.00;  $P = 0.47$ ).

Não houve efeito dos tratamentos sobre a digestibilidade da fibra em detergente neutro ( $FDN_{DIG}$ ). O tamanho de efeito geral foi 0.699 (IC -0.007; 1.406.  $P > 0.05$ ), indicando que houve tendência de aumento na digestibilidade. Os subgrupos indicaram que não houve efeito para o ácido málico. Entretanto, a suplementação com malato aumentou significativamente ( $P = 0.02$ ) a  $FDN_{DIG}$  (TE= 1.537. IC 0.277; 2.797). A meta regressão apontou o consumo de proteína bruta e amido (g/kg PV) como possíveis covariáveis interferentes no efeito observado (tabela 3).

A digestibilidade da fibra em detergente ácido ( $FDA_{DIG}$ ) aumentou devido a suplementação com ácido orgânico. A tamanho de efeito geral foi 0.635 (IC 0.148; 1.121.  $P < 0.01$ ). Houve apenas tendência de aumento quando analisamos o subgrupo ácido málico ( $P = 0.08$ ). Para os animais suplementados com malato, foi observado aumento significativo ( $P = 0.03$ ) na  $FDA_{DIG}$  (TE= 0.635. IC 0.148; 1.121). Apesar da heterogeneidade significativa ( $I^2 = 46.49$ ,  $P = 0.03$ ), nenhuma das covariáveis testadas apresentou resultado significativo (tabela 3).

#### *Parâmetros sanguíneos*

O nível de glicose no sangue foi afetado pela suplementação com o ácido orgânico (figura 5). O tamanho de efeito geral foi 0.170 (IC 0.002; 0.338;  $P < 0.05$ ), indicando que a glicose é maior para o grupo tratamento em relação ao controle. Entretanto, não houve não houve efeito para nenhum dos subgrupos testados (tabela 2). A heterogeneidade para essa variável não foi significativa ( $P > 0.10$ ) e, portanto, não houve necessidade de realizar meta-regressão.

Não houve efeito geral da suplementação com ácido orgânico ( $P > 0.05$ ) sobre a concentração de ureia no plasma sanguíneo (TE=-0.033; IC -0.279; 0.212). A resposta obtida para o subgrupo ácido e sal foi ao encontro do observado para efeito geral (tabela 2). Embora esteja em uma faixa intermediária ( $I^2 = 47.22$ ), a heterogeneidade foi significativa e, portanto, investigada através de meta-regressão. A análise indicou que nenhuma das covariáveis testadas é a provável fonte de variabilidade entre os resultados observados nos diferentes estudos (tabela 3).

A presença de ácidos graxos não esterificados (NEFA) no sangue foi influenciada pelos tratamentos. O tamanho de efeito geral foi -0.404 (IC -0.759; -0.049), sendo resultado da meta-análise de 9 estudos. A análise de subgrupos apontou que existe efeito quando a suplementação é feita na forma de ácido. Não houve efeito quando foi utilizada a forma de sal, entretanto tal resultado foi baseado em apenas 2 comparações, o que torna o resultado pouco confiável. Apesar da heterogeneidade significativa (tabela 2), em função do baixo número de estudos, não foi realizada meta-regressão.

Os níveis de  $\beta$ -hidroxibutirato e lactato no sangue não foram influenciados pelos tratamentos. O tamanho de efeito para  $\beta$ -hidroxibutirato foi -0.018 (IC -0.742; 0.706; P= 0.95). A análise de subgrupos indicou efeito apenas para o ácido málico -1.661 (IC-2.690; -0.361; P<0.01), contudo esse é um resultado baseado em apenas 2 estudos. Para lactato o tamanho de efeito foi -0.490 (-1.316; 0.337), efeito que foi ao encontro do observado para os dois subgrupos. A estatística  $I^2$  foi 75,20 e 83.31 para  $\beta$ -hidroxibutirato e lactato, respectivamente. Apesar da heterogeneidade significativa, o baixo número de estudos impediu a realização de meta-regressão.

## Discussão

### *Parâmetros ruminais*

Os resultados de efeito geral do ácido orgânico sobre o pH ruminal estão de acordo com aqueles observados por (FOLEY et al., 2009; LIU et al., 2009; KUNG et al., 1982). A diferença observada para os subgrupos é compreensível se considerarmos as funções inorgânicas do suplemento utilizado (ácido e sal). O tamanho do efeito (1.420), observado no grupo “sal”, é considerado grande e significa que a média dos dois grupos está separada por 1.420 desvio padrão (COHEN, 1988). Uma das premissas que levaram o ácido málico a ser testado em dietas para ruminantes foi sua capacidade, demonstrada *in vitro*, de aumentar a captação de lactato. A presença desse ácido orgânico favorece o crescimento de bactérias *Selenomonas ruminantium*, que utilizam o lactato como fonte de carbono e energia, o que implicaria em aumento do pH ruminal (CASTILLO et al., 2004). Adicionalmente, a suplementação com malato pode atuar sobre o pH através de um segundo mecanismo, que é a produção de CO<sub>2</sub> pela *S. ruminantium*. Se cultivada na presença de lactato e ácidos orgânicos, a produção de gás por essas bactérias é maior do que em ambientes onde existe apenas lactato (MARTIN et al, 1999). Os valores de  $I^2$  indicaram que 80.40% da variabilidade ocorreu em função de diferenças entre os estudos. Valores de  $I^2$  superiores a 30% já podem representar heterogeneidade significativa e que, se

possível, deve ser investigada (HIGGINS & THOMPSON, 2003). Ao investigarmos a heterogeneidade através da meta-regressão, foi observado que o consumo de FDN (g/kg PV) reduz a diferença média observada entre os tratamentos. Como a presença de fibra implica em maior tempo de ruminação e, conseqüentemente, maior tamponamento do pH ruminal, é possível que seu consumo acabe sombreando o efeito do ácido orgânico sobre o pH.

Apesar do aumento do pH ruminal observado nos animais suplementados, não foi possível confirmar os efeitos da suplementação sobre a captação do lactato no rúmen. Embora a direção do efeito indique uma provável redução, principalmente quando se utiliza a forma ácida do produto, o resultado não foi significativo. A análise de meta-regressão indicou que o consumo de FDN g/kg PV diminui a diferença média padronizada entre as médias, ou seja, estudos onde o consumo de FDN é maior, o efeito do ácido orgânico sobre o lactato é menor. Elevado consumo de FDN implica em baixos níveis de lactato no rúmen prejudicando o crescimento da *S. ruminantium* e, conseqüentemente, o efeito do ácido orgânico.

O aumento da presença de AGVs no rúmen está de acordo com o observado por Khampa et al. (2006), Liu et al (2009) e Foley et al. (2009). O tamanho de efeito (0.508) obtido para essa variável é considerado moderado de acordo com a escala de Cohen (1988). Essa é uma resposta esperada e ocorreu principalmente em função da maior produção de propionato, já que não houve mudanças na concentração de acetato e butirato no rúmen. Concomitantemente, a relação acetato:propionato foi maior para o grupo controle (tabela 1), o que confirma a maior concentração de propionato nos animais suplementados. Bactérias *S. ruminantium* são capazes de utilizar o lactato como fonte de carbono com a condição de que estejam presentes precursores do oxaloacetato, como o malato. Este ácido pode seguir o ciclo reverso da via succinato-propionato e fornecer o oxaloacetato necessário para fermentação do lactato até propionato (KOZLOSKI, 2011). Os valores de heterogeneidade apontaram que existe elevada variabilidade que não está associada ao acaso. A resposta indicada pela meta-regressão parece contundente com aquilo que se sabe sobre os mecanismos de ação do ácido málico/malato, uma vez que o consumo de amido favorece o crescimento de bactérias produtoras de lactato que, associado ao ácido orgânico, se torna substrato para a produção de AGVs pela *S. ruminantium*.

