

Universidade Federal de Minas Gerais

Desempenho de novilhas Nelore à pasto e cinética da fermentação ruminal da *Urochloa brizantha* cv. Marandu utilizando virginiamicina e/ou monensina sódica

Isabella Cristina de Faria Maciel

Belo Horizonte

2016

Isabella Cristina de Faria Maciel

Desempenho de novilhas Nelore à pasto e cinética da fermentação ruminal da *Urochloa brizantha* cv. Marandu utilizando virginiamicina e/ou monensina sódica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

Área de concentração: Produção Animal

Prof. Orientador: Helton Mattana Saturnino

Prof. Coorientador: Fabiano Alvim Barbosa

Belo Horizonte

2016

Dissertação defendida e aprovada em ___/___/___, pela Comissão Examinadora composta por:

Prof. Helton Mattana Saturnino
(Orientador)

Thierry Ribeiro Tomich

Prof. Ricardo Reis e Silva

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por sempre guiar meus caminhos.

À minha família, que mesmo longe, se fizeram presentes nos momentos mais difíceis. Meu pai Braz e minha mãe Alba Mary, que sempre me apoiaram e não mediram esforços para que eu chegasse até aqui. Vocês são meus exemplos de amor, coragem e dignidade. Aos meus queridos irmãos, Cristiane, Rosiane, Ana Laura e Eduardo que vibram com cada conquista e me incentivam a sempre continuar. Aos cunhados que já fazem parte da família, agradeço pela convivência.

Ao Tiago, pela parceria durante todo o mestrado, meu muito obrigado. Você é muito especial para mim.

Ao meu orientador Prof. Helton Mattana Saturnino, minha eterna gratidão por esses dois anos de orientação. O senhor que foi responsável por me transmitir paz, serenidade e incentivo a buscar ser sempre melhor.

Ao meu co-orientador Prof. Fabiano Alvim Barbosa, por confiar a mim esse projeto e pelos ensinamentos desde a época da iniciação científica.

Ao Prof. Ricardo Reis e ao pesquisador Thierry Ribeiro Tomich pela participação na banca de defesa e pela grande contribuição neste trabalho.

À fazenda Prof. Hélio Barbosa e todos os seus funcionários por ter permitido a realização do primeiro experimento, agradeço em nome do Aílton, pela força dada na parte de campo e pela ótima convivência. Como não agradecer as cozinheiras, pelas deliciosas quitandas e por sempre me tratar tão bem!

À EMBRAPA e todos os seus funcionários e principalmente aos pesquisadores Thierry Ribeiro Tomich e Luiz Gustavo Ribeiro Pereira por permitirem a realização do experimento *in vitro*, que muito enriqueceu a minha dissertação.

Aos colegas de trabalho, pela ajuda durante os períodos mais difíceis dessa caminhada: Helber, José Mauro, Stefanny, Antônio, Saulo, Paula, Patrícia e Fabrício.

À toda escola de Veterinária e seus digníssimos professores, pelos ensinamentos e oportunidades nesses anos de mestrado. E que venham os próximos 4 anos!

À CAPES pela bolsa de estudo.

Às empresas Phibro e Prodap pelo investimento na pesquisa.

Ao Projeto RumenGases por financiar o experimento *in vitro*.

Você nunca sabe que resultados virão de sua ação. Mas se você não fizer nada, não existirão resultados.

Mahatma Gandhi

O rio atinge seus objetivos porque aprendeu a contornar obstáculos.

Lao-Tsé

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	11
RESUMO	13
ABSTRACT	14
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL	15
CAPÍTULO II – REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Produção animal a pasto.....	17
2.2. Uso de aditivos na alimentação de ruminantes	19
2.2.1. Modos de ação da monensina sódica e da virginiamicina.....	20
2.2.2. Fornecimento de aditivos para bovinos em pastejo via suplementos	22
2.2.3. Efeito dos aditivos no consumo de forragem e ganho de peso dos animais.....	24
2.3. Metabolismo da fermentação ruminal.....	26
2.3.1. Efeitos dos aditivos na fermentação ruminal.....	29
2.3.2. Efeito dos aditivos na produção de metano.....	31
2.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
CAPÍTULO III – ARTIGO: VIRGINIAMYCIN AND SODIUM MONENSIN SUPPLEMENTATION FOR BEEF CATTLE ON PASTURE	46
3.1. ABSTRACT.....	47
3.2. INTRODUCTION.....	48
3.3. MATERIALS AND METHODS.....	51
3.4. RESULTS AND DISCUSSION	55
3.5. CONCLUSIONS.....	63
3.6. REFERENCES.....	64
CAPÍTULO IV – CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO RUMINAL DO CAPIM MARANDU UTILIZANDO VIRGINIAMICINA E/OU MONENSINA SÓDICA	68
4.1. INTRODUÇÃO	68
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	69
4.2.1. Local.....	69
4.2.2. Período experimental, animais e tratamentos.....	69
4.2.3. Incubação <i>in vitro</i>	70
4.2.4. Determinação das concentrações de metano (CH ₄) e dióxido de carbono (CO ₂), produção cumulativa de gases e pH	71

4.2.5.	Degradabilidade <i>in vitro</i> da matéria seca e matéria orgânica.....	73
4.2.6.	Produção de gases <i>in vitro</i> e cinética da fermentação ruminal.....	73
4.2.7.	Análises estatísticas.....	74
4.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4.3.1.	Degradabilidade <i>in vitro</i> da matéria seca e da matéria orgânica	75
4.3.2.	Parâmetros da fermentação ruminal - pH.....	77
4.3.3.	Produção de gases e metano.....	79
4.3.4.	Cinética de fermentação ruminal.....	83
4.4.	CONCLUSÕES.....	86
4.5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

LISTA DE TABELAS

Table 1. Centesimal and nutritional composition of energetic mineral supplements1 ...	52
Table 2. Chemical-bromatological composition of Marandu grass during the trial period	57
Table 3. Dry matter intake (DMI), feed efficiency (FE) and animal performance of heifers grazing on Marandu grass receiving energetic mineral supplement with added virginiamycin and/or monensin	60
Tabela 4. Composição bromatológica da silagem de milho fornecida aos animais em cada período experimental.....	70
Tabela 5. Degradabilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (DIVMS) e da matéria orgânica (DIVMO) após 96 horas de incubação de amostras de simulação de pastejo do capim Marandu colhidas em diferentes meses e em função dos aditivos virginiamicina (VM) e/ou monensina (MON)	76
Tabela 6. pH do substrato da fermentação após 24 e 96 horas de incubação de amostras de simulação de pastejo do capim Marandu colhidas em diferentes meses e em função dos aditivos virginiamicina (VM) e/ou monensina (MON)	78
Tabela 7. Produção de gases total e por g de matéria seca (MS) e produção de metano (mL) em 24 horas de incubação de amostras de simulação de pastejo do capim Marandu em função dos aditivos virginiamicina (VM) e/ou monensina (MON).....	80
Tabela 8. Produção total de metano em 24 horas de incubação de amostras de simulação de pastejo da <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu colhidas em diferentes meses e em função dos aditivos virginiamicina (VM) e/ou monensina (MON)	81
Tabela 9. Parâmetros da cinética de fermentação <i>in vitro</i> dos carboidratos não fibrosos (CNF) e dos carboidratos fibrosos (CF) de amostras de simulação de pastejo do capim Marandu colhidas em diferentes meses e em função dos aditivos virginiamicina (VM) e/ou monensina (MON)	83

Tabela 10. Parâmetros de degradabilidade efetiva para as taxas de passagem 2, 5 ou 8% hora ⁻¹ de amostras de simulação de pastejo do capim Marandu colhidas em diferentes meses	85
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Weather data recorded during the trial period.....	51
Figure 2. Herbage allowance in total dry matter (HA TDM), potentially digestible DM (HA pdDM) and green leaf and steam DM (HA LSDM) during the trial period.....	56
Figure 3. Daily voluntary intake of energetic mineral supplement by 4 treatments of heifers during 22 weeks of the rainy season. The regression equations are presented for each treatment. R2: regression coefficient. VC: variation coefficient	59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGCC – Ácidos graxos de cadeia curta
AGV – Ácidos graxos voláteis
CH₄ – Metano
CMS – Consumo de matéria seca
CMO – Consumo de matéria orgânica
CF – Carboidratos fibrosos
CFDN – Consumo de fibra em detergente neutro
CNF – Carboidratos não fibrosos
CO₂ – gás carbônico
CONT – Tratamento controle recebendo suplemento energético mineral
cv. – Cultivar
CV – Coeficiente de variação
DIVMO – Degradabilidade *in vitro* da matéria orgânica
DIVMS – Degradabilidade *in vitro* da matéria seca
DMST – Disponibilidade de matéria seca total
DMSpd – Disponibilidade de matéria seca potencialmente disponível
EA – Eficiência alimentar
EE – Extrato etéreo
ECC – Escore de condição corporal
FDA – Fibra em detergente ácido
FDN – Fibra em detergente neutro
FDAi – Fibra em detergente ácido indigestível
FDNi – Fibra em detergente neutro indigestível
GMD – Ganho médio diário
LIG – Lignina
MM – Matéria mineral
MO – Matéria orgânica
MON – Monensina sódica
MS – Matéria seca
MSV – Matéria seca verde

N₂O – Óxido nitroso

NDT – Nutrientes digestíveis totais

NH₃ – Amônia

NIDA – Nitrogênio insolúvel em detergente ácido

NIDN – Nitrogênio insolúvel em detergente neutro

NO₃ – Nitrato

NRC – National Research Council

OF – Oferta de forragem

PB – Proteína bruta

PV – Peso vivo

PVM^{0,75} – Peso metabólico

t - Toneladas

TNT – tecido não tecido

UA – Unidade animal

VM – Virginiamicina

VM+MON – Associação entre virginiamicina e monensina sódica

RESUMO

Objetivou-se avaliar a inclusão dos aditivos virginiamicina (VM), monensina sódica (MON) e a associação de ambos (VM+MON) no suplemento energético-mineral sobre o desempenho de novilhas Nelore à pasto e sobre a cinética da fermentação ruminal do capim Marandu (*Urochloa brizantha*, sinonímia *Brachiaria brizantha*). No primeiro experimento foram utilizadas 40 novilhas da raça Nelore em delineamento em blocos ao acaso com quatro tratamentos. Os tratamentos consistiram de suplementação energético-mineral (CONT, grupo controle) acrescida de VM (33,5 mg/100 kg PV), MON (18,8 mg/100 kg PV) e a associação VM+MON (26,3 mg/100 kg PV). Os animais foram mantidos em pastagem de capim Marandu no período de janeiro a junho. Os dados de consumo alimentar e desempenho foram analisados e comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A oferta de forragem não foi fator limitante para o desempenho dos animais. Não houve diferença no consumo de pastagem e no ganho médio diário ($0,562 \text{ kg animal}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) para os diferentes tratamentos. A variabilidade no consumo de suplemento e na dose diária ingerida dos aditivos pode ter influenciado o desempenho dos animais. Em um segundo experimento, quatro vacas adultas fistuladas no rúmen foram distribuídas em um quadrado latino 4x4 em esquema fatorial 4x6, sendo os quatro suplementos do primeiro estudo com a inclusão ou não de aditivos no suplemento e seis amostras do capim Marandu colhido nos meses de janeiro a junho para avaliação da cinética ruminal. O líquido ruminal, coletado no 16º dia de cada período, foi misturado ao meio de cultura para formação dos inóculos e para incubação das amostras do capim. Os dados foram comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os aditivos reduziram a degradabilidade *in vitro* da matéria seca do capim Marandu nos meses de melhor qualidade do capim, além de reduzirem em 10% a produção de gases totais. A VM reduziu a produção de metano *in vitro* (mL) em 9,3% comparado a MON e VM+MON e em 16% em comparação ao grupo controle. A associação entre VM e MON proporcionou menor produção de gases da fração dos carboidratos fibrosos e menor taxa de degradação dessa fração. Diante do novo cenário de produção sustentável, a utilização dos aditivos parece ser uma alternativa para bovinos em pastagem, no entanto, estratégias que minimizem as variações na dose diária dos aditivos devem ser avaliadas buscando melhorar o desempenho dos animais.