Os resultados observados para o  $\text{NH}_3\text{N}$  estão de acordo com aqueles obtidos por Devant et al (2007), Foley et al (2009), e Malekhhahi et al (2015). Entretanto, estudos como o de Khampa et al (2006) observaram maior presença de  $\text{NH}_3\text{N}$  para animais suplementados com malato. Essa variável pode ser um indicativo da quantia de N disponível para síntese e/ou absorção no rúmen. Esse N, ao ser utilizado para aumento da população microbiana no rúmen, culminaria em maior fermentação bacteriana que, em última análise, poderia aumentar a

digestibilidade das frações da dieta de ruminantes. A meta-regressão apontou o consumo de FDN como um possível fator interferente no efeito do ácido orgânico sobre o  $\text{NH}_3\text{N}$ . O aumento no consumo de fibra estimula o aumento de populações bacterianas celulolíticas, enquanto as de característica proteolítica e amilolítica diminuem (WANAPAT et al., 2014). Além disso, o consumo de FDN pode diminuir a concentração de açúcares no rúmen (KOZLOSKI et al., 2006), que é um dos substratos de atuação da *S. ruminantium*, bactéria utilizadora do malato.

### *Digestibilidade*

O aumento na digestibilidade da PB, FDA e MS observado em nosso estudo está de acordo com os resultados obtidos por El-Zaiat et al (2019). O ácido málico tem a capacidade de remover o  $\text{H}_2$  do rúmen, estimulando o aumento na população de bactérias celulolíticas, o que acaba impactando na digestibilidade total das frações fibrosas. Além disso, o efeito observado sobre a digestibilidade da proteína pode ter ocorrido devido ao aumento da atividade de enzimas proteolíticas e ou diminuição do pH duodenal necessário para a atividade proteolítica efetiva, promovidas pelo ácido málico (PAPATSIROS et al., 2013; OVERLAND et al., 2013). O aumento da digestibilidade da MS em função da suplementação com ácido orgânico pode ocorrer por aumento da atividade enzimática, aumento das secreções e associação com o crescimento de populações bacterianas benéficas (PAPATSIROS et al., 2013). Em contrapartida, é curioso que a digestibilidade da MO não tenha apresentado resultados significativos, uma vez que essa variável contempla todas as frações citadas anteriormente. Entretanto, como as variáveis são estatisticamente independentes, essa é uma resposta possível e pode ocorrer em função de alta variabilidade e do menor número de estudos para realização da meta-análise. Apesar da elevada heterogeneidade, a meta-regressão não foi capaz de explicar adequadamente a fonte da variação, ao menos considerando as covariáveis testadas

### *Parâmetros sanguíneos*

O aumento nos níveis séricos de glicose está de acordo com os resultados obtidos por Wang et al (2006), Malekkhahi et al (2015) e El-Zaiat et al (2019). Alterações nessa variável podem indicar que os animais suplementados com o ácido orgânico absorveram mais propionato através das papilas ruminais, resultando em maior síntese de glicose. Embora nosso estudo tenha observado maior digestibilidade da proteína para o grupo suplementado, a ureia no plasma não foi influenciada pela adição do ácido orgânico. Os animais suplementados com malato ou ácido málico também apresentaram níveis mais baixos de NEFA, o que indica menor mobilização de gordura corporal. Essa é uma resposta importante pois o nível de NEFA no

plasma correlaciona-se negativamente com o balanço energético em vacas em início de lactação por exemplo, o que permite usar essa variável como e um indicador de balanço e mobilização de energia. Apesar da alta heterogeneidade para ureia no plasma (única variável com heterogeneidade significativa e número de estudos suficiente), indicando que 47.24% da variabilidade na estimativa de efeito se deve à heterogeneidade e não ao acaso. nenhuma das covariáveis testadas através da meta-regressão foi significativa para explicar a variação observada entre os estudos.

### Conclusão

A suplementação com malato/ácido málico aumenta o pH ruminal e também a produção de ácidos graxos voláteis totais, principalmente em função da maior produção de propionato no rúmen. O ácido orgânico atua também aumentando a digestibilidade da matéria seca, fibra em detergente neutro e proteína, além de aumentar a glicose e diminuir o nível de ácidos graxos não esterificados no plasma sanguíneo. As variáveis relacionadas a dieta, utilizadas para análise de meta-regressão, foram importantes para explicar a heterogeneidade dos resultados relacionados diretamente a fermentação ruminal, mas insipientes para esclarecer a variabilidade associada a digestibilidade e parâmetros sanguíneos.

### Referências bibliográficas

- CARRASCO, C. et al. Effect of malate form (acid or disodium/calcium salt) supplementation on performance, ruminal parameters and blood metabolites of feedlot cattle, **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, n. 1–4, 2012, p. 140-149, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840112002507>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- CASTILLO, C. et al. Malic acid supplementation in growing/finishing feedlot bull calves: Influence of chemical form on blood acid–base balance and productive performance, **Animal Feed Science and Technology**, v. 135, n. 3–4, p. 222-235, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840106002999>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- COHEN, J. **Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences**. 2 ed. Hillsdale: Lawrence Erlbaum Associates, Publishers. 1988. 579p.
- DEVANT, M. BACH, A., GARCÍA, J. A. Effect of Malate Supplementation to Dairy Cows on Rumen Fermentation and Milk Production in Early Lactation, **Journal of Applied Animal Research**, v. 31, n. 2, p. 169-172, 2007. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09712119.2007.9706655>. Acesso em: 9 fev. 2022.

EL-ZAIAT, H. M. et al. Enhancing lactational performance of Holstein dairy cows under commercial production: malic acid as an option. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 2, p. 885-892, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.9259>. Acesso em: 9 fev. 2022.

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. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030209706423>. Acesso em: 9 fev. 2022.

FOLEY, P. A. et al. Effect of DL-malic acid supplementation on feed intake, methane emission, and rumen fermentation in beef cattle. **Journal of Animal Science**, Oxford, v. 87, n. 3, p. 1048–1057, 2009. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/87/3/1048/4731155>. Acesso em: 9 fev. 2022

HERNÁNDEZ, J. et al. The influence of chemical form on the effects of supplementary malate on serum metabolites and enzymes in finishing bull calves, **Livestock Science**, v. 137, n. 1–3, 2011, p. 260-263, Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871141310005494>. Acesso em: 9 fev. 2022.

HIGGINS, J. P., THOMPSON, S, G. Measuring inconsistency in meta-analyses. **The BMJ**, v. 327, n. 1, p. 557-560, 2003. Disponível em: <https://www.bmj.com/content/327/7414/557>. Acesso em: 9 fev. 2022.

KHAMPA, S. ET al. Effect of Levels of Sodium DL-malate Supplementation on Ruminant Fermentation Efficiency of Concentrates Containing High Levels of Cassava Chip in Dairy Steers. **Animal Bioscience**, v. 19, n. 3, p. 368-375. Disponível em: <https://www.animbiosci.org/journal/view.php?doi=10.5713/ajas.2006.368>. Acesso em: 9 fev. 2022.

KOZLOSKI, G. V. et al. Níveis de fibra em detergente neutro na dieta de cordeiros: consumo, digestibilidade e fermentação ruminal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.5, p.893-900, 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/gKfSwjXqpKWNKrrsCP76ZTH>. Acesso em: 9 fev. 2022.

KOZLOSKI, G.V. Bioquímica de ruminantes. 3 ed. Santa Maria: UFSM, 2011. 216p

KUNG JR, L. et al. Influence of adding malic acid to dairy cattle rations on milk production, rumen volatile acids, digestibility, and nitrogen utilization. **Journal of Dairy Science**, v. 65, n. 7, p. 1170–1174, 1982. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203028282328X>. Acesso em: 9 fev. 2022.

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. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/animal/article/abs/effects-of-malic-acid-on-rumen-fermentation-urinary-excretion-of-purine-derivatives-and-feed-digestibility-in-steers/9B3223EC0319F6129214656A963A6DA0>. Acesso em: 9 fev. 2022.

MALEKKHAHI, M. et al. Effects of supplementation of active dried yeast and malate during sub-acute ruminal acidosis on rumen fermentation, microbial population, selected blood

metabolites, and milk production in dairy cows, **Animal Feed Science and Technology**, v. 213, n. 1, p. 29-43, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0377840115301085?via%3Dihub>. Acesso em: 9 fev. 2022.

MARTIN, S. A. et al. Effects of DL-malate on ruminal metabolism and performance of cattle fed a high-concentrate diet. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 4, p. 1008-1015, 1999. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/77/4/1008/4683779>. Acesso em: 9 fev. 2022.

OVERLAND, M. Effect of dietary formates on growth performance, carcass traits, sensory quality, intestinal microflora, and stomach alterations in growing-finishing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 7, p. 1875–1884, 2000. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/78/7/1875/4670763>. Acesso em: 9 fev. 2022.

PAPATSIROS, V. G., et al. Alternatives to antibiotics for farm animals. **CAB Reviews**, v. 32, n. 8, p., 1-15, 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Konstantinos-Koutoulis/publication/259233388>. Acesso em: 9 fev. 2022.

SNIFFEN, C. J. et al. Effects of malic acid on microbial efficiency and metabolism in continuous culture of rumen contents and on performance of mid-lactation dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 127, n. 1, p. 13–31, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0377840105003159?via%3Dihub>. Acesso em: 9 fev. 2022.

VYAS, D., BEAUCHEMIN, K. A., KOENIG, K. M. Using organic acids to control subacute ruminal acidosis and fermentation in feedlot cattle fed a high-grain diet. **Journal of Animal Science**, v. 93, n. 8, p. 3950-3958, 2015. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/93/8/3950/4701771>. Acesso em: 9 fev. 2022.

WANAPAT, M., et al. Changes of rumen pH, fermentation and microbial population as influenced by different ratios of roughage (rice straw) to concentrate in dairy steers. **The Journal of Agricultural Science**, v. 152, n. 4, p. 675-685, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0021859613000658>. Acesso em: 9 fev. 2022.

WANG, C. et al. Effects of malic acid on feed intake, milk yield, milk components and metabolites in early lactation Holstein dairy cows. **Livestock Production Science**, v. 124, n. 1–3, p. 182-188, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871141309000316>. Acesso em: 9 fev. 2022.

Tabela 1 – Resumo da meta-análise (tamanho do efeito) da suplementação com malato em bovinos

Variable	Form	n	ES(CI)	ES p-value	I <sup>2</sup>	Het p-value
pH	Salt	11	1.420 (0.558; 2.282)	0.00	80.40	<0.01
	Acid	12	-0.310 (-0.698; 0.079)	0.12	38.18	0.09
	Overall	23	0.310 (-0.137; 0.774)	0.17	72.95	<0.01
Acetate	Salt	11	-0.592 (-1.381; 0.196)	0.14	72.26	<0.01
	Acid	14	0.167 (-0.386; 0.720)	0.55	78.08	<0.01
	Overall	25	-0.120 (-0.584; 0.345)	0.61	76.34	<0.01
Butyrate	Salt	11	-0.356 (-1.040; 0.328)	0.31	72.84	<0.01
	Acid	14	-0.058 (-0.717; 0.601)	0.86	78.39	<0.01
	Overall	25	-0.178 (-0.653; 0.297)	0.46	76.69	<0.01
Propionate	Salt	11	0.756 (-0.075; 1.588)	0.08	80.10	<0.01
	Acid	14	0.472 (0.066; 0.879)	0.02	48.17	0.02
	Overall	25	0.560 (0.160; 0.959)	0.01	67.31	<0.01
Lactate	Salt	6	0.337 (-0.517; 1.191)	0.44	67.60	0.01
	Acid	6	-0.621 (-1.512; 0.270)	0.17	74.94	<0.01
	Overall	12	-0.113 (-0.711; 0.485)	0.71	70.76	<0.01
ACT:PRP	Salt	9	-1.327 (-2.683; 0.030)	0.06	82.04	<0.01
	Acid	6	-1.109 (-2.470; 0.252)	0.11	83.70	<0.01
	Overall	15	-1.130 (-2.028; -0.232)	0.01	81.68	<0.01
NH <sub>3</sub> N	Salt	8	0.161 (-0.170; 0.492)	0.34	0.99	0.42
	Acid	12	-0.089 (-0.560; 0.381)	0.71	47.12	0.04
	Overall	20	0.079 (-0.227; 0.385)	0.61	34.62	0.07
Total VFA	Salt	11	0.547 (-0.249; 1.343)	0.18	78.21	<0.01
	Acid	14	0.518 (-0.034; 1.071)	0.07	69.90	<0.01
	Overall	25	0.508 (0.055; 0.961)	0.03	73.78	<0.01

N number of comparisons; ES effect size; CI confidence interval; VFA volatile fatty acids; NH<sub>3</sub>N ammonia nitrogen; ACT:PRP acetate:propionate ratio

Tabela 2 – Resumo da meta-análise (tamanho do efeito) da suplementação com malato em bovinos

Trait	Form	Std	ES(CI)	p-value	I <sup>2</sup>	Het p-value
<i>Blood parameters</i>						
Glucose	Salt	7	0.163 (-0.132; 0.457)	0.28	0.00	0.88
	Acid	9	0.173 (-0.034; 0.379)	0.10	0.49	0.43
	Overall	16	0.170 (0.002; 0.338)	0.05	0.00	0.78
Urea	Salt	7	0.028 (-0.385; 0.441)	0.89	45.12	0.11
	Acid	8	-0.109 (-0.413; 0.194)	0.48	53.35	0.04
	Overall	15	-0.033 (-0.279; 0.212)	0.79	47.24	0.03
Lactate	Salt	7	-0.060 (-0.956; 0.836)	0.90	82.63	<0.01
	Acid	2	-1.661 (-2.690; -0.361)	0.01	57.23	0.13
	Overall	9	-0.490 (-1.316; 0.337)	0.25	83.31	<0.01
NEFA	Salt	2	-0.024 (-0.597; 0.550)	0.94	0.00	0.94
	Acid	7	-0.626 (-1.065; -0.187)	0.01	0.00	0.47
	Overall	9	-0.404 (-0.759; -0.049)	0.03	3.56	0.40
β-hidroxibutirato	Salt	2	0.532 (-0.769; 1.832)	0.42	78.81	0.03
	Acid	7	-0.260 (-1.172; 0.652)	0.58	75.68	0.01
	Overall	9	-0.018 (-0.742; 0.706)	0.96	75.20	<0.01
<i>Digestibility</i>						
Dry matter	Salt	5	-0.084 (-0.575; 0.407)	0.74	0.00	0.95
	Acid	8	0.940 (0.229; 1.651)	0.01	73.01	0.01
	Overall	13	0.547 (0.027; 1.067)	0.04	78.74	<0.01
Organic matter	Salt	4	0.056 (-0.435; 0.546)	0.82	0.00	0.99
	Acid	5	0.694 (-0.217; 1.604)	0.14	53.15	0.07
	Overall	9	0.308 (-0.148; 0.764)	0.19	21.24	0.25
Protein	Salt	5	1.168 (0.217; 2.118)	0.02	52.70	0.10
	Acid	8	0.215 (-0.197; 0.627)	0.31	0.00	0.97
	Overall	13	0.422 (0.099; 0.745)	0.01	0.00	0.47
NDF	Salt	5	1.537 (0.277; 2.797)	0.02	77.39	0.00
	Acid	6	-0.085 (-0.576; 0.406)	0.73	0.00	0.94
	Overall	11	0.699 (-0.007; 1.406)	0.05	67.29	0.01
ADF	Salt	4	0.547 (0.042; 1.051)	0.03	0.00	0.45
	Acid	8	0.654 (-0.078; 1.387)	0.08	60.62	0.01
	Overall	12	0.635 (0.148; 1.121)	0.01	46.49	0.03

N number of comparisons; ES effect size; CI confidence interval; NEFA non esterified fatty acids; NDF neutral detergent fiber; ADF acids detergent fiber

Tabela 3 – Meta-regressão do efeito da suplementação com ácido málico ou malato sobre parâmetros ruminais, sanguíneos e digestibilidade de frações da dieta determinado com bovinos.