Palavras-chave: Aditivos, bovinos, braquiária, ionóforo, metano

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the inclusion of virginiamycin (VM), monensin (MON) and the association of these additives (VM+MON) in energetic mineral supplement on the performance of Nelore heifers on pasture and the kinetics of ruminal fermentation of Marandu grass (*Urochloa*, synonymy *Brachiaria brizantha*). In the first experiment, forty Nelore heifers were used in a randomized block design with four treatments. The treatments consisted of energetic mineral supplementation (CONT, control group) added VM (33,5 mg/100 kg WB), MON (18,8 mg/100 kg WB) and the association VM+MON (26,3 mg/100 kg WB). The animals were kept on pasture from January to June. The food intake and performance data were analyzed and compared by Tukey test ($p < 0.05$). The forage offer was not a limiting factor for the animals' performance. There was no difference ($p > 0.05$) at the intake of pasture and average daily weight gain (0.562 kg animal day⁻¹) for the different treatments. The variability in supplement intake and daily intake dose of the additives may have influenced the performance of the animals. In the second experiment, four adult cows fistulated at rumen were distributed in a 4x4 Latin square, in factorial 4x6, four supplements of the first experiment with the inclusion or not of additives in supplement and six Marandu grass samples collected in the months from January to June to evaluate the ruminal fermentation kinetics. The rumen fluid, collected on the 16th day of each period, was mixed to the buffer for the formation of inoculum and for incubation of forage samples. Data were compared by Tukey test ($p < 0.05$). The additives reduced the in vitro degradability of dry matter of Marandu grass in months of better forage quality, besides reducing by 10% the total gas production. The VM reduced the in vitro methane production (mL) by 9.3% compared to MON and VM+MON and 16% compared to the control group. The association between VM and MON provided less gas production of the fibrous carbohydrates fraction and lower rate of degradation of this fraction. Given the new scenario of sustainable production, the use of additives appears to be an alternative for cattle grazing, however strategies to minimize the variations in the daily dose of additives should be evaluated trying to improve animal performance.

Key-words: Additives, braquiaria, cattle, ionophore, methane

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL

A demanda por alimentos de origem animal tem aumentado gradativamente, como consequência do crescimento populacional e aumento da renda. A necessidade de maior produção agrícola aliada às alterações climáticas e a crescente escassez de água e terras agricultáveis direcionam os sistemas pecuários para uma intensificação sustentável, buscando o aumento da produtividade e a redução de impactos ambientais.

A pecuária no Brasil caracteriza-se por apresentar, quase em sua totalidade, uma produção extensiva utilizando grandes áreas de pastagens. A sazonalidade da produção de forragem, que ocorre como consequência de variações climáticas ao longo do ano reflete em diferenças na quantidade e na qualidade das forrageiras em dois períodos característicos, criando assim um desafio à produção animal. Várias estratégias têm sido propostas buscando aumentar a eficiência produtiva e econômica de sistemas de produção onde a forragem é o principal componente da dieta.

O melhor desempenho dos animais utilizando técnicas economicamente viáveis deve ser considerado de alta relevância. O uso de aditivos para bovinos em pastagem é uma estratégia que pode ser utilizada para aumentar a produtividade dos sistemas. Os aditivos promotores de crescimento, como os antibióticos ionóforos e não ionóforos tendem a elevar o ganho de peso, principalmente pela modulação da fermentação ruminal, além de trazer benefícios para o meio ambiente.

Por meio da manipulação do funcionamento do rúmen, a eficiência alimentar pode ser aumentada, como consequência da utilização da fibra, fermentação do lactato e conversão de compostos nitrogenados não proteicos em proteína microbiana. Aditivos como a monensina e a virginiamicina atuam como inibidores de bactérias gram-positivo, produtoras de ácido acético, butírico, láctico e hidrogênio, proporcionando maior disponibilidade de substrato para o crescimento de bactérias gram-negativo, produtoras de ácido propiônico e que atuam retirando o hidrogênio do meio ruminal.

Os aditivos também podem reduzir a produção de metano, a degradação da proteína e a absorção de amônia.

Nesse sentido, torna-se útil o desenvolvimento de pesquisas que visam avaliar o efeito da utilização de aditivos alimentares com potencial de melhorar o desempenho de animais em pastejo, dando suporte para melhorar os índices da pecuária nacional, além da possibilidade de redução das emissões de gases do efeito estufa no ambiente.

Com este trabalho, objetivou-se avaliar a suplementação com virginiamicina e/ou monensina sódica sobre o desempenho de novilhas Nelore em pastagens no período das águas e transição águas-seca e a cinética da fermentação ruminal do capim Marandu.

CAPÍTULO II – REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Produção animal a pasto

As pastagens representam a forma mais prática e econômica de alimentação de bovinos, sendo a base da sustentação da pecuária brasileira (Barbosa et al., 2013). Com a crescente demanda por carne bovina de qualidade e o potencial produtivo de gramíneas forrageiras, o Brasil se apresenta como um grande competidor no mercado mundial (Carvalho et al., 2005).

Devido às alterações climáticas ao longo do ano, ocorre uma sazonalidade quantitativa e qualitativa das plantas forrageiras de clima tropical, com dois períodos bem característicos. As diferenças na composição bromatológica e na disponibilidade de forragem no período das águas e da seca faz com que estratégias de suplementação sejam necessárias para reduzir as deficiências nutricionais das forragens, estimular o consumo e a sua digestibilidade, e conseqüentemente, aumentar o desempenho dos animais (Hoffmann et al., 2014).

No período da seca, as forrageiras tropicais apresentam baixo valor nutritivo, com teores de PB inferiores ao mínimo de 7,0% na matéria seca (MS), limitando a atividade de microrganismos (Milford e Minson, 1966). Conseqüentemente, verifica-se diminuição da digestibilidade da fração fibrosa da forragem e da produção de ácidos graxos voláteis (AGV), importantes fontes de energia para os ruminantes, além de carência proteica e energética nesse período (Minson, 1990). No período chuvoso, em função do aumento das concentrações proteicas das gramíneas e da alta taxa de degradabilidade ruminal desta fração, há um excesso de nitrogênio em relação à disponibilidade de energia. Deste modo, os suplementos passariam a ter maiores teores de energia e minerais.

O baixo consumo de matéria seca (CMS) proveniente da forragem tem sido identificado como um fator limitante para o desempenho de animais em sistemas de pastejo. O CMS é o fator mais importante dentro da nutrição, pois estabelece as quantidades de nutrientes disponíveis para saúde e produção animal (National..., 2001). Nesse sentido, as estimativas de consumo em bovinos de corte são importantes para a predição do ganho de peso, assim como para o estabelecimento dos requisitos nutricionais dos animais, necessários à formulação das dietas.

O consumo e a eficiência de utilização dos nutrientes são resultantes da interação do animal com a dieta ofertada. Para uma alta produção animal em pastagens, três condições básicas devem ser consideradas: 1) deve ser produzida uma grande quantidade de forragem de bom valor nutritivo; 2) uma grande proporção dessa forragem deve ser colhida pelos próprios animais (consumo); e 3) a eficiência de conversão dos animais deve ser elevada. Assim, a produção animal a pasto é o resultado da eficiência de produção de forragem, consumo de forragem pelos animais e conversão da forragem em produto animal (Paulino et al., 2004).

Quando as forrageiras são a única fonte de energia e proteína para bovinos em crescimento, as taxas de ganho de peso podem ser menores que o desejado. Quando as pastagens são bem manejadas, considerando suas capacidades de suporte, as gramíneas tropicais são capazes de promover ganhos de peso elevados durante o período das águas (Euclides, 2002).

A suplementação para bovinos em pastejo consiste em fornecer uma fonte de nutrientes adicionais ao sistema, o que refletiria em mudanças no consumo de forragens, concentrações de nutrientes, disponibilidade de energia dietética, magnitude dos precursores bioquímicos do metabolismo e desempenho animal (Paulino et al., 2004).

A suplementação busca potencializar a ingestão, a digestão da forragem e a assimilação dos nutrientes. Contudo, para que os objetivos sejam atingidos, é necessário que o balanceamento do suplemento respeite as características da forragem disponível e do animal a ser suplementado.

A resposta produtiva à suplementação é afetada por fatores relacionados ao animal, ao pasto, ao suplemento e às interações pasto x suplemento (Paulino et al., 2004). De acordo com esses autores, os fatores mais importantes relacionados ao animal são o mérito genético, o estado fisiológico, a sanidade e o desempenho desejado. Quanto aos fatores relacionados ao pasto, os mais importantes são a oferta de forragem potencialmente digestível (MSPD), que envolve a estrutura do pasto (massa de forragens, altura do pasto, relação folha:colmo) e qualidade do pasto. Em relação ao suplemento, destacam-se a quantidade e tipo de suplemento oferecido.

Uma estratégia de suplementação adequada seria aquela destinada a potencializar o consumo e a digestibilidade da forragem disponível, entretanto, um grande desafio é prever o efeito que a suplementação terá no desempenho animal (Kabeya et al., 2002).

A variação em ganho de peso de animais em pastagem durante a época das águas depende do tipo de pastagem, a produtividade do capim, a taxa de lotação e o nível de

suplementação (Vieira et al., 2005; Moraes et al., 2006; Zervoudakis et al., 2008; Sales et al., 2011). As interações entre forragens e suplementos podem aumentar ou diminuir o consumo de forragem e a disponibilidade de energia da dieta.

2.2. Uso de aditivos na alimentação de ruminantes

A definição de aditivo para produtos destinados à alimentação animal, de acordo com a Normativa 15/2009 do MAPA, é qualquer substância adicionada intencionalmente ao alimento, que não é utilizada normalmente como ingrediente, com a finalidade de conservar, intensificar ou modificar suas propriedades, desde que não altere seu valor nutritivo.

No Brasil, para que um aditivo possa ser registrado, ele deve ser considerado como indispensável à adequada tecnologia de fabricação do produto; deve influir positivamente nas características do produto destinado à alimentação animal, de produtividade dos animais ou dos produtos de origem animal; ser utilizado na quantidade estritamente necessária à obtenção do efeito desejado, respeitada a concentração máxima que vier a ser fixada; além de ser previamente autorizado e registrado pela autoridade competente do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (MAPA, 2004).

Os aditivos podem ser classificados de acordo com seu princípio de atuação. Os promotores de crescimento abrangem o grupo dos antibióticos que são incluídos na alimentação de ruminantes em doses sub-terapêuticas, podendo ser divididos em ionóforos e não ionóforos, de acordo com seu mecanismo de ação. Os ionóforos começaram a ser utilizados a partir da década de 70 e são produzidos principalmente por bactérias do gênero *Streptomyces*. Já o uso de não ionóforos como promotores de crescimento, como por exemplo, a virginiamicina, principalmente para bovinos de corte, é recente e pouco estudado no Brasil, sendo que a virginiamicina tem apresentado efeitos positivos sobre o ganho de peso e eficiência alimentar de ruminantes (Rogers et al., 1995; Coe et al., 1999; Ives et al., 2002).

A restrição ao uso de antibióticos em dietas de animais nos países da Europa, devido a possíveis resíduos dos mesmos nos produtos de origem animal e à possibilidade de resistência cruzada com bactérias causadoras de patologia humana, levou a proibição da utilização de aditivos como a monensina sódica, no ano de 2006 (Directiva 1831/2003/CEE).

Entretanto, Lanna e Medeiros (2007) apontaram que decisões em relação à regulamentação do uso de aditivos no Brasil devam ser baseadas em evidências científicas para que não haja confundimento entre restrição e competição dos produtos de origem animal.

2.2.1. Modos de ação da monensina sódica e da virginiamicina

Os mecanismos de ação de antibióticos ionóforos e não ionóforos ainda não são completamente elucidados na literatura e se baseiam em estudos clássicos (Pressman, 1976; Cocito, 1979; Bergan e Bates, 1984; Russell e Strobel, 1989; Spears, 1990).

A maior parte da literatura que aborda o modo de ação dos ionóforos na nutrição de ruminantes é sobre a monensina sódica (MON), principal promotor de crescimento utilizado no Brasil. Ela se caracteriza como um antibiótico coccidiostático constituído de poliésteres carboxílicos, de baixo peso molecular, capazes de se ligar a íons metálicos e os carrear através da membrana celular dos microrganismos (Pressman, 1976). A MON é produzida por cepas de bactérias *Streptomyces cinnamonensis* (Haney Júnior e Hoehn, 1967).

Os ionóforos são moléculas com uma camada externa hidrofóbica e uma interna hidrofílica onde os átomos de hidrogênio ligam-se a diferentes cátions, como sódio (Na^+), potássio (K^+) e cálcio (Ca^{++}). Após a formação de complexos estáveis, os ionóforos são transportados juntamente com esses íons através da membrana celular. Por serem solúveis quando em contato com as membranas das células, depois de serem combinados com íons, os ionóforos passam a fazer parte da membrana e desempenham as funções de transporte de íons. A monensina possui afinidade pelo Na^+ dez vezes maior que pelo K^+ , catalizando assim, principalmente, as trocas de Na^+ por hidrogênio (H^+) (Bergan e Bates, 1984).