Variables	Covariables, g/kg BW					
	Crude protein	Ether extract	NDF	ADF	Starch	Organic acid
<i>Rumen parameters</i>						
pH	1.434 -0.323x	0.735 -0.410x	2.063 -0.051x*	0.908 -0.142	0.584 -0.004x	0.343+ 0.548x
Acetate	-0.705 +0.185x	-0.176 +0.059x	0.126 -0.008x	0.464 -0.173x	-1.726 +0.039x**	-0.455+ 2.690x
Butyrate	0.638 -0.303x	0.873 -1.382x**	-1.475 +0.038x	-1.155 +0.252x	-0.649 +0.009x	-1.121 +7.116x
Propionate	-0.395 +0.292x**	0.393 +0.224x	0.239 +0.009x	0.357 +0.055x	-0.518 +0.028x**	0.871 -2.894x
Lactate	-0.393 +0.083x	-0.154 +0.054x	1.250 -0.041x*	0.684 -0.242x	-1.462 +0.031x <sup>T</sup>	-0.547 +3.758x
Acetate:propionate	-4.246 +0.871x <sup>T</sup>	-2.671 +0.786x	1.887 -0.118x*	3.057 -1.463x**	-7.483 +0.156x**	-3.000 +10.725x
NH <sub>3</sub> N	0.191 -0.028x	-0.066 +0.161x	1.337 -0.033x**	0.854 -0.176x	-0.032 +0.002x	0.262 -1.384x
Total VFA	1.404 -0.253x	0.658 -0.050x	-0.034 +0.019x	0.632 -0.013x	-1.033 +0.042x*	1.258 -5.318x
<i>Blood parameters</i>						
Urea	0.056 -0.017x	0.183 -0.170x	-0.074 +0.001x	-0.053 +0.005x	0.370 -0.007x	0.007 -0.190x
<i>Digestibility</i>						
Dry matter	0.575 -0.017x	0.260 +0.299x	-0.374 +0.023x <sup>T</sup>	0.418 +0.021x	0.673 -0.004x	1.067 -6.511x
Protein	0.504 -0.021x	0.351 +0.082x	0.613 -0.004x	0.336 +0.016x	0.483 -0.002x	0.560 -1.665x
NDF	1.162 -0.188x*	1.195 -0.754x	0.135 +0.013x	1.309 -0.171x <sup>T</sup>	1.375 -0.025x*	1.530 -13.733x <sup>T</sup>
ADF	0.939 -0.111x	0.762 -0.309x	0.550 -0.002x	0.695 -0.039x	1.167 -0.016x	0.795 -3.606x

\*P<0.05; \*\*P<0.01; <sup>T</sup> Tendency; NDF neutral detergent fiber; ADF acid detergent fiber; VFA volatile fatty acids

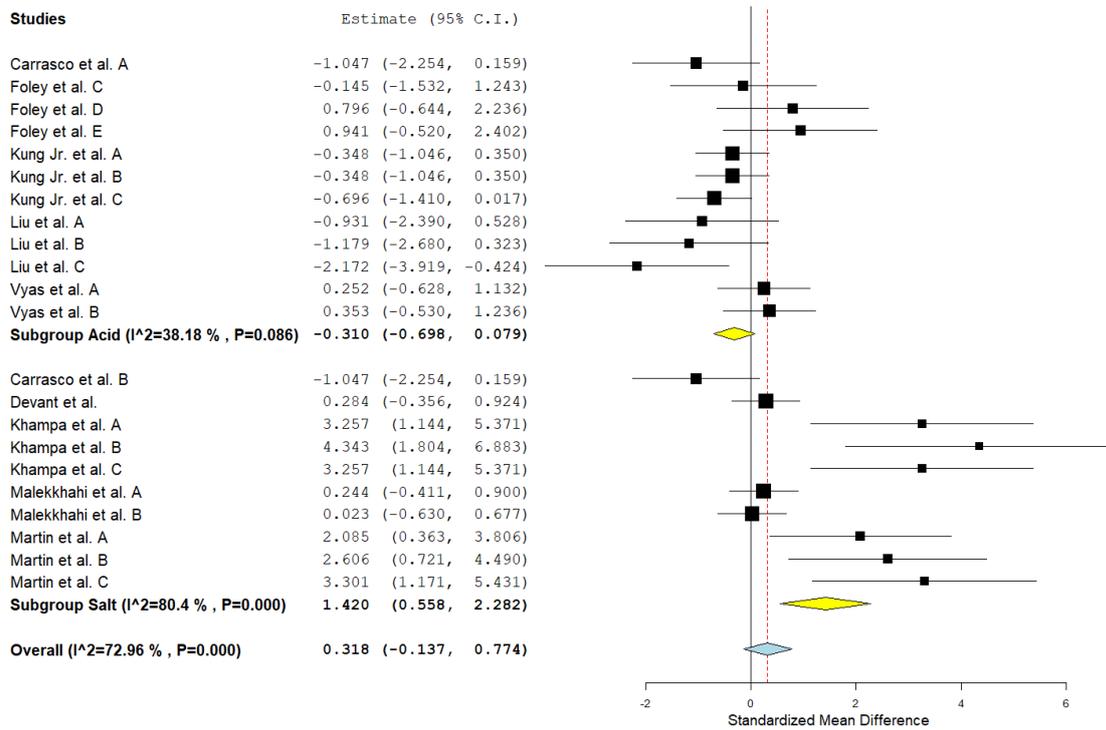


Figura 1 – Forest plot do efeito da suplementação com ácido málico ou malato sobre o pH de bovinos. Quando o losango se apresentou à esquerda da linha central (média padronizada) sem toca-la, considerou-se que o efeito foi negativo, favorecendo o controle. Quando apresentado à direita da linha central, considerou-se o efeito como positivo, em favor do ácido orgânico.

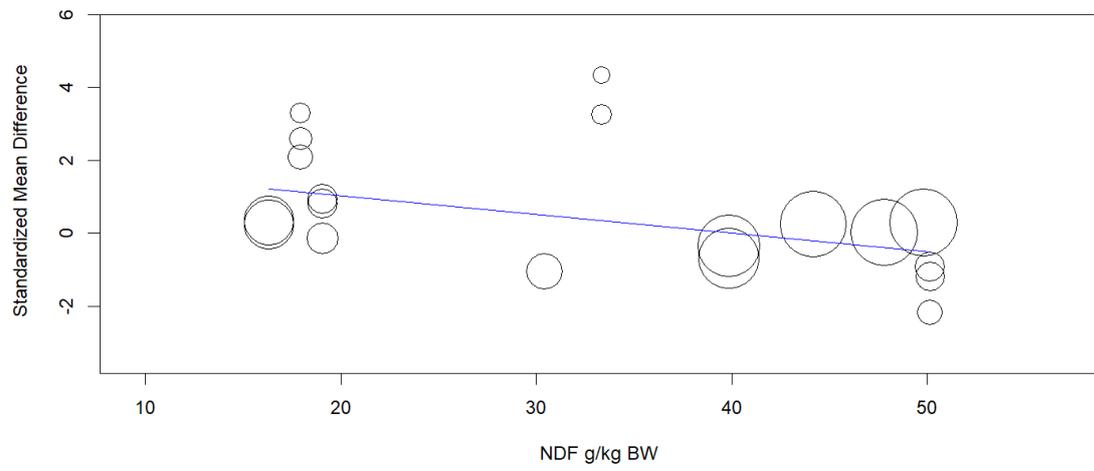


Figura 2 – Meta-regressão do efeito da ingestão fibra em detergente neutro (g/kg PV) sobre a diferença média padronizada da suplementação com malato sobre o pH ruminal de bovinos.

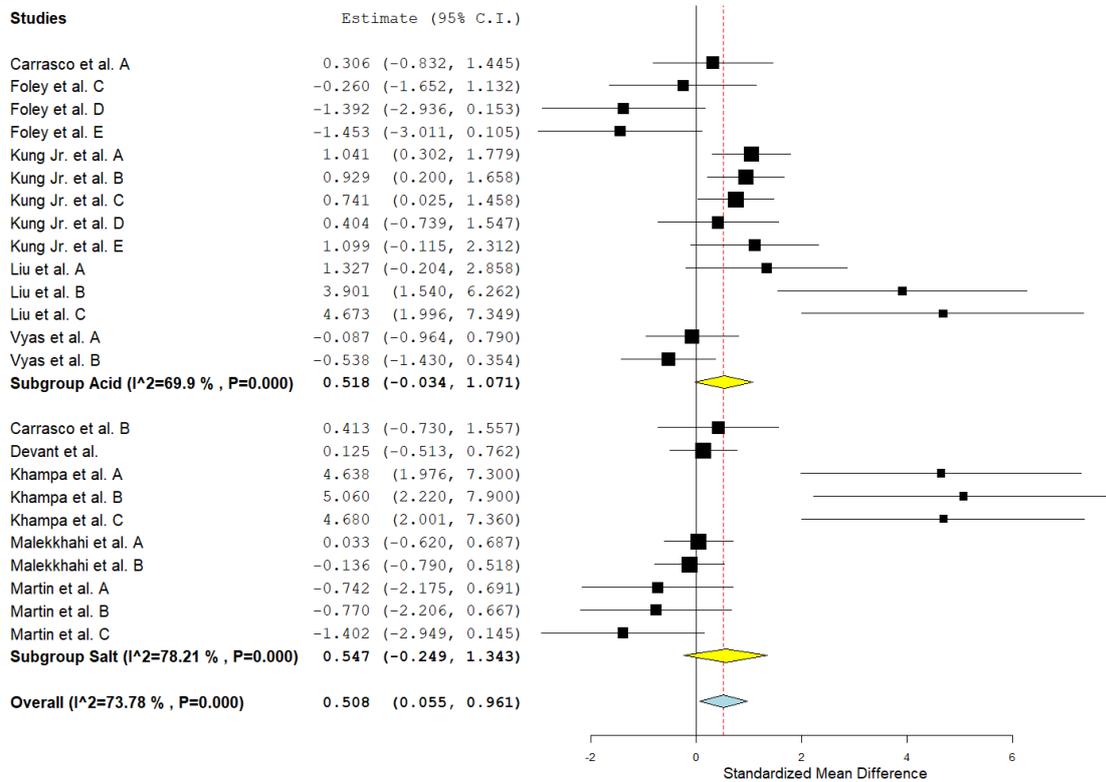


Figura 3 – Forest plot do efeito da suplementação com ácido málico ou malato sobre ácidos graxos voláteis totais em bovinos. Quando o losango se apresentou à esquerda da linha central (média padronizada) sem toca-la, considerou-se que o efeito foi negativo, favorecendo o controle. Quando apresentado à direita da linha central, considerou-se o efeito como positivo, em favor do ácido orgânico.

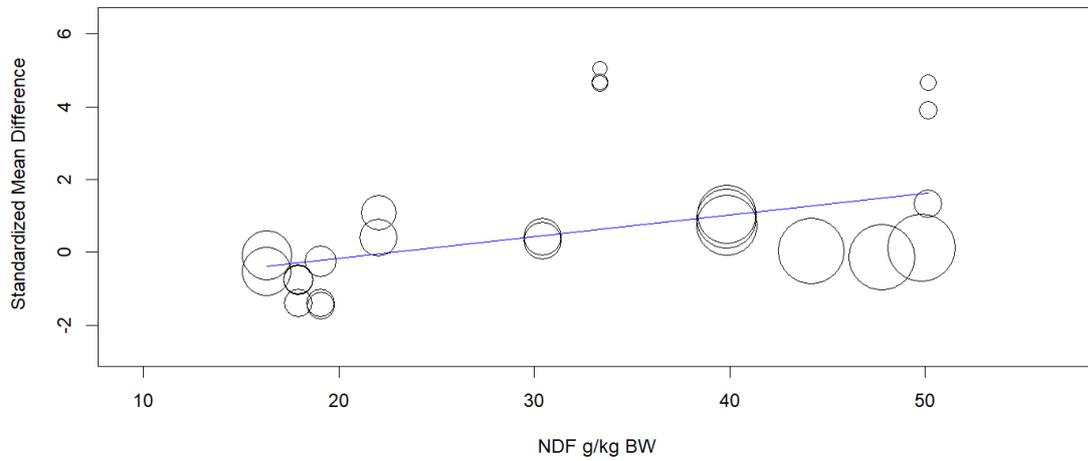


Figura 4 – Meta-regressão do efeito da ingestão fibra em detergente neutro (g/kg PV) sobre a diferença média padronizada da suplementação com malato sobre ácidos graxos voláteis totais no rúmen de bovinos.

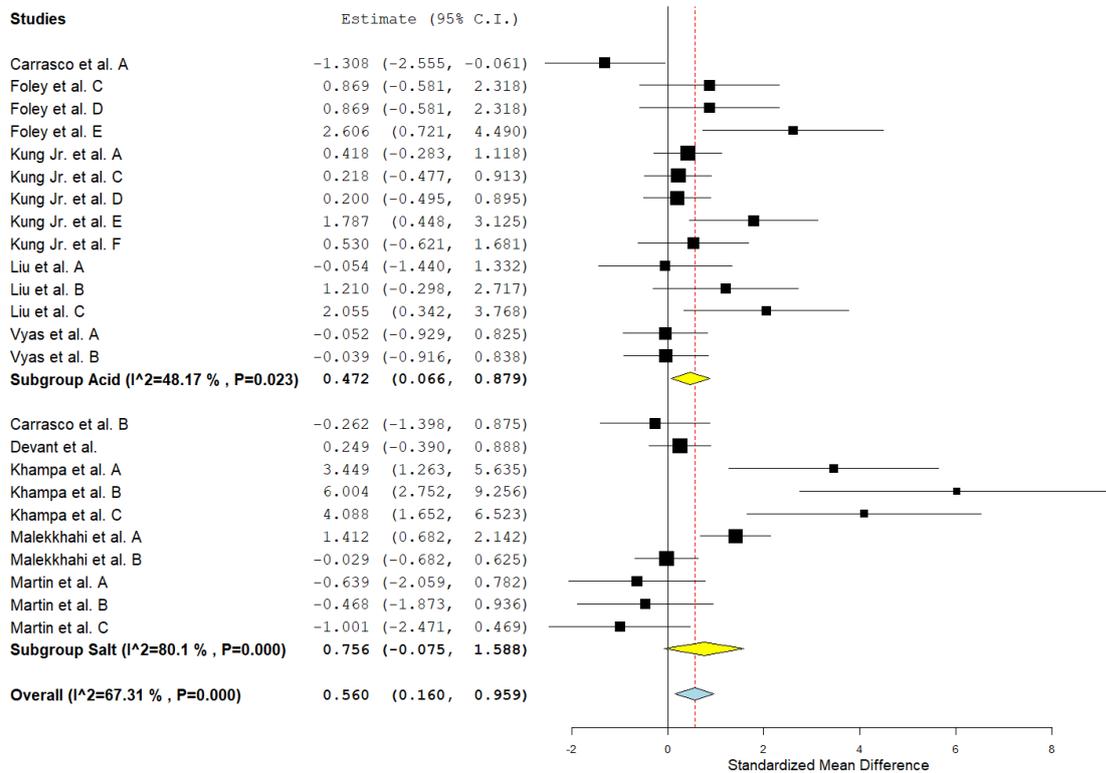


Figura 5 – Forest plot do efeito da suplementação com ácido málico ou malato sobre o propionato no rúmen de bovinos. Quando o losango se apresentou à esquerda da linha central (média padronizada) sem toca-la, considerou-se que o efeito foi negativo, favorecendo o controle. Quando apresentado à direita da linha central, considerou-se o efeito como positivo, em favor do ácido orgânico.

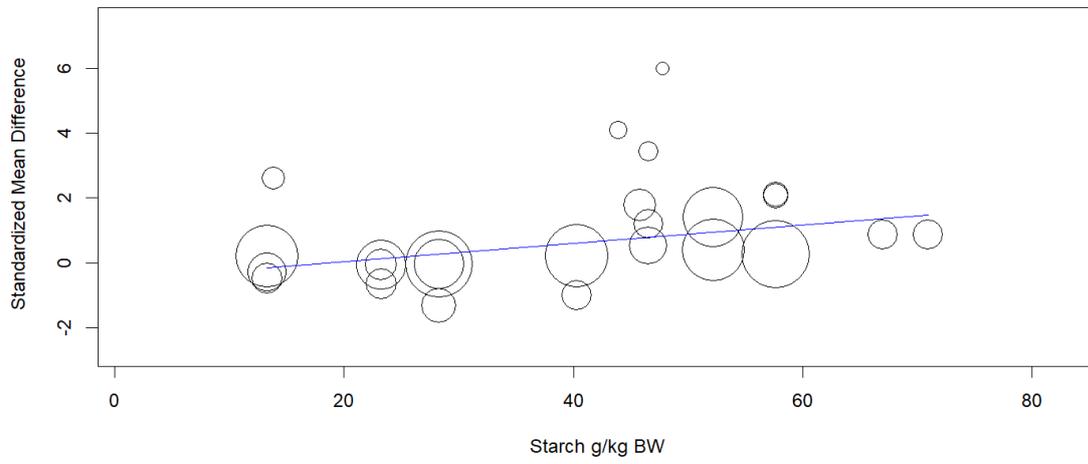


Figura 6 – Meta-regressão do efeito da ingestão de amido (g/kg PV) sobre a diferença média padronizada da suplementação com malato sobre o propionato no rúmen de bovinos.