Devido à impermeabilidade da parede celular, os ionóforos não apresentam efeito sobre a maioria das bactérias gram-negativo, por possuírem outra membrana externa além da parede celular (Russel e Strobel, 1989). Segundo Dennis et al. (1986) por não possuírem membrana protetora externa, protozoários e fungos também são sensíveis à monensina.

Russell e Strobel (1989) desenvolveram um modelo para explicar os efeitos da utilização do ionóforo monensina sódica sobre o desenvolvimento da *Streptococcus bovis*, uma bactéria ruminal gram-positivo. Em um momento inicial, a monensina, ao

ligar-se à membrana celular da bactéria, desencadeia a rápida saída de K^+ e entrada de H^+ na célula, provocada pela mudança do gradiente iônico externo. O H^+ acumulado no interior da célula do microrganismo leva a uma diminuição do potencial hidrogeniônico (pH). A célula responde a esta queda no pH exportando H^+ e permitindo a entrada de Na^+ para o seu interior.

Em um segundo momento, o transporte de Na^+ para dentro e de H^+ para fora da célula continua, embora de maneira menos eficiente do que anteriormente. Em algumas situações ainda é utilizada a bomba de próton ATPase, uma outra forma de exportar o H^+ para fora da célula. Desse modo, grande parte da energia produzida pela célula microbiana é utilizada pelas bombas de Na^+/K^+ e de próton ATPase, na tentativa de manter o pH e o balanço iônico celular. Com o passar do tempo, a célula se torna incapaz de continuar metabolizando a glicose, diminuindo a capacidade de crescimento e de reprodução das bactérias que acabam morrendo (Russell e Wallace, 1997).

Assim, a melhoria da eficiência alimentar proporcionada pela monensina é resultante das mudanças na população microbiana do rúmen e, conseqüentemente, no padrão de fermentação dos alimentos.

A virginiamicina (VM) é um antibiótico da classe das estreptograminas, que foi primeiramente descoberta em solos belgas (De Somer e Van Dijek, 1955). A VM é produzida por cepas de bactérias *Streptomyces virginiae* (Ningsih et al., 2011), como uma mistura natural de dois componentes quimicamente diferentes, fator M (um componente do grupo das estreptograminas A) e fator S (um componente das estreptograminas B). Os dois componentes (A e B), classificados como peptídeos, inibem sinergicamente o crescimento de células bacterianas gram-positivo (Cocito, 1979). Individualmente, os componentes A e B são bacteriostáticos, enquanto combinados são bactericidas (Cocito et al., 1997).

A atividade inibidora sinérgica das estreptograminas é atribuída a alterações conformacionais na subunidade ribossômica 50S de bactérias gram-positivo induzida pela ligação de compostos do tipo A, o que inibe a síntese de proteína no interior da célula bacteriana. Os tipos A e B das estreptograminas inibem fases precoces e tardias da síntese de proteína em bactérias gram-positivo, respectivamente (Di Giambattista et al., 1989). A VM não possui efeito sobre a maioria das bactérias gram-negativo devido à impermeabilidade da parede celular (Cocito, 1979).

A incubação isolada dos componentes A e B mostrou que a multiplicação da maioria das bactérias gram-positivo é rapidamente interrompida, mas a proliferação é

reiniciada quando as células são transferidas para meio isento de antibiótico. Quando as bactérias são incubadas com uma mistura dos componentes A e B, a contagem de viáveis diminui dentro de um intervalo de geração (Cocito, 1979).

A concentração inibitória mínima (CIM) da VM em bactérias ruminais foi medida por Cocito (1979), que encontrou valores de CIM de 0,1 a 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para bactérias gram-positivo e de 5 a 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para bactérias gram-negativo.

A suplementação com ionóforos proporciona melhorias na produtividade de bovinos devido a um efeito secundário induzido por inibição do crescimento de bactérias ruminais gram-positivo (Bergan e Bates, 1984). Os ionóforos rompem a barreira da permeabilidade bacteriana, por aumentar o transporte transmembrana de cátions (Chalupa, 1979; Sankaram et al., 1985).

A eficácia de ionóforos está relacionada a composição da dieta, o que irá refletir na concentração de cátions e na proporção destes (por exemplo, Na^+ para K^+) no fluido ruminal (Russel e Strobel, 1989). Esta sugestão foi suportada por Wilman et al. (1994), que demonstraram que a composição mineral, em referência às gramíneas e leguminosas, varia de acordo com a maturidade da planta, por exemplo, a concentração de K^+ diminui e de Na^+ aumenta em plantas de idade avançada. Esse achado possui grande importância prática, já que a qualidade da forragem varia muito entre as espécies, estações, condições ambientais (Van Soest, 1994; Beever et al., 1996; Elizalde et al., 1999) e provavelmente influencia a resposta de ganho de peso dos animais.

2.2.2. Fornecimento de aditivos para bovinos em pastejo via suplementos

O uso de antibióticos ionóforos para bovinos já foi bastante pesquisado, no entanto, antibióticos não ionóforos, como a virginiamicina ainda são pouco explorados no Brasil, principalmente para animais em pastejo. A virginiamicina começou a ser utilizada nos estudos de Lucas e Sobrinho (1989) e Lucas (1989), demonstrando potencial de melhorias no ganho de peso de animais em pastagem. No entanto, somente nos últimos anos, esse aditivo teve maior difusão e utilização via suplementos para bovinos.

De acordo com o Food and Drug Administration Norte-Americano, órgão que autoriza os produtos para alimentação animal, a virginiamicina foi liberada para uso em bovinos, não apresentando riscos ao consumidor (FDA, 2004).

Trabalhos que avaliaram o efeito dos aditivos para animais em pastejo ainda são escassos na literatura, principalmente pela dificuldade de se fornecer tal tecnologia para os animais em sistemas extensivos. A forma de fornecimento de antimicrobianos para bovinos em pastejo mais comum é pela inclusão destes nos suplementos com grãos. No entanto, isso tem grande impacto no custo de produção, seja pela aquisição de grãos ou pelo manejo de fornecimento diário.

O fornecimento de aditivos via suplementos minerais é uma alternativa promissora para animais em pastagem, pela sua fácil implantação, baixo custo e perspectiva de melhora no desempenho animal. Resultados de trabalhos que avaliaram a inclusão de antimicrobianos via suplementos minerais são contraditórios. Limitações como baixo consumo de mistura mineral, alta variação da dose diária e conseqüentemente perda de atividade da molécula são enumerados como possíveis causas da ausência de resultados positivos. Além disso, a incapacidade de medir o consumo de suplemento mineral individual por animais em pastejo dificulta ainda mais os estudos que propõe esse delineamento.

Cockwill et al. (2000) avaliaram a frequência de alimentação e ingestão individual de suplemento mineral por animais de diferentes categorias utilizando cochos automáticos. Os autores observaram que somente 29% do rebanho teve pelo menos uma visita ao cocho por dia e apenas 60,9% das vacas e 21,7% dos bezerros tiveram pelo menos uma visita ao cocho durante o período de seis dias. A variabilidade no consumo diário de mistura mineral por vacas foi de 0 a 0,974 kg/animal.dia⁻¹.

Os aditivos antimicrobianos usados em suplementos de baixo consumo tende a ter menor consumo diário, maior variabilidade de consumo por animal e por dia no decorrer do período de uso. Desta forma, a ingestão do suplemento contendo aditivo antimicrobiano deve ser monitorada e a quantidade de sal ajustada para a obtenção do consumo desejado (Muller et al., 1986).

A variação do consumo do suplemento utilizado para veicular o aditivo antimicrobiano a ser utilizado na dieta de bovinos em pastejo depende mais do manejo nutricional do que da dose diária do aditivo (Velasco et al., 1998).

A ingestão diária de mineral provavelmente não é necessária para satisfazer as exigências nutricionais, no entanto, o consumo regular é fundamental para ação dos aditivos quando estes são adicionados ao suplemento mineral uma vez que atuam principalmente potencializando o metabolismo ruminal (Cockwill et al., 2000).

2.2.3. Efeito dos aditivos no consumo de forragem e ganho de peso dos animais

Os resultados apresentados na literatura são escassos e se mostram bastante controversos quanto aos efeitos dos aditivos no consumo de bovinos, principalmente para animais alimentados exclusivamente com pastagens.

O CMS observado por animais em pastejo pode ter influências da exigência animal, em grande parte determinada pelo tamanho metabólico, qualidade da alimentação, estado fisiológico, genética, ou qualquer combinação destes (Coleman et al., 2014). A impossibilidade de medir e a dificuldade de estimar o consumo de pasto contribuem para escassez de trabalhos na literatura (Coleman et al., 1999).

Trabalhos com animais em confinamento não observaram redução do CMS com a inclusão de monensina (Zinn et al., 1994; Fereli et al., 2010) ou encontraram efeito significativo na redução do consumo de alimentos, com aumento da digestibilidade da dieta quando a monensina foi incluída na alimentação de ruminantes (Medel et al., 1991). Oliveira et al. (2005a) não observaram redução de consumo independente da quantidade de monensina (0, 14, 28 ou 42 mg kg⁻¹ de MS da dieta) adicionada à dieta de novilhas.

Em estudo realizado por Galloway et al. (1993) com novilhos alimentados com uma dieta volumosa de baixa qualidade e suplementados com monensina, os consumos de matéria orgânica (CMO) e de fibra em detergente neutro (CFDN) não foram afetados pela inclusão do aditivo e não houve diferença das digestibilidades da matéria orgânica e da FDN. Rivera et al. (2010) fornecendo dieta composta por 80% de feno de *Cynodon* spp para bovinos também não encontraram diferenças para as digestibilidades da MS e dos nutrientes MO, FDN, fibra em detergente ácido (FDA) e proteína bruta (PB), no entanto foi observado menor consumo para animais recebendo monensina.

Em pastagens, a monensina tem sido responsável por aumentar o ganho médio diário (GMD) em 17% (Chalupa, 1979; DiCostanzo et al., 1996), no entanto há menores informações sobre os efeitos no CMS e conversão alimentar de bovinos de corte consumindo dietas à base de forragem.

Aumento no GMD adicional de 0,075 kg em bovinos de corte consumindo dietas à base de forragem quando suplementados com monensina foi reportado por Bretschneider et al. (2008). Gardner et al. (1999) observaram que novilhos tratados com

monensina tiveram um aumento no GMD de 0,130 kg em comparação à animais que não receberam o aditivo.

Duffield et al. (2012) realizaram uma meta-análise avaliando o impacto da monensina sobre eficiência alimentar (EA), GMD e CMS de bovinos de corte em crescimento e em terminação. Os trabalhos mostraram que fatores como dieta, dose e delineamento das pesquisas interferem na resposta a monensina, mas, de forma geral, a utilização de monensina apresentou redução no CMS em 3% e aumento do GMD e EA em 2,5 e 6,4%, respectivamente.

De acordo com os resultados encontrados por esses autores, a utilização da monensina em dietas compostas misturadas em vagão forrageiro mostrou menor heterogeneidade em comparação com os estudos que incluíram o aditivo em suplementos para as respostas de desempenho dos animais.

A dose média utilizada de monensina foi de 28,1 mg kg⁻¹ de ração e houve efeito linear para GMD com o aumento da dose do ionóforo. Efeitos lineares da dose também foram observados sobre a EA, com máximo valor entre o intervalo de 3 a 15 mg e 44 mg kg⁻¹ de ração, o que concorda com os limites da dose aprovada de monensina para aumento da EA (6 a 49 mg kg⁻¹ de ração) (Duffield et al., 2012).

Em uma revisão sobre os efeitos de antibióticos promotores de crescimento no desempenho de bovinos de corte consumindo dietas baseadas em forragens, Bretschneider et al. (2008) mostraram que melhorias na qualidade da forragem reduzem a taxa de GMD em resposta à suplementação com aditivos para bovinos. Esse resultado concorda com o de Duffield et al. (2012) que observaram que quanto maior o GMD de animais do grupo controle, ou seja animais recebendo uma dieta de melhor qualidade, menor é o efeito da monensina sobre o GMD.

Os resultados experimentais de vários estudos compilados mostraram que bovinos de corte consumindo dietas à base de forragem podem aumentar o GMD e melhorar a conversão alimentar de uma maneira dose-dependente com a utilização de ionóforos, com pouco ou nenhum efeito sobre o CMS (Bretschneider et al., 2008).

Embora já tenha sido confirmado que os antimicrobianos melhoram o desempenho de bovinos de corte em pastagem (Ellis et al., 1984), a sua utilização é limitada, provavelmente devido ao trabalho requerido para a sua administração em condições de pastejo (Davenport et al., 1989).