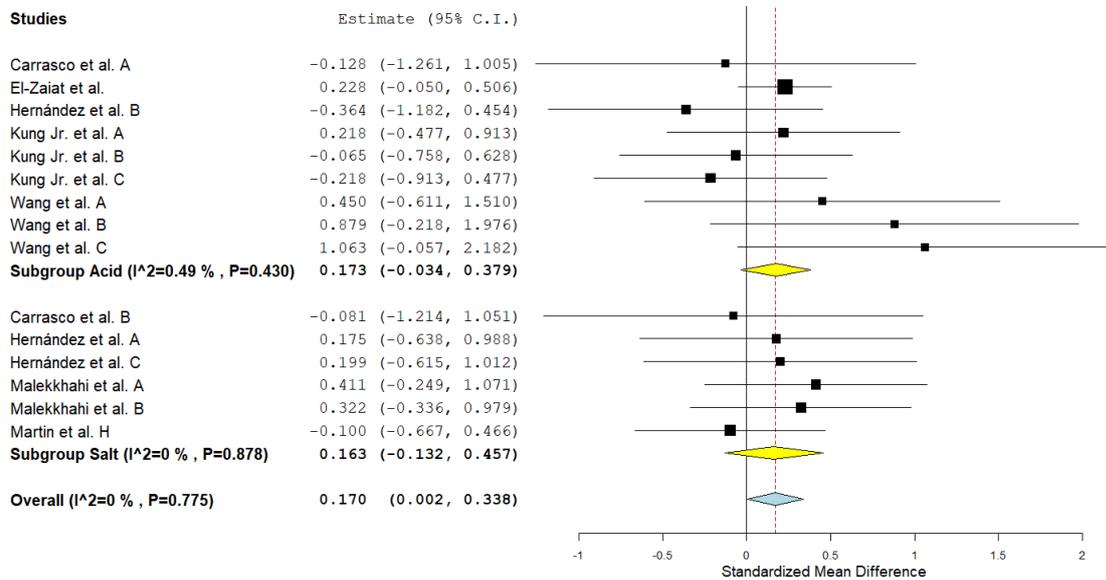


Figura 7 – Forest plot do efeito da suplementação com ácido málico ou malato sobre glicose sanguínea em bovinos. Quando o losango se apresentou à esquerda da linha central (média padronizada) sem toca-la, considerou-se que o efeito foi negativo, favorecendo o controle. Quando apresentado à direita da linha central, considerou-se o efeito como positivo, em favor do ácido orgânico.

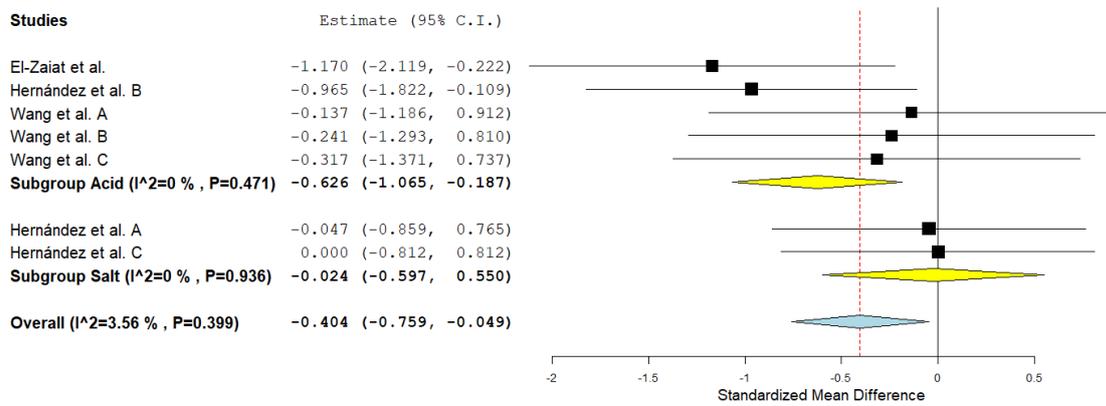


Figura 8 – Forest plot do efeito da suplementação com ácido málico ou malato sobre ácidos graxos não esterificados (NEFA). Quando o losango se apresentou à esquerda da linha central (média padronizada) sem toca-la, considerou-se que o efeito foi negativo, favorecendo o controle. Quando apresentado à direita da linha central, considerou-se o efeito como positivo, em favor do ácido orgânico.

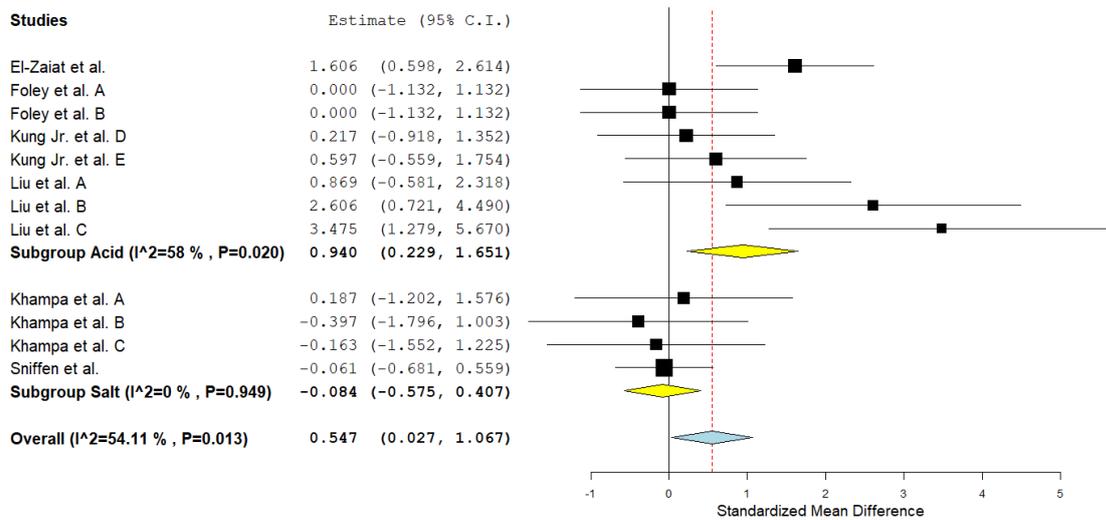


Figura 9 – Forest plot do efeito da suplementação com ácido málico ou malato sobre a digestibilidade da matéria seca. Quando o losango se apresentou à esquerda da linha central (média padronizada) sem toca-la, considerou-se que o efeito foi negativo, favorecendo o controle. Quando apresentado à direita da linha central, considerou-se o efeito como positivo, em favor do ácido orgânico.

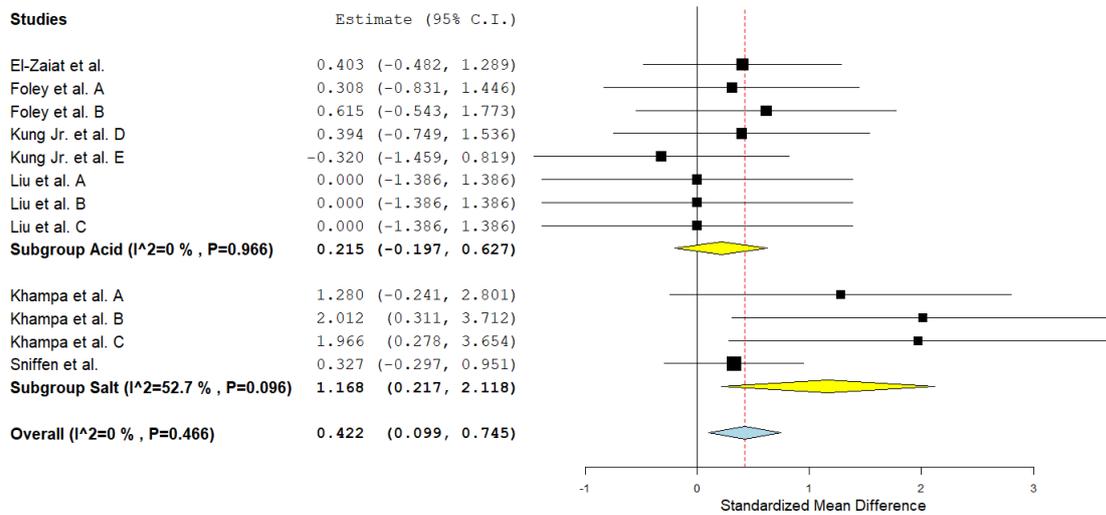


Figura 10 – Forest plot do efeito da suplementação com ácido málico ou malato sobre a digestibilidade da proteína bruta. Quando o losango se apresentou à esquerda da linha central (média padronizada) sem toca-la, considerou-se que o efeito foi negativo, favorecendo o controle. Quando apresentado à direita da linha central, considerou-se o efeito como positivo, em favor do ácido orgânico.

## 7. DISCUSSÃO

De maneira geral, os resultados da suplementação com ácido málico/malato sobre o pH estão dentro do que era esperado do suplemento. No estudo com cordeiros, foi observado aumento significativo do pH em função da suplementação. Para bovinos, embora o efeito geral não tenha se confirmado, quando estratificamos o resultado em função da forma química do suplemento, foi constatado o efeito do malato sobre o pH. Embora o objetivo da análise de subgrupos seja o de explicar a heterogeneidade através de covariáveis categóricas, e não propriamente determinar se há essa diferença de efeito entre as fontes. Estudos realizados por Hernandez et al (2011) e Carrasco et al (2012), indicam que não existe diferença entre as fontes do ácido orgânico sobre a performance, parâmetros ruminais e sanguíneos e que, quando existem efeitos sobre tais variáveis, estes independem da fonte. Assim, é possível que a diferença observada entre as fontes seja oriunda da diferença no consumo de fibra entre os estudos, conforme apontado pela meta-regressão. Ao observados as dietas de cordeiros, onde o efeito geral sobre o pH foi significativo, é possível notar que quase 100% das dietas possuíam elevadas quantidades de concentrado (tabela 1), favorecendo o efeito do AO.

A meta-análise indicou que a suplementação com malato/ácido málico não afetou a presença de lactato no rúmen. Assim como para o pH, a meta-regressão apontou que o consumo de FDN reduz o efeito do AO sobre o lactato. Conforme já abordado anteriormente, a relação entre o AO e as bactérias *Selonomonas ruminantium* para aumentar a captação de lactato no rúmen é o principal fator que tornou o ácido málico em um dos possíveis substitutos dos ionóforos em dietas para ruminantes. Desta forma, esperava-se que essa fosse uma variável recorrentemente avaliada nos estudos onde o AO foi utilizado. Entretanto, em estudos com ovinos, a análise do lactato no rúmen sequer é possível, pois não existe número suficiente de estudos para gerar dados com o mínimo de confiabilidade. Em bovinos, foi possível realizar a análise, embora o número de trabalhos esteja pouco acima do mínimo necessário.

O efeito do ácido málico/malato sobre a produção de ácidos graxos voláteis totais foi confirmado tanto para ovinos quanto para bovinos. Este resultado pode servir de indicativo de que, embora não tenha sido significativo, existe algum nível de captação do lactato no rúmen, já que a formação de AGVs, principalmente propionato, devido a suplementação com o malato depende da captação de lactato no rúmen. Por sua vez, a maior produção de propionato, observada no artigo 3, poderia explicar o aumento na glicose dos bovinos e produção de leite de vacas lactação, conforme observado nos artigos 3 e 1 desta tese, respectivamente. Além disso, poderia ser um dos motivos de aumento do ganho médio diário (GMD) dos cordeiros no

artigo 2. Curiosamente, com exceção a glicose e ao GMD de cordeiros, a meta-regressão apontou covariáveis relacionadas ao consumo de concentrado como as prováveis fontes da variação nos resultados observados para essas variáveis em função da suplementação. Essa resposta confirma resultados obtidos *in vitro* que demonstram que o efeito do malato é mais contundente quando substratos com maior quantidade de amido são utilizados.

## 8. CONCLUSÃO GERAL

Em conclusão, a suplementação com ácido málico é capaz de aumentar o pH e ácidos graxos voláteis no rúmen dos ruminantes. A presença de tais efeitos é reforçada pelo melhor desempenho dos animais, uma vez que o consumo de ácido málico/malato demonstrou ser capaz de aumentar a produção de leite de vacas holandesas e o ganho de peso de cordeiros.

Houve efeito do ácido orgânico sobre a digestibilidade total aparente das principais frações da dieta de bovinos, mas não para ovinos. Além disso, a suplementação implicou em aumento da glicose e diminuição de ácidos graxos não esterificados no sangue, indicando que o consumo de malato pode resultar em menor catabolismo de tecidos corporais.

Para as variáveis relacionadas diretamente a fermentação ruminal como produção de ácidos graxos voláteis e pH, fatores relacionados as dietas, principalmente consumo de amido e fibra, foram capazes de explicar a elevada heterogeneidade dos resultados. Entretanto, tais covariáveis não foram satisfatórias para explicar a variabilidade associada as respostas observadas para digestibilidade da dieta e parâmetros sanguíneos de ruminantes.

## REFERENCIAS

- ASANUMA N., IWAMOTO, M., HINO, T. Effect of the addition of fumarate on methane production by ruminal microorganisms in vitro. **Journal of Dairy Science**. v. 82, n. 4, p. 780–78, 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030299752963>. Acesso em: 10 fev. 2022.
- CALLAWAY, T. R., MARTIN, S. A. Effects of organic acid and monensin treatment on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation of cracked corn. **Journal of Animal Science**, Oxford, v. 74, n. 8, p. 1982-1989, ago. 1996. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/74/8/1982/4637414>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- CARRASCO, C. et al. Effect of malate form (acid or disodium/calcium salt) supplementation on performance, ruminal parameters and blood metabolites of feedlot cattle, **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, n. 1–4, 2012, p. 140-149, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840112002507>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- CARRO, M. D. et al. Effect of DL-malate on mixed ruminal microorganism fermentation using the rumen simulation technique (RUSITEC). **Animal Feed Science and Technology**, v. 79, n. 1, p. 279-288, 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0377840199000346>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- CARRO, M. D., RANILLA, M. J. Effect of the addition of malate on in vitro rumen fermentation of cereal grains. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, n. 89, n. 1, p. 181-188, 2003. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/British-journal-of-nutrition/article/25B1D019BD212C1BC7BDB65DA3C20BC3>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- CARRO, M. D. et al. Effects of malate on diet digestibility, microbial protein synthesis, plasma metabolites, and performance of growing lambs fed a high-concentrate diet, **Journal of Animal Science**, Oxford, v. 84, n. 2, p. 405–410, 2006. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/84/2/405/4804191>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- CARRO, M.D.; UNGERFELD, E.M. **Utilization of organic acids to manipulate ruminal fermentation and improve ruminant productivity**. In: Puniya KA, Singh R, Kamra ND, editors. Rumen microbiology: From evolution to revolution. New Delhi: Springer India; 2015. p. 177–197.
- CASTILLO, C. et al. Organic acids as a substitute for monensin in diets for beef cattle. **Animal Feed Science Technology**, v. 115, n. 1, p. 101–116. 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0377840104000355>. Acesso em: 9 fev. 2022.
- CASTILLO, C. et al. Malic acid supplementation in growing/finishing feedlot bull calves: Influence of chemical form on blood acid–base balance and productive performance, **Animal Feed Science and Technology**, v. 135, n. 3–4, p. 222-235, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840106002999>. Acesso em: 9 fev. 2022.

COHEN, J. **Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences**. 2 ed. Hillsdale: Lawrence Erlbaum Associates, Publishers. 1988. 579p.

CUESTA, A. et al. Efecto de la inclusión de malato en el pienso de corderos en cebo, sobre la ingestión, la digestibilidad y el rendimiento productivo. **ITEA**, Zaragoza, v. 24, n. 2, p. 762-764, 2003. Disponível em: <https://digital.csic.es/handle/10261/13793>. Acesso em: 9 fev. 2022.

DEVANT, M. BACH, A., GARCÍA, J. A. Effect of Malate Supplementation to Dairy Cows on Rumen Fermentation and Milk Production in Early Lactation. **Journal of Applied Animal Research**, v. 31, n. 2, p. 169-172, 2007. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09712119.2007.9706655>. Acesso em: 9 fev. 2022.

ELMALI, A. D. et al. Effects of supplementation with different amounts of malic acid to Tuj lambs diets on fattening performance, rumen parameters and digestibility. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 163, n. 2, p. 70-75, 2012. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/286550673>. Acesso em: 9 fev. 2022.