Para a virginiamicina, a literatura tem se mostrado escassa no que se refere a resultados de desempenho para bovinos em pastagens. Alves Neto et al. (2013) testaram

diferentes doses de VM (0, 35, 55 e 75 mg de VM/100 kg de peso vivo) para bovinos da raça Nelore criados a pasto. Os autores encontraram efeito quadrático ($P < 0,05$) para ganho de peso e ganho de carcaça, com o melhor desempenho para a dose de 47 mg/100 kg de PV.

Ferreira et al. (2011) trabalhando com bovinos em sistema de pastejo rotacionado de *Panicum maximum* no período chuvoso observaram que a virginiamicina (100 mg animal dia⁻¹) aumentou o ganho de peso em 25,5% (0,131 kg dia⁻¹) quando comparado ao grupo controle. Essa dose correspondeu a 31,8 mg de VM/100 kg de PV.

O uso combinado da virginiamicina com o ionóforo salinomicina para bovinos da raça Nelore terminados com dietas de alto concentrado reduziu o consumo de matéria seca em comparação aos animais que não receberam VM, além de proporcionar maior eficiência de utilização da energia metabolizável (Nuñez et al., 2013). Os autores atribuem essa melhoria a possível alteração do padrão de fermentação ruminal promovida pela VM, bem como pela atuação do antibiótico no intestino, como ocorre em monogástricos. A redução no consumo pode ser consequência da limitação energética, onde os animais alcançaram o seu potencial de ganho de peso. Essas justificativas se basearam nos trabalhos de Hedde et al. (1980) e Nagaraja et al. (1987) que verificaram em ensaios *in vitro* aumento na concentração de ácido propiônico com uso da virginiamicina.

O efeito da salinomicina, virginiamicina ou a combinação destas sobre o desempenho de novilhos Nelore também foi avaliado por Silva et al. (2004), fornecendo dietas contendo 77% de concentrado. Estes autores não verificaram diferenças no ganho de peso dos animais tratados com virginiamicina ou salinomicina isoladamente em relação ao controle. No entanto, os animais que receberam os dois aditivos combinados apresentaram ganho de peso 17,9% superior ao do tratamento controle. A eficiência alimentar não diferiu entre os tratamentos, uma vez que os animais que ganharam mais peso também ingeriram mais alimentos.

Ives et al. (2002) não encontraram diferenças entre os consumos de MS, MO e PB para animais suplementados com VM ou associação entre monensina e tilosina. Murray et al. (1992) observaram redução no CMS quando a VM foi adicionada na dose superior a 20 mg kg⁻¹ de ração em dietas de ovinos.

2.3. Metabolismo da fermentação ruminal

Para o desenvolvimento de uma população microbiana, os animais precisam manter o ambiente ruminal em condições adequadas para que a fermentação aconteça normalmente. Essas condições incluem uma faixa de osmolaridade que pode variar entre 260 e 340 mOsm, mantida razoavelmente constante, pH entre 5,5 e 7,2; temperatura média de 39°C e potencial redox entre -250 e -450 mV (Owens e Goetsch, 1988).

Os nutrientes dos alimentos são transformados em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e em gases como metano, dióxido de carbono e hidrogênio (H₂) (Baker, 1999). Os AGCC são estruturas hidrossolúveis, constituídas de um a sete átomos de carbonos, os quais incluem os ácidos fórmico, acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico, 2-metil-butírico, hexanoico e heptanoico (Bergman, 1990). São considerados resíduos da fermentação dos microrganismos por serem produtos do metabolismo microbiano e, para o ruminante, representam a principal fonte de energia.

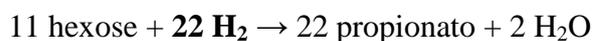
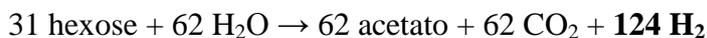
De acordo com Kozloski (2009) a energia presente nos AGCC representa, aproximadamente, 75% a 80% da energia originalmente presente nos carboidratos fermentados e normalmente, contribuem em 50% a 70% da energia digestível do alimento. Todos os carboidratos digeridos no rúmen transformam-se em AGCC, sendo os predominantes os ácidos acético (C₂H₄O₂), propiônico (C₃H₆O₂) e butírico (C₄H₈O₂).

Para obtenção do máximo rendimento energético da fermentação anaeróbia de carboidratos é necessário que o hidrogênio produzido seja utilizado, fazendo com que ocorra a regeneração da nicotinamida adenosina difosfato (NAD⁺). No rúmen, a principal utilização de H₂ ocorre quando microrganismos metanogênicos utilizam o H₂ livre para reduzir o gás carbônico e formar o metano em processo denominado metanogênese (Kozloski, 2009). Assim, a forma como o H₂ é utilizado no rúmen é o elemento chave para o controle da emissão de metano por ruminantes, devido à produção de metano no rúmen ser diretamente proporcional à concentração de H₂ no ambiente ruminal (Czerkawski et al., 1972). De acordo com McDonald et al. (2002) após a fermentação do alimento no rúmen, a energia perdida na forma de metano pode representar entre 11% e 13% da energia digestível.

A produção dos gases ruminais pode ser explicada por equações que evidenciam a perda de hidrogênio e carbono de acordo com cada tipo de ácido graxo formado. Segundo Hungate (1966), supondo proporção de ácidos graxos de cadeia curta em amostra de líquido ruminal de 62% para o ácido acético, 22% para o ácido propiônico e 16% para o ácido butírico, a maior produção de H₂ ocorre durante a produção do ácido

acético, o que acarreta maior produção de metano, já que o H₂, para ser eliminado, liga-se a moléculas de CO₂ durante a metanogênese.

EQUAÇÕES:

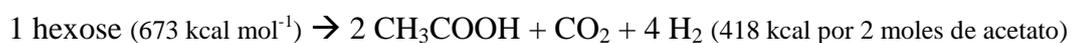


A manipulação da fermentação ruminal se caracteriza como todo processo que possa alterar o metabolismo normal do rúmen. Com base no conhecimento dos processos fermentativos e da microbiota que habita o rúmen, têm sido desenvolvidas alternativas visando manipular a fermentação ruminal para aumentar o aproveitamento das dietas pelos animais.

No ambiente ruminal, o metano é produzido anaerobicamente, onde os microrganismos metanogênicos obtêm energia e carbono de H₂ e CO₂ pela via metanogênica. O processo de metanogênese consiste de uma série de reações de redução em que um carbono derivado do gás carbônico é ligado a um carreador. A síntese do formil metano furano é o primeiro passo da metanogênese, em que o CO₂ é ligado ao metano furano e reduzido ao estado formil com elétrons derivados do hidrogênio (Thauer, 1998).

Para cálculos estequiométricos, considerando os valores teóricos de calor de combustão (kcal mol⁻¹): acetato = 209, propionato = 367, butirato = 524 e glicose = 673, Church (1988) demonstra-se de maneira resumida o balanço das trocas energéticas que ocorrem na formação dos diferentes ácidos graxos voláteis:

ACETATO:



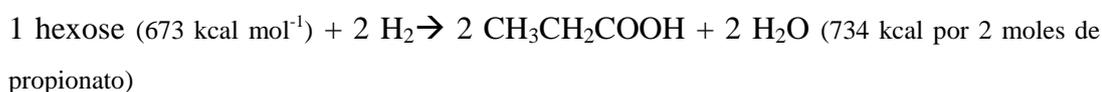
418 – 673 = - 252 kcal perdidas para formação de acetato.

BUTIRATO:



524 – 673 = - 146 kcal perdidas para formação de butirato.

PROPIONATO:



734 – 673 = + 61 kcal ganhas para formação de propionato.

Portanto, a alteração da rota de fermentação para a produção de ácido propiônico tem potencial para melhorar a eficiência de uso da energia. Em dietas de forragem, os AGV contribuem com 50 a 85% da energia metabolizável pelo ruminante (Church, 1988).

2.3.1. Efeitos dos aditivos na fermentação ruminal

As alterações na fermentação ruminal são geralmente atribuídas a mudanças da população microbiana (Nagaraja e Taylor, 1987).

A susceptibilidade e a resistência das bactérias ruminais a diversos antimicrobianos foi estudada por Nagaraja e Taylor (1987) que definiram a concentração inibitória mínima para vários microrganismos. Foi observado que, em geral, as bactérias ruminais produtoras de ácidos láctico, butírico e fórmico ou produtoras de hidrogênio foram sensíveis, enquanto as bactérias que produzem ácido succínico ou fermentam ácido láctico foram resistentes aos antimicrobianos. Esses autores apontam que a maior produção de propionato em animais alimentados com antibióticos, como a VM, relaciona-se a um aumento tanto de bactérias produtoras de succinato como das fermentadoras de lactato.

Mudanças na população de microrganismos ruminais faz com que haja mudança nos produtos finais da fermentação com maior quantidade de propionato em relação ao acetato, o que segundo Schelling (1984) proporciona maior eficiência metabólica, uma vez que o propionato é o único ácido graxo de cadeia curta utilizado para síntese de glicose no fígado e tem possibilidade de ser oxidado diretamente no ciclo do ácido tricarboxílico.

A seleção de bactérias gram-negativo no rúmen proporciona maior produção de propionato, fazendo com que o hidrogênio seja retirado do meio ruminal, podendo reduzir a formação de metano, e conseqüentemente melhorar a eficiência energética na utilização da dieta.

A monensina e a virginiamicina inibem seletivamente bactérias gram-positivo e conseqüentemente, afetam o metabolismo ruminal por aumentar a eficiência do metabolismo energético, além de melhorar o metabolismo do nitrogênio (Schelling, 1984).

A monensina altera a proporção de AGV no rúmen, aumentando a produção de ácido propiônico e reduzindo as porcentagens molares dos ácidos butírico e acético (Richardson et al., 1976; Prange et al., 1978), fornecendo assim mais energia a partir dos alimentos para o animal devido ao aumento da oferta de glicose, pois o aumento da produção de ácido propiônico no rúmen aumenta a gliconeogênese hepática (Lomax et al., 1979; Baird et al., 1980).

Estudos indicam que a produção total de AGV é pouco afetada com a utilização de ionóforos, o que se observa é uma significativa alteração nas proporções relativas desses ácidos graxos. Enquanto as concentrações de ácido acético e butírico diminuem ou se mantêm, a de ácido propiônico aumenta significativamente em resposta ao aditivo (Russell e Wallace, 1997).

Ruiz et al. (2001) trabalhando com adição de monensina na forragem fresca na dose de 350 mg animal dia⁻¹ verificaram redução da proporção acetato:propionato para a dieta com ionóforo (3,8 *versus* 3,1). Oliveira et al. (2005b) forneceram feno de *Brachiaria decumbens* com concentrado de alta (16,5%) ou baixa (11,4%) proteína e inclusão ou não de monensina (28 mg kg⁻¹ de CMS) para novilhos e observaram aumento de propionato e redução de butirato e da proporção acetato:propionato, indiferente do teor de PB. O fornecimento de forragem de baixa qualidade, com adição de monensina (200 mg animal⁻¹ dia⁻¹) proporcionou menor relação acetato:propionato e menor concentração de AGV quando comparado com a dieta sem monensina.

Animais alimentados com feno de baixa qualidade e monensina (40 mg por 100 kg de PV dia⁻¹) tiveram menor proporção de acetato e maior de propionato do que animais que não receberam o aditivo, no entanto não houve diferença para o total de AGV (Linneen et al., 2015).

Os resultados de estudos com a utilização da virginiamicina se assemelham com os da utilização da monensina. Hedde et al. (1983), Van Nevel et al. (1984) e Coe et al. (1999) mostraram maior produção de propionato em fluidos ruminais com a adição de virginiamicina, no entanto sem alterar a produção total de AGV no rúmen. Coe et al. (1999) observaram que a administração de VM diminuiu a proporção de acetato e aumentou a proporção de propionato. Candanosa et al. (2008) também observaram redução de acetato em amostras de líquido ruminal de ovelhas alimentadas com VM. Hedde et al. (1980) não observaram mudanças na concentração de ácido propiônico, AGV totais, amônia e ureia no rúmen de novilhos alimentados com 33 mg de VM kg⁻¹ de concentrado (dieta de 82% de concentrado).

Quanto à dosagem de ácido láctico em amostras ruminais, alguns trabalhos mensuraram as concentrações totais e outros quantificaram o ácido láctico separadamente, em L e D-lactato. De acordo com Nagaraja et al. (1987), o L-lactato foi o isômero predominante nas amostras avaliadas e o D-Lactato representou 10 a 20% do ácido láctico total. Esses autores mostraram que a VM foi extremamente efetiva em reduzir a concentração de ácido láctico. Essa redução na produção do ácido L-lactato pode chegar a 20% (Hedde et al., 1980) em comparação com o grupo não tratado com VM e ocorre com maior intensidade nas primeiras 36 horas (Coe et al., 1999).

Os valores de lactato ruminal em novilhos tratados com VM mantiveram-se abaixo de 2,0 mM, enquanto novilhos do grupo controle e alimentados com associação de monensina e tilosina atingiram 19,4 e 15,8 mM, respectivamente. Salinas-Chavira et al. (2009) não observaram diferenças quanto a produção de ácido láctico. Guo et al. (2010) forneceram dieta com 65% de concentrado para novilhos, contendo 30 mg de VM kg⁻¹ de concentrado, o que resultou no consumo de 19,5 mg de VM kg⁻¹ de CMS e também não observaram mudanças na concentração de ácido L-lactato no fluido ruminal.

Três alterações que ocorrem com o uso ionóforo foram apontadas por Kunkle et al. (2000) e também podem ser extrapoladas para os antibióticos não ionóforos:

- 1) aumento da produção de propionato e diminuição da produção de metano;
- 2) diminuição da degradação proteica e a deaminação de aminoácidos;
- 3) diminuição da produção de ácido láctico.

Essas mudanças no perfil de fermentação e na degradação de proteínas podem melhorar a eficiência de utilização dos nutrientes, permitindo a captação de nutrientes mais dietéticos para crescimento e produção (Kunkle et al., 2000).

2.3.2. Efeito dos aditivos na produção de metano

A relativa escassez de dados sobre a produção de CH₄ por ruminantes alimentados com forrageiras tropicais (Archimède et al., 2011) sugere a necessidade de estudos adicionais.

A pecuária brasileira é apontada como uma grande emissora de gases de efeito estufa (GEE) principalmente devido aos baixos índices zootécnicos obtidos nos sistemas de exploração animal (Pereira et al., 2015). De acordo com O'Mara (2011), a pecuária é responsável por aproximadamente 18% dos GEE emitidos no mundo, sendo os realmente significativos o gás carbônico (CO₂), metano (CH₄) e óxido nitroso (N₂O).

No rúmen, a interação da população microbiana com o alimento converte os carboidratos em AGV, em especial ácido acético, propiônico e butírico que são utilizados pelo ruminante como fonte de energia, além de produzir amônia, utilizada para síntese microbiana e gerar energia na forma de ATP (adenosina tri-fostato) para o próprio crescimento microbiano (Berchielli et al., 2003). Nesse processo fermentativo também são produzidos o CO₂ e CH₄, dependendo da concentração e das proporções relativas dos ácidos produzidos, e ainda nitrato (NO₃) e hidrogênio (H₂) sendo que este último sofre ação dos organismos metanogênicos a fim de manter o pH do rúmen em valores toleráveis, produzindo assim CH₄ (Owens e Geetsch, 1988; Schofield, 2000; Eun et al., 2004).

A variabilidade nas emissões entéricas de metano por ruminantes pode estar relacionada ao tamanho do animal, as possíveis diferenças na flora ruminal, a digestibilidade da dieta, ao tamanho de partículas, a composição química da dieta e principalmente a quantidade e qualidade da forragem consumida (McAllister et al., 1996; Primavesi et al., 2004a e b).

As bactérias metanogênicas não tem sua quantidade nem sua diversidade alterada com o uso de ionóforos (Hook et al., 2009), no entanto a população de bactérias gram-positivo é diminuída, favorecendo o desenvolvimento das gram-negativo. As bactérias classificadas como gram-positivo, mais susceptíveis aos ionóforos, são responsáveis pela maior produção de amônia (NH₃), como as *Clostridium* e *Peptostreptococcus*, de lactato, como as *Streptococcus* e *Lactobacillus*, dos ácidos acético e butírico, como as *Butyrivibrio*, *Ruminococcus* e *Fibrobacter*; e de gás carbônico e metano.

Ao mudar o perfil de fermentação, há redução da disponibilidade de H₂ para as bactérias metanogênicas, com provável defaunação dos protozoários produtores de H₂, que são colonizados pelas metanogênicas (McAllister et al., 1996). Assim, os efeitos dos antibióticos ionóforos e não ionóforos sobre as mudanças na proporção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) durante o processo de fermentação ruminal tem relação direta com a produção de metano.

Em estudo sobre o efeito da monensina na metanogênese, Beauchemin et al. (2008) concluíram que doses menores que 20 mg de monensina por kg de ração na dieta nem sempre terão efeito sobre a produção de CH₄. Doses mais elevadas (24 a 35 mg kg⁻¹) diminuem a produção de CH₄ de 4 a 10% (Odongo et al., 2007). No estudo de Guan et al. (2006) 30% do CH₄ foi reduzido com a dose de 33 mg kg⁻¹ de ração.

Alguns estudos de longo prazo sugeriram que a inibição da metanogênese por ionóforos não pode persistir por muito tempo. A monensina pode ser utilizada para diminuir a emissão de CH₄ em curto prazo, e também para melhorar a eficiência da utilização de alimentos em ruminantes (Guan et al., 2006).

Os resultados de emissão de metano por bovinos, especialmente em condições tropicais, tem se baseado apenas em estimativas, em função das metodologias disponíveis para tal avaliação. Lana e Russell (2001) estimaram a produção de metano *in vitro*, por bovinos alimentados com capim Timóteo (*Phleum pratense*) e concentrado à base de milho e farelo de soja. Esses autores observaram que a redução de metano ocorreu mesmo com pequena concentração de monensina para animais alimentados com forragem, e a resposta foi ainda maior quando dietas com altos teores de monensina foram fornecidas aos animais. Os autores concluíram que a monensina pode ter maior benefício no desempenho de bovinos em pastagens ou em dietas contendo elevado nível de volumoso em comparação àquelas ricas em concentrado.

Rivera et al. (2010) não observaram diferença na produção de metano estimada *in vitro*, proveniente de bovinos alimentados com feno de capim Tifton-85 (*Cynodon* spp.) e concentrado na proporção 80:20, suplementados com monensina e um complexo de leveduras, ácidos graxos poliinsaturados e aminoácidos. Os autores ressaltaram que, embora a produção de metano não tenha apresentado resposta à monensina, a utilização desse aditivo proporcionou numericamente, menor produção de metano em comparação ao não fornecimento com valores de 22,29 e 23,78 ml/g MS, respectivamente.

Appuhamy et al. (2013) realizaram uma meta-análise para avaliar os efeitos anti-metanogênicos da monensina. Esses autores observaram que a monensina reduziu a energia perdida na forma de metano de 5,97 para 5,43% e que dietas com maiores teores de FDN tenderam a aumentar o efeito da monensina sobre a redução do CH₄ em bovinos de corte.

Trabalhos relataram que a virginiamicina pode atuar como um inibidor da produção de metano (Van Nevel et al., 1984; Godfrey et al., 1995; Nagaraja et al., 1995a, 1995b; Van Nevel e Demeyer, 1996), devido ao aumento das concentrações de propionato quando animais são alimentados com VM. Nagaraja et al. (1995a) sugeriram outras possibilidades para explicar a inibição da produção de metano, como a inibição de protozoários, o efeito tóxico direto sobre bactérias produtoras de metano, ou por alterar

o padrão de fermentação ruminal com aumento de propionato, o que direciona o hidrogênio para outra rota metabólica que não a produção de metano.

Finlay et al. (1994) estabeleceram ligação entre produção de metano e protozoários devido a fixação de bactérias metanogênicas à superfície de protozoários, sugerindo um efeito de simbiose entre os microrganismos. Murray et al. (1992) observaram redução do número de protozoários com a adição de VM. Menores quantidades de *Entodinium* (protozoário ciliado) também foram observadas em ovinos alimentados com grãos e VM (Nagaraja et al., 1995a).

No estudo de Clayton et al. (1996) foi observado redução da produção de metano por ovinos durante três dias consecutivos após a inclusão de concentrado com VM (15mg kg⁻¹ de CMS) na dieta exclusiva de feno. Houve aumento nas concentrações de propionato quando a VM foi adicionada à dieta com concentrado, mostrando que a ação primária de VM pode ser aumentar as concentrações de propionato e assim reduzir a quantidade de hidrogênio disponível para a produção de metano. Coe et al. (1999) também avaliaram a composição dos protozoários ciliados no rúmen, no entanto, não encontraram nenhum efeito da adição de VM sobre esses microrganismos.

2.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES NETO, J. A.; BENATTI, J. M. B.; MOREIRA, A. D. et al. Determination the best dose of virginiamycin in supplements for Nellore cattle in pasture. In: ANNAL MEETING OF BRAZILIAN SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE, 2013, Campinas. *Anais...* Campinas, 50 ed. Annal Meeting of Brazilian Society of Animal Science, 2013.

APPUHAMY, J. A. D. R. N.; STRATHE, A. B.; JAYASUNDARA, S. et al. Anti-methanogenic effects of monensin in dairy and beef cattle: A meta-analysis. *J. dairy scie.*, v.96, n.8, p.5161-5173, 2013.

ARCHIMÈDE, H.; EUGÈNE, M.; MAGDELEINE, C. M. et al. Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. *Anim. Feed Sci. Technol.* v.166, p.59-64, 2011.

BAIRD, G. D.; LOMAX, M. A.; SYMONDS, H. W.; SHAW, S. R. Net hepatic and splanchnic metabolism of lactate, pyruvate and propionate in dairy cows in vivo in relation to lactation and nutrient supply. *Biochem. J.*, v.186, p.47-57, 1980.

BAKER, S.K. Rumen methanogens and inhibition of methanogenesis. *A. J. Agric. Res.*, v.50, n.8, p.1293-1298, 1999.

BARBOSA, F. A.; MAIA FILHO, G. H. B.; AZEVEDO, H. O. et al. Rentabilidade na Recria e terminação de bovinos em pastagem. In: ENCONTRO DE APRIMORAMENTO DA PECUÁRIA DE CORTE: RECRIA E TERMINAÇÃO EM PASTAGEM. Montes Claros, 1 ed., v.1, p.129-150, 2013.

BEAUCHEMIN, K. A.; KREUZER, M.; O'MARA, F.; MCALLISTER, T. A. Nutritional management for enteric methane abatement: A review. *Aust. J. Exp. Agric.*, v.48, p.21-27, 2008.

BEEVER, D. E.; GARNSWORTHY, P. C.; COLE, D. J. A. Characterisation of forages: appraisal of current practice and future opportunities. In: RECENT DEVELOPMENT In: RUMINANT NUTRITION, GARNSWORTHY, P.C., Cole,D.J.A. (Eds.), v.3, p.113-127, 1996.

BERCHIELLI, T. T.; PEDREIRA, M. S.; OLIVEIRA, S. G. et al. Determinação da produção de metano e pH ruminal em bovinos de corte alimentados com diferentes relações volumoso:concentrado. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40, Santa Maria/RS. *Anais...* Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; SBZ, 2003.

BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol. Rev.*, v.70, n.2, p.567-590,1990.

BERGAN, W. G.; BATES, D. B. Ionophores: Their effect on production efficiency and mode of action. *J. Anim. Sci.*, v.58, p.1465-1483, 1984.

BRETSCHNEIDER, G.; ELIZALDE, J. C.; PÉREZ, F. A. The effect of feeding antibiotic growth promoters on the performance of beef cattle consuming forage-based diets: A review. *Livest. Sci.*, v.114, n.2, p.135-149, 2008.

CANDANOSA, E.; VILLA-GODOY, A.; CASTILLO, D. A.; MENDOZA, G. D. Effects of monensin, virginiamycin and sodium bicarbonate on ruminal fermentation and acid-base status in sheep. *J. Anim. Vet. Advan.*, v.7, n.2, p.184–189, 2008.

CARVALHO, F. A. N.; BARBOSA, F. A.; MADOWELL, L. R. *Nutrição de Bovinos a Pasto*. Ed. 2, Belo Horizonte: Editora Papel form, 2005. 438 p.

CHALUPA, W. Chemical control of rumen microbialmetabolism. In: Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants. In: FIFTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RUMINANT PHYSIOLOGY. Clermont-Ferrand, p. 325–347, 1979.

CHURCH, D.C. The ruminant animal digestive physiology and nutrition. Prentice Hall, 1988.

CLAYTON, E. H.; HANSCH, E. J.; HUIJNEN, P. T. A. J.; ROWE , J. B. Controlling methane production with virginiamycin. *Aust. Soc. Anim. Prod.*, v.21, p.239-242, 1996.

COCITO, C. Antibiotics of the virginiamycin family, inhibitors which contain synergistic components. *Microbiol. Rev.*, v.43, p.145-198, 1979.

COCITO, C.; DI GIAMBATTISTA, M.; NYSSSEN, E.; VANNUFFEL, P. Inhibition of protein synthesis by streptogramins and related antibiotics. *J. Antimic. Chemot.*, v.39, p.7-13, 1997.