EL-ZAIAT, H. M. et al. Enhancing lactational performance of Holstein dairy cows under commercial production: malic acid as an option. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 2, p. 885-892, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.9259>. Acesso em: 9 fev. 2022.

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. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030209706423>. Acesso em: 9 fev. 2022.

FOLEY, P. A. et al. Effect of DL-malic acid supplementation on feed intake, methane emission, and rumen fermentation in beef cattle. **Journal of Animal Science**, Oxford, v. 87, n. 3, p. 1048–1057, 2009. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/87/3/1048/4731155>. Acesso em: 9 fev. 2022.

GUAN, H. et al Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. **Journal of Animal Science**. v. 84, n. 10, p.1896–1906, 2006. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/84/7/1896/4778907>. Acesso em: 10 fev. 2022.

GÓMEZ-VÁZQUEZ, A. et al. Fibrolitic exogenous enzymes improve performance in steers fed sugar cane and stargrass. **Livestock Production Science**, n. 82, v. 1-2, p. 249-254, 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0301622603000162>. Acesso em: 9 fev. 2022.

GONZALEZ-MOMITA, M. L., et al. Nutrient intake, digestibility, mastication and ruminal fermentation of Pelibuey lambs fed finishing diets with ionophore (monensin or lasalocid) and sodium malate, **Small Ruminant Research**. v. 83, n. 1–3, p. 1-6, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0921448808002393>. Acesso em: 9 fev. 2022.

HERNÁNDEZ, J. et al. The influence of chemical form on the effects of supplementary malate on serum metabolites and enzymes in finishing bull calves, **Livestock Science**, v. 137, n. 1–3, 2011, p. 260-263, Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1>

871141310005494. Acesso em: 9 fev. 2022.

HIGGINS, J. P., THOMPSON, S, G. Measuring inconsistency in meta-analyses. **The BMj**, v. 327, n. 1, p. 557-560, 2003. Disponível em: <https://www.bmj.com/content/327/7414/557>. Acesso em: 9 fev. 2022.

KHAMPA, S. ET al. Effect of Levels of Sodium DL-malate Supplementation on Ruminal Fermentation Efficiency of Concentrates Containing High Levels of Cassava Chip in Dairy Steers. **Animal Bioscience**, v. 19, n. 3, p. 368-375. Disponível em: <https://www.animbiosci.org/journal/view.php?doi=10.5713/ajas.2006.368>. Acesso em: 9 fev. 2022.

KOZLOSKI, G. V. et al. Níveis de fibra em detergente neutro na dieta de cordeiros: consumo, digestibilidade e fermentação ruminal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.5, p.893-900, 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/gKfSwjXqpKWNKrrsCP76ZTH>. Acesso em: 9 fev. 2022.

KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica de ruminantes**. 3 ed. Santa Maria: UFSM, 2011. 216p

KUNG JR, L. et al. Influence of adding malic acid to dairy cattle rations on milk production, rumen volatile acids, digestibility, and nitrogen utilization. **Journal of Dairy Science**, v. 65, n. 7, p. 1170–1174, 1982. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203028282328X>. Acesso em: 9 fev. 2022.

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. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/animal/article/abs/effects-of-malic-acid-on-rumen-fermentation-urinary-excretion-of-purine-derivatives-and-feed-digestibility-in-steers/9B3223EC0319F6129214656A963A6DA0>. Acesso em: 9 fev. 2022.

LOVATTO, P. A., et al. Meta-análise em pesquisas científicas: enfoque em metodologias. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, suplemento, p. 285-294, 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbz/a/TxB6XwXygrfKhPTmyyYMJrd/?lang=pt>. Acesso em: 9 fev. 2022.

LOYA-OLGUIN, J. L. et al. DL-malic acid supplementation improves the carcass characteristics of finishing Pelibuey lambs. **Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias**, Mérida, v. 10, n. 2, p. 460-472, 2019. Disponível em: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-11242019000200460](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242019000200460). Acesso em: 9 fev. 2022.

LUO, G. et al. Effects of ruminally degradable starch levels on performance, nitrogen balance, and nutrient digestibility in dairy cows fed low corn-based starch diets. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 30, n.5, p. 653–659. 2017. Disponível em: <https://www.animbiosci.org/journal/view.php?doi=10.5713/ajas.16.0371>. Acesso em: 9 fev. 2022.

MALEKKHAHI, M. et al. Effects of supplementation of active dried yeast and malate during sub-acute ruminal acidosis on rumen fermentation, microbial population, selected blood metabolites, and milk production in dairy cows, **Animal Feed Science and Technology**, v. 213, n. 1, p. 29-43, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0377840115301085?via%3Dihub>. Acesso em: 9 fev. 2022.

MALEKKHAHI, M., et al. Effects of essential oils, yeast culture and malate on rumen fermentation, blood metabolites, growth performance and nutrient digestibility of Baluchi lambs fed high-concentrate diets. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, n. 99, v. 2, p. 221-229, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jpn.12230>. Acesso em: 9 fev. 2022.

MARTIN, S. A. et al. Effects of DL-malate on ruminal metabolism and performance of cattle fed a high-concentrate diet. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 4, p. 1008-1015, 1999. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/77/4/1008/4683779>. Acesso em: 9 fev. 2022.

MOHARRERY, A., ASADI, E. Effects of supplementing malate and yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on the rumen enzyme profile and growth performance of lambs. **Journal of Animal and Feed Science**. Jablonna, v. 18, n. 2, p. 283-295, 2009. Disponível em: <http://www.jafs.com.pl/10.22358/jafs/66393/2009>. Acesso em: 9 fev. 2022.

MUNGÓI, M. et al. Effect of malate and starch source on digestibility and nutrient balance of growing-fattening lambs, **Animal Feed Science and Technology**, v. 174, n. 3-4, p. 154-162, 2012. Disponível em: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-11242019000200460](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242019000200460). Acesso em: 9 fev. 2022.

NISBET, D. J., S. A. MARTIN. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* culture on lactate utilization by the ruminal bacteria *Selenomonas ruminantium*. **Journal of Animal Science**, Oxford, v. 69, n.11, p. 4628- 4633, 1991. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/69/11/4628/4654491>. Acesso em: 9 fev. 2022.

OVERLAND, M. Effect of dietary formates on growth performance, carcass traits, sensory quality, intestinal microflora, and stomach alterations in growing-finishing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 7, p. 1875-1884, 2000. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/78/7/1875/4670763>. Acesso em: 9 fev. 2022.

PAPATSIROS, V. G., et al. Alternatives to antibiotics for farm animals. *CAB Reviews*, v. 32, n. 8, p., 1-15, 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Konstantinos-Koutoulis/publication/259233388>. Acesso em: 9 fev. 2022.

SNIFFEN, C. J. et al. Effects of malic acid on microbial efficiency and metabolism in continuous culture of rumen contents and on performance of mid-lactation dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 127, n. 1, p. 13-31, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0377840105003159?via%3Dihub>. Acesso em: 9 fev. 2022.

VYAS, D., BEAUCHEMIN, K. A., KOENIG, K. M. Using organic acids to control subacute ruminal acidosis and fermentation in feedlot cattle fed a high-grain diet. **Journal of Animal Science**, v. 93, n. 8, p. 3950-3958, 2015. Disponível em: <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/93/8/3950/4701771>. Acesso em: 9 fev. 2022.

WANAPAT, M., et al. Changes of rumen pH, fermentation and microbial population as influenced by different ratios of roughage (rice straw) to concentrate in dairy steers. The

**Journal of Agricultural Science**, v. 152, n. 4, p. 675-685, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0021859613000658>. Acesso em: 9 fev. 2022.

WANG, C. et al. Effects of malic acid on feed intake, milk yield, milk components and metabolites in early lactation Holstein dairy cows. **Livestock Production Science**, v. 124, n. 1-3, p. 182-188, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871141309000316>. Acesso em: 9 fev. 2022.

TOPRAK, N. N. Effects of malate supplementation to the concentrate feed on performance, rumen fermentation and carcass yield of lambs fed forage at restricted and ad-libitum level. Ankara, **Ankara Üniv Vet Fak Derg**, v. 66, n. 1, p. 73-81, 2019. Disponível em: <http://vetjournal.ankara.edu.tr/en/download/article-file/836221>. Acesso em: 9 fev. 2022.