COCKWILL, C. L., MCALLISTER, T. A., OLSON, M. E. et al. Individual intake of mineral and molasses supplements by cows, heifers and calves. *Can. J. Anim. Sci.*, v.80, n.4, p.681-690, 2000.

COE, M. L.; NAGARAJA, T. G.; SUN, Y. D. et al. Effect of virginiamycin on ruminal fermentation in cattle during adaptation to a high concentrate diet and during an induced acidosis. *J. Anim. Sci.*, v.77, p.2259-2268, 1999.

COLEMAN, S. W.; GUNTER, S. A.; SPRINKLE, J. E.; NEEL, J. P. S. Beef Species Symposium: Difficulties associated with predicting forage intake by grazing beef cows. *J. Anim. Sci.*, v.92, n.7, p.2775-2784, 2014.

COLEMAN, S. W.; LIPPKE, H.; GILL, M. Estimating the nutritive potential of forages. *Am. Soc. Anim. Sci.*, Savoy, IL. p.647-695, 1999.

CZERKAWSKI, J.W.; HARFOOT, C.G.; BRECKENRIDGE, G. The relationship between methane production and concentrations of hydrogen in the aqueous and gaseous phases during rumen fermentation “*in vitro*”. *J. Appl. Bact.*, Oxford, v.35, p.537-551, 1972.

DAVENPORT, R. W.; GALYEAN, M. L.; BRANINE, M. E.; HUBBERT, M. E. Effects of a monensin ruminal delivery device on daily gain, forage intake and ruminal fermentation of steers grazing irrigated winter wheat pasture. *J. Anim. Sci.*, v.67, p.2129-2139, 1989.

DE SOMER, P.; VAN DIJEK, P. A preliminary report on antibiotic n° 899 - a streptogramin-like substance. *J. Antimic. Chemot.*, v.5, p.632-639, 1955.

DENNIS, S. M.; NAGARAJA, T. G.; DAYTON, A. D. Effect of lasalocid, monensin and thiopeptin on rumen protozoa. *Res. Vet. Sc.*, v.41, n.2, p.251-256, 1986.

DI GIAMBATTISTA, M.; CHINALI, G.; COCITO, C. The molecular basis of the inhibitory activities of type A and type B synergimycins and related antibiotics on ribosomes. *J. Antimic. Chemot.*, v.24, p.485-507, 1989.

DICOSTANZO, A.; CASSADY, J. M.; ZEHNDER, C. M. Utilization of approved feed additives in growing, finishing and replacement beef cattle diets. In: 57th MINNESOTA NUTRITION CONFERENCE AND PROTIVA TECHNICAL SYMPOSIUM, Bloomington, Minnesota, p. 81–96, 1996.

DUFFIELD, T. F.; MERRILL, J. K.; BAGG, R. N. Meta-analysis of the effects of monensin in beef cattle on feed efficiency, body weight gain, and dry matter intake. *J. Anim. Sci.*, v.90, n.12, p.4583-4592, 2012.

ELIZALDE, J. C.; MERCHEN, N. R.; FAULKNER, D. B. Fractionation of fiber and crude protein in fresh forages during the spring growth. *J. Anim. Sci.*, v.77, p.476–484, 1999.

ELLIS, W. C.; HORN, G. W.; DELANEY, D.; POND, K. R. Effects of ionophores on grazed forage utilization and their economic value for cattle on wheat pasture. In: PROC. NAT. WHEAT PASTURE SYMP. Oklahoma State University, MP-115, p. 343–355, 1984.

EUCLIDES, V. P. B. Produção de carne em pasto. In: III SIMPÓSIO DE FORRAGICULTURA E PASTAGENS. p. 03-04, 2002.

EUN, J. S.; FELLNER, V.; GUMPERTZ, M. L. Methane production by mixed ruminal cultures incubated in dual flow fermentors. *J. Dairy Sci.*, v.87, p.112-121, 2004.

FERELI, F.; BRANCO, A. F.; JOBIM, C. C. et al. Monensina sódica e *Saccharomyces cerevisiae* em dietas para bovinos: fermentação ruminal, digestibilidade dos nutrientes e eficiência de síntese microbiana. *Rev. Bras. Zootec.*, v.39, n.1, p.183-190, 2010.

FERREIRA, S. F.; FERNADES, J. J. R.; PADUA, J. T. et al. Parâmetros ruminais e desempenho de bovinos de corte sob pastejo no período chuvoso com uso de Virginiamicina e Salinomicina na dieta. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2011. Belém. *Anais...* Belém: 48. ed., 2011.

FINLAY, B. J.; ESTEBAN G.; CLARKE, K. J. et al. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microb. Letters.*, v.117, p.157-161, 1994.

GALLOWAY, D. L.; GOETSCH, A. L.; PATIL, A. et al. Feed intake and digestion by Holstein steer calves consuming low-quality grass supplemented with lasalocid or monensin. *Can. J. Anim. Sci.*, v.73, p.869-879, 1993.

GARDNER, B. A.; OWENS, F. N.; WAGNER, J. T. et al. Impact of implants and monensin on weight of steers fed at maintenance. *Okla. Agric. Exp. Sta. Res. Rep.*, p.100-106, 1999.

GODFREY, S. I.; ROWE, J. B.; THORNILEY, G. R. et al. Virginiamycin to protect sheep fed wheat, barley or oats from grain poisoning under simulated drought feeding conditions. *Aust. J. Agric. Res.*, v.46, p.393-401, 1995.

GUAN, H.; WITTENBERG, K. M.; OMINSKI, K. H.; KRAUSE, D. O. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. *J. Anim. Sci.*, v.84, p.1896-1906, 2006.

GUO, T. J.; WANG, J. Q.; LIU, K. L. et al. Evaluation of the microbial population in ruminal fluid using time PCR in steers treated with virginiamycin. *Czec. J. Anim. Scie.*, v.55, n.7, p.276-285, 2010.

HANEY JUNIOR, M. E.; HOEHN, M. M. Monensin, a new biologically active compound. I. Discovery and isolation. *Antimic. Agen. Chemot.*, v.7, p.349-352, 1966.

HEDDE, R. D.; ARMSTRONG, D. G.; PARISH, R. C.; QUACH, R. Virginiamycin effect on rumen fermentation in cattle. *J. Anim. Sci.*, v.51, Suppl. 1, p.366-367, 1980.

HEDDE, R. D.; SHOR, L.; QUACH, R. Virginiamycin activity and safety in ruminants. *Veter. Pharmac. and Toxicol.*, p.768-770, 1983.

HOFFMANN, A.; DE MORAES, E. H. B. K.; MOUSQUER, C. J. et al. Produção de bovinos de corte no sistema de pasto-suplemento no período da seca. *Nat.*, v.2, n.2, p.119-130, 2014.

HOOK, S. E.; NORTHWOOD, K. S.; WRIGHT, D. G.; McBRIDE, B. W. Long-term monensin supplementation does not significantly affect the quantity or diversity of

methanogens in the rumen of the lactating dairy cow. *Appl. Environ. Microb.*, v.75, p.374-380, 2009.

HUNGATE, R.E. *The rumen and its microbes*. New York: Academic Press. 1966, 465p.

IVES, S. E., TITGEMEYER, E. C., NAGARAJA, T. G. et al. Effects of virginiamycin and monensin plus tylosin on ruminal protein metabolism in steers fed corn-based finishing diets with or without wet corn gluten feed. *J. Anim. Sci.*, v.80, n.11, p.3005-3015, 2002.

KABEYA, K. S.; PAULINO, M. F.; DETMANN, E. et al. Suplementação de novilhos mestiços em pastejo na época de transição água-seca: desempenho produtivo, características físicas de carcaça, consumo e parâmetros ruminais. *Rev. Bras. Zootec.*,v.31, p.213-222, 2002.

KOZLOSKI, G.V. *Bioquímica dos ruminantes*. 2.ed. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2009. 140p.

KUNKLE, W. E.; JOHNS, J. T.; POORE, M. H. et al. Designing supplementation programs for beef cattle fed forage-based diets. *J. Anim. Sci.*, v.77, E-suppl, p.1-12, 2000.

LANA, R. P.; RUSSELL, J. B. Efeitos da monensina sobre a fermentação e sensibilidade de bactérias ruminais de bovinos sob dietas ricas em volumoso ou concentrado. *Rev. Bras. Zootec.*, v.30, n.1, p.254-260, 2001.

LANNA, D. P. D.; MEDEIROS, S. R. Requisitos de Qualidade na bovinocultura de corte. In: SIMPÓSIO SOBRE BOVINOCULTURA DE CORTE, 6, 2007. *Anais...* Piracicaba, p.297-324, 2007.

LINNEEN, S. K.; HARDING, A. R.. SMALLWOOD, M. T. et al. In vivo ruminal degradation characteristics and apparent digestibility of low-quality prairie hay for steers consuming monensin and Optimase. *J. Anim. Sci.*, v.93, n.8, p.3941-3949, 2015.

LOMAX, M. A.; BAIRD, G. D.; MALLINSON, C. B.; SYMONDS, H. W. Differences between lactating and non-lactating dairy cows in concentration and secretion rates of insulin. *Biochem. J.*, v.180, p.281-289, 1979.

LUCAS, M. J. Avaliação do uso de Virginiamicina adicionada à mistura mineral para bovinos em pastagens. [S.l.: s.n.], 1989. 2 p., Embrapa.

LUCAS, M. J.; SOBRINHO, E. Efeito do uso de Virginiamicina sobre o desempenho de bovinos em pastagens. [S.l.: s.n.], 1989. 2 p. Embrapa.

MCALLISTER, A. T.; OKINE, E. K.; MATHISON, G. W. et al. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Can. J. Anim. Sci.*, v.76, p. 231-243, 1996.

McDONALD, P.R.A.; EDWARDS, J.F.D.; GREENHALGH; MORGAN, C.A. Animal nutrition. 6 ed. Pearson Education Limited. Harlow. Essex, UK. p. 266-277, 2002.

MEDEL, M.; MERINO, P.; THOMAS, R. et al. Modo de acción del monensin en metabolismo ruminal y comportamiento animal. *Cien. Investig. Agrar.*, v.18, n.3, p.153-173, 1991.

MILFORD, R.; MINSON, D. J. Intake of tropical pastures species. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE PASTAGENS, 9., 1996, São Paulo. *Anais...* p.815-822, 1966.

MINSON, D. J. *Forage in ruminant nutrition*. New York: Academic, 1990. 483p.

MORAES, E. H. B. K.; PAULINO, M. F.; ZERVOUDAKIS, J. T. et al. Níveis de proteína em suplementos para novilhos mestiços em pastejo durante o período de transição seca/águas. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 35, n. 5, p. 2135-2143, 2006.

MULLER, R. D.; POTTER, E. L.; WRAY, M. L. et al. Administration of monensin in self-fed (salt limiting) dry supplements or on an alternate day feeding schedule. *J. Anim. Sci.*, v.62, p.593–600, 1986.

MURRAY, P. J.; ROWE, J. B.; AITCHISON, E. M.; WINSLOW, S .G. Liveweight gain and wool growth in sheep fed rations containing virginiamycin. *Aust. J. Exper. Agric.*, v.32, p.1037-1043, 1992.

NAGARAJA, T. G.; GODFREY, S. I.; WINSLOW, S. W. et al. Effect of virginiamycin on ruminal fermentation in faunated or ciliate-free sheep overfed with barley grain. *Small Rum. Res.*, v.17, p.1–8, 1995a.

NAGARAJA, T. G.; GODFREY, S. I.; WINSLOW, S. W.; ROWE, J. B. Responses in ciliated protozoa and rumen fermentation in sheep supplemented with barley plus virginiamycin. *Aust. J. Agric. Res.*, v.46, p.1137–1147, 1995b.

NAGARAJA, T. G.; TAYLOR, M. B. Susceptibility and resistance of ruminal bacteria to antimicrobial feed additives. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.53, p.1620–1625, 1987.

NAGARAJA, T. G.; TAYLOR, M. B.; HARMON, D. L.; BOYER, J. E. *In vitro* lactic acid inhibition and alterations in volatile fatty acid production by antimicrobial feed additives. *J. Anim. Sci.*, v.65, p.1064–1076, 1987.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7. ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 2001. 381p.

NINGSIH, F.; KITANI, S.; FUKUSHIMA, E.; NIHIRA, T. VisG is essential for biosynthesis of virginiamycin S, a streptogramin type B antibiotic, as a provider of the nonproteinogenic amino acid phenylglycine. *Microbiol.*, v.157, n.11, p.3213-3220, 2011.

NUÑEZ, A. J. C.; CAETANO, M.; BERNDT, A. et al. Combined use of ionophore and virginiamycin for finishing Nellore steers fed high concentrate diets. *Sci. Agr.*, v.70, p.229-236, 2013.

O'MARA, F. P. The significance of livestock as a contributor to global greenhouse gas emissions today and in the near future. *Ani. Feed Scie. Tech.*, v.166, p.7-15, 2011.

ODONGO, N. E., BAGG, R.; VESSIE, G. et al. Long-term effects of feeding monensin on methane production in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.90, p.1781–1788, 2007.

OLIVEIRA, M. V. M.; LANA, R. P.; FREITAS, A. W. P. et al. Parâmetros ruminal, sanguíneo e urinário e digestibilidade de nutrientes em novilhas leiteiras recebendo diferentes níveis de monensina. *Rev. Bras. Zootec.*, v.34, n.6, p.2143-2154, 2005a.

OLIVEIRA, M. V. M.; LANA, R. P.; JHAM, G. N. et al. Influência da monensina no consumo e na fermentação ruminal em bovinos recebendo dietas com teores baixo e alto de proteína. *Rev. Bras. Zootec.*, v.34, n.5, p.1763-1774, 2005b.

OWENS, F. N.; GOETSCH, A. L. Ruminal fermentation. In: *THE RUMINANT ANIMAL: DIGESTIVE PHYSIOLOGY AND NUTRITION*. Waveland Press, 1988. p.145-171.

- PAULINO, M. F.; FIGUEIREDO, D. M.; MORAES, E. H. B. K. et al. Suplementação de Bovinos em pastagens: uma visão sistêmica. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 4., 2004, Viçosa, MG. *Anais...* Viçosa, MG: UFV, 2004. p.93-144.
- PEREIRA, L. G. R., MACHADO, F. S., CAMPOS, M. M., GUIMARAES JÚNIOR, R. et al. Enteric methane mitigation strategies in ruminants: a review. *Colom. J. Anim. Scie. Veteran. Medic.*, v.28, n.2, p.124-143, 2015.
- PRANGE, R. W.; DAVIS, C. L.; CLARK, J. H. Propionate production in the rumen of Holstein steers fed either a control or monensin supplemented diet. *J. Anim. Sci.*, v.46, p.1120–1124, 1978.
- PRESSMAN, B. C. Biological applications of ionophores. *Ann. Rev. Bioch.*, v.45, p.501- 530, 1976.
- PRIMAVESI, O.; FRIGHETTO, R. T. S.; PEDREIRA, M. S. et al. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. *Pesq. Agrop. Bras.*, v.39, p.277-283, 2004b.
- PRIMAVESI, O.; FRIGHETTO, R. T. S.; PEDREIRA, M. S. et al. Técnica do gás traçador SF₆ para medição de campo do metano ruminal em bovinos: adaptações para o Brasil. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2004a (outubro). 76p. (Documento 39).
- RICHARDSON, L. F.; RAUN, A. P.; POTTER, E. L. et al. Effect of monensin on rumen fermentation *in vitro* and *in vivo*. *J. Anim. Sci.*, v.43, p.657–664, 1976.
- RIVERA, A. R.; BERCHIELLI, T. T.; MESSANA, J. D. et al. Fermentação rumenal e produção de metano em bovinos alimentados com feno de capim-tifton 85 e concentrado com aditivos. *Rev. Bras. Zootec.*, v.39, n.3, p.617-624, 2010.
- ROGERS, J. A.; BRANINE, M. E.; MILLER, C. R. et al. Effects of dietary virginiamycin on performance and liver abcess incidence in feedlot cattle. *J. Anim. Sci.*, v.73, p.9-20, 1995.
- RUIZ, R.; ALBRECHT, G. L.; TEDESCHI, L. O. et al. Effect of monensin on the performance and nitrogen utilization of lactating dairy cows consuming fresh forage. *J. Dairy Sci.*, v.84, p.1717–1727, 2001.

RUSSELL, J. B.; STROBEL, H. J. Mini-review: the effect of ionophores on ruminal fermentation. *Appl. Env. Microbiol.*, v.55, n.1, p.1-6, 1989.

RUSSELL, J. B.; WALLACE, R. J. Energy-yielding and energy-consuming reactions. In: THE RUMEN MICROBIAL ECOSYSTEM, Springer Netherlands, 1997, p.246-282.

SALES, M. F. L.; PAULINO, M. F.; VALADARES FILHO, S. C. et al. Supplementation levels for growing beef cattle grazing in the dry-rainy transition season. *Rev. Bras. Zootec.*, v.40, n.4, p.904-911, 2011.

SALINAS-CHAVIRA, J.; LENIN, J.; PONCE, E. et al. Comparative effects of virginiamycin supplementation on characteristics of growth-performance, dietary energetics, and digestion of calf-fed Holstein steers. *J. Anim. Sci.*, v.87, p.4101-4108, 2009.

SANKARAM, M. B.; SHASTRI, B. P.; EASWARAN, K. R. K. Mechanisms of transmembrane cation transport studied by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Bioscie.*, v.8, n.1-2, p.343-354, 1985.

SAS INSTITUTE INC. *SAS/STAT User's guide. Version 8*, Cary, NC: SAS. Institute Inc., 1999.

SCHELLING, G. T. Monensin mode of action in the rumen. *J. Anim. Sci.*, v.58, n.6, p.1518-1527, 1984.

SCHOLFIELD, P. Gas production methods. In: FARM ANIMAL METABOLISM AND NUTRITION. Wallingford: *CABI Publishing*, cap. 10, p. 209-232, 2000.

SILVA, S. L.; ALMEIDA, R.; SCHWAHOFER, D. et al. Effects of salinomycin and virginiamycin on performance and carcass traits of feedlot steers. *J. Anim. Sci.*, v.82, suppl.1, p.41-42, 2004.

SPEARS, J. W. Ionophores and nutrient digestion and absorption in ruminants. *J. Nutr.*, v.120, n.6, p.632-638, 1990.

THAUER, R.K. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiol.*, v.144, n.9, p. 2377-2406, 1998.

VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I. Control of rumen methanogenesis. *Environ. Monit. Asses.*, v.42, p.73–97, 1996.

VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I.; HENDERICKX, H. K. Effect of virginiamycin on carbohydrate and protein metabolism in the rumen *in vitro*. *Arch. Tierernehr.*, v.34, p.149-165, 1984.

VAN SOEST, P. J. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2. ed. Cornell University Press, Ithaca, New York, 1994, 476p.

VELASCO, R. R.; MARTÍNEZ, G. D. M.; GALVÁN, M. M. C.; CABRENA, E. S. Manejo nutricional en corrales de engorda. *Veter. Méx.*, v.29, n.3, p. 291, 1998.

VIEIRA, A.; LOBATO, J. F. P.; TORRES JUNIOR, R. A. A. et al. Recria de machos Nelore em pastagens cultivadas com suplementação na seca nos Cerrados do Brasil Central. *Rev. Bras. Zootec.*, v.34, n.4, p.1349-1356, 2005.

WILMAN, D.; ACUÑA, P. G. H.; MICHAUD, P. J. Concentrations of N, P, K, Ca, Mg and Na in perennial ryegrass and white clover leaves of different ages. *Grass For. Sci.*, v.49, p.422–428, 1994.

ZERVOUDAKIS, J. T.; PAULINO, M. F.; CABRAL, L. S. et al. Suplementos múltiplos de auto controle de consumo na recria de novilhos no período das águas. *Ciênc. Agrotecn.*, v.32, n.6, p.1968-1973, 2008.

ZINN, R. A.; PLASCENCIA, A.; BARAJAS, R. Interaction of forage level and monensin in diets for feedlot cattle on growth performance and digestive function. *J. Anim. Sci.*, v.72, n.9, p.2209-2215, 1994.

CAPÍTULO III – ARTIGO: VIRGINIAMYCIN AND SODIUM MONENSIN SUPPLEMENTATION FOR BEEF CATTLE ON PASTURE

Isabella Cristina de Faria Maciel^{1,*}, Fabiano Alvim Barbosa¹, Helton Mattana Saturnino¹, Geraldo Helber Batista Maia Filho², José Mauro de Carvalho Andrade Júnior³, Patrícia Monteiro Costa¹

¹ Department of Animal Science, School of Veterinary Medicine, Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6.627, CEP 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

² DSM Produtos Nutricionais Brasil SA, Av. Brigadeiro Faria Lima, 2.066, CEP 01451-905 Jardim Paulistano, São Paulo, Brazil

³ PECSA Pecuária Sustentável da Amazônia, Av. Ludovico da Riva Neto, 1366, CEP 78580-000 Centro, Alta Floresta, Mato Grosso, Brazil.

* Corresponding author: isabellafmaciel@gmail.com

3.1. ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of including virginiamycin (VM), sodium monensin (MON) or the association of these additives (VM+MON) in the energetic mineral supplement, on the intake and performance of heifers on Marandu grass pasture. Forty Nellore heifers with 24 months of age and initial body weight of 251.5 ± 16.6 kg, were distributed in four treatments in a randomized block design. Treatments consisted of adding VM, MON or VM+MON to the energetic mineral supplement (CONT). Additive concentrations were defined to reach a dose of 40 to 45 mg per 100 kg of body weight (BW). The herbage allowance was not a limiting factor for the animals' intake. Supplement intake was lower than expected, with 33.0 mg, 18.8 mg and 26.3 mg of additive consumption per 100 kg BW for VM, MON and VM+MON, respectively. Dry matter intake (DMI) (mean=2.65% BW) and animal performance were not affected by the inclusion of VM, MON and VM+MON. The average daily gain (ADG) was 0.561 kg/animal, day⁻¹. The inclusion of additives in energetic mineral supplement does not affect the DMI and the ADG of grazing animals. The variability in supplement intake and daily dose intake of additives may have influenced the performance of the animals. Monensin inclusion presented the less expensive supplementation cost, due to reduction in supplement intake without changing weight gain.

Keywords: Additives, Feed efficiency, Heifers, Intake, Ionophores, Performance, *Urochloa brizantha*.

3.2. INTRODUCTION

The use of technologies aiming to increase the feed efficiency and weight gain of animals are increasingly recommended to grazing systems, due to the fact that approximately 90% of the Brazilian bovine herd is fed exclusively on pasture (Silva et al., 2016).

The anti-microbial growth promoters, such as antibiotics ionophores or non ionophores are alternatives to improve the efficiency of nutrient utilization, since they can manipulate ruminal fermentation through changes in the microbial population (Tedeschi et al., 2011). In grazing animals, these alterations in pattern of rumen fermentation promoted by additives, can reduce methanogenesis, a strategy to mitigate greenhouse gases (Guan et al., 2006), suppling the increasing demands for sustainable livestock (Godfray et al., 2010; Garnett et al., 2013).

Sodium monensin is the most studied and used growth promoter in the United States and in Brazil. Its inclusion in supplements increases weight gain in grazing animals, besides improving the efficiency of supplementation programs (Beck et al., 2014). The use of virginiamycin for animals on pasture is recent, despite this, its potential to increase nutrient utilization suggests that its addition to supplements can improve animal performance (Salinas-Chavira et al., 2009; Nuñez et al., 2013). The association of monensin and virginiamycin to feed bovines is yet little studied, however the combination of these additives can maximize rumen nutrient absorption and increase animal performance.

One of the challenges in using growth promoters in grazing systems is providing them to the animals. In addition to that, the efficiency in ruminal microbial selection depends on the continuous additive consumption, what may be limited due to individual variations on voluntary supplement intake (Cockwill et al., 2000). The difficulty in reaching the desired consumption in all the herd can also contribute for the absence of positive results (Bowman e Sowell, 1997).

The objectives of the present study were to evaluate the effects of the inclusion of virginiamycin and/or sodium monensin into the energetic mineral supplement, on intake and performance of heifers in pastures of Marandu grass. Our hypothesis is that the

inclusion of additives into the energetic mineral supplement will increase the performance of grazing bovine and will reduce production costs.

3.3. MATERIALS AND METHODS

The study was conducted in an experimental farm, located in the Brazilian municipality Igarapé, Minas Gerais (20°4'12"S, 44°18'7"W), between February 1 and June 30, of 2014. Precipitation and temperature were daily measured in the farm meteorological station (Figure 1).

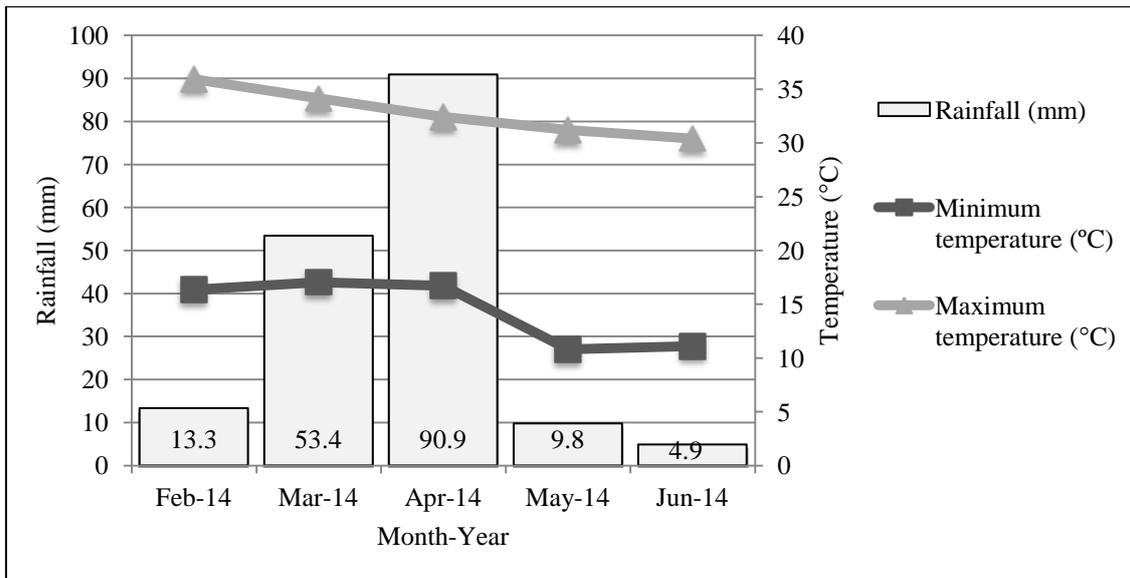


Figure 1. Weather data recorded during the trial period

The experimental area consisted of 12 *Urochloa brizantha* cv. Marandu (syn. *Brachiaria brizantha*) grass paddocks, of two hectares (ha) each, provided with water trough and supplementation feeders. Pasture was fertilized in March, 2014, with 45kg of nitrogen per hectare.

Forty Nellore breed heifers with an average of 24 months of age and initial body weight of $251,5 \pm 16.6$ Kg, were used. Animals were distributed randomly in a block design to one of the four treatments, consisted of including or not additives to the supplement (Table 1). Treatments were: CONT- energetic mineral supplement (control treatment); VM – energetic mineral supplement with virginiamycin; MON – energetic mineral supplement with sodium monensin; VM+MON – energetic mineral supplement with virginiamycin and sodium monensin. Supplements were produced by the PRODAP

company (Belo Horizonte, MG, BR) using virginiamycin 50% (Phibro, Ridgefield Park, NJ, USA) and sodium monensin 10% (Elanco, Greenfield, IN, USA).

Table 1. Centesimal and nutritional composition of energetic mineral supplements¹

	CONT	Virginiamycin (VM)	Monensin (MON)	VM+MON
Ingredients (%)				
Ground corn	55.56	55.56	55.56	55.56
Sodium chloride	17.36	17.36	17.36	17.36
Mineral premix	9.26	9.26	9.26	9.26
Dicalcium phosphate	8.93	8.93	8.93	8.93
Kaolin	8.89	8.83	8.56	8.50
Monensin 10%	-	-	0.335	0.335
Virginiamycin 50%	-	0.063	-	0.063
Nutrients (% DM)				
Dry matter	89.72	90.29	90.21	90.16
Crude Protein	4.58	5.07	4.89	5.01
TDN ²	47.40	45.36	45.13	46.94
Ether extract	1.55	1.43	1.63	1.70
Cost (R\$/kg of supplement)	1.21	1.55	1.29	1.63

¹ CONT: energetic mineral supplement without additives (control); VM – energetic mineral supplement with virginiamycin; MON – energetic mineral supplement with sodium monensin; VM+MON – energetic mineral supplement with virginiamycin and sodium monensin. Amounts of minerals (per kg of supplement): 48.03 g Ca; 14.4 g P; 3.67 g S; 3.36 g K; 1.89 g Mg; 1679 mg Zn; 1352 mg Fe; 591.9 mg Cu; 287.8 mg Mn. ² Total digestible nutrients calculated according National Research Council (1996) (4.409 kcal equates to 1 g of TDN)

Ten animals were allocated in each one of the four treatments and divided in three blocks (four paddocks each). One of the blocks contained 16 animals (four animals per treatment) e the rest of the blocks contained 12 animals (three animals per treatment). Initial stocking rate was 0.9 UA/ha. Continuous grazing system was used, although every seven days animals from the same block were moved into another paddock aiming the elimination of possible paddock effects.

Animals went through a pre experimental period of 45 days, in which they received the control supplement (without additives) in order to adapt to the experimental management and to the supplement intake measurement, for the daily dose calculation of each additive. Additive concentrations were defined in order to reach a dose of 40 to 45mg per 100 kg of body weight (BW). Supplements were fed *ad libitum* in feeders and daily consumption was calculated dividing the weekly consumed amount of supplement by the number of animals in each paddock.

Dry matter (DM) availability evaluation of the forage was performed every 28 days, through close cuts to the ground, as described by McMeniman (1997). The collected samples were weighted, homogenized and two sub samples were taken for latter analysis of potentially digestible DM (pdDM) (Paulino et al., 2006) and for plants components ratio (leaf, stem, senescent material). The pdDM was calculated with the following equation: $pdDM = 0.98 \times (100 - NDF) + (NDF - iNDF)$, in which NDF = neutral detergent fiber and iNDF = indigestible neutral detergent fiber. The iNDF was obtained after *in situ* incubation of a whole plant sample for 288 hours in the rumen of a cannulated bovine (Valadares Filho et al., 2010).

To calculate herbage allowance, the data of forage production (Kg DM/day) in function of the animals body weight (Kg) was used. Along with forage sample, every 28 days a graze simulation of each paddock was performed, as described by Euclides et al. (1992).

The samples from the simulated grazing were dried in forced air ventilation oven at 55°C for 72 hours and ground trough a 1 mm screen in a Willey mill (Alpax, Diadema, SP, BR). DM levels were determined by the 934.01 method, crude protein (CP) by the 984.13 method, neutral detergent insoluble nitrogen (NDIN) by the 984.13 method, ether extract (EE) by the 920.85 method and mineral matter (MM) by the 938.08 method, according to the AOAC (1990). Neutral detergent fiber (NDF), acid

detergent fiber (ADF) and lignin analysis were performed through the sequential method of Van Soest et al. (1991). Calcium and phosphorus levels were determined using titration and colorimetric method, respectively. Total digestible nutrients (TDN) were calculated using the equation: $TDN = 83.39 - (0.4171 \times NDF)$ (Capelle et al., 2001) and the non-fiber carbohydrates (NFC) using the following equation: $NFC = 100 - (\%CP + \%NDF + \%EE + \%MM)$ (Sniffen et al., 1992).

To determine individual DMI the following formula was used: $DMI (g/day) = FP / (1 - (IVDMD/100))$; in which FP = fecal production and IVDMD = *in vitro* dry matter digestibility.

The FP was obtained using the external marker Lipe® (Produtos de Pesquisas Simões Saliba, Florestal, MG, BR), that was provided in May to 16 animals, 4 of each group, from the same block, in a completely randomized design. 0.5g/animal/day of Lipe was supplied in a capsule, for seven days, two days of adaptation and five days of feces sampling (Rodriguez et al., 2006). Fecal samples were dried in forced air ventilation oven at 55°C for 72 hours and ground through a 1 mm screen in a Willey mill (Alpax, Diadema, SP, BR), and then homogenized to produce a composed sample for each animal. The Lipe® levels in the feces was made through Near Infrared Spectroscopy (NIS) (Femto, modelo NIR 900 PLS, SP, BR), by the logarithmic ratio of absorption intensities from spectral bands with wave length of 1050 cm^{-1} e 1650 cm^{-1} (Saliba et al., 2015). FP was obtained by the formula: $FP = Lipe® \text{ administrated (g/day)} / \text{feces Lipe® level (g/kg of DM)}$.

To determine IVDMD, simulated grazing samples from the month of May were weighted in bags F57/ANKOM (Ankon Technology Corp., Fairport, NY, USA) and incubated in fermentation bottles. The inoculum was prepared with ruminal fluid of cannulated cows, previously fed with the experimental energetic mineral supplement. To do this, a square Latin 4x4 design was used, with four cannulated cows and four supplements. Ruminal fluid from cannulated animals was collected 15 days after the adaptation to the supplement, in every experimental period. After 96 hours of incubation, the bags containing the degradation residue were washed and dried in oven at 105°C for 12 hours. The IVDMD was calculated by the difference between the incubated feed and the residue after incubation.

Average daily gain (ADG) was obtained by the difference between the final weight and the initial weight divided by the experimental number of days. The feed efficiency was reached by the ratio between the ADG from the Lipe® suppling period and the estimated DMI.

The randomized block design was used to animal performance analysis, and to evaluate the forage intake and feed efficiency a completely randomized design was used. The statistical analyses were performed by GLM procedure using the statistical program SAS 8.0, and the averages were compared by the Tukey's test, with 5% significance. The supplement intake data was submitted to polynomial linear regression analysis, quadratic and cubic.

3.4. RESULTS AND DISCUSSION

The total dry matter (TDM), potentially digestible DM (pdDM) and green leaf and steam DM (LSDM) availability presented average values of 3.3; 2.3 and 1.4 tons of DM/hectare, respectively.

Herbage allowance (HA) in LSDM was superior than 11% in all the evaluated months (Figure 2). The HA between 10 and 12% of the BW in TDM, makes the maximum DMI from pasture possible (Hodgson, 1990). Therefore, the higher available amount of leaves and stems suggests that the animals did not have a limited DMI, and also they were able to select the plant components with better nutritional value.

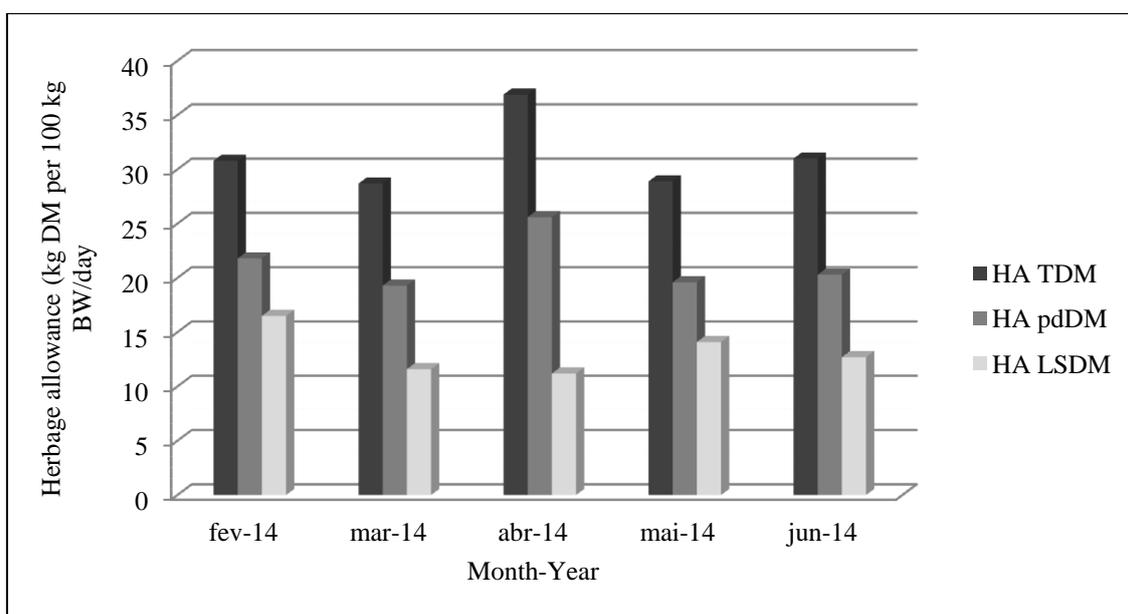


Figure 2. Herbage allowance in total dry matter (HA TDM), potentially digestible DM (HA pdDM) and green leaf and steam DM (HA LSDM) during the trial period

The simulated graze samples, majorly composed by leaves, represents the quality of the forage consumed by the animals, since the LSDM availability was not a limiting factor. The pasture nutritional composition (Table 2) presented increased levels of crude protein (CP) during the evaluated months, although the relation TDN:CP presented an average of 5.43, above the normal limit (7.0), in which we would not expect reductions in the voluntary forage intake (Moore et al., 1999).

Table 2. Chemical-bromatological composition of Marandu grass during the trial period

Parameters (%)	Months					Average
	February	March	April	May	June	
Dry Matter	28.56	25.27	21.09	27.55	29.32	26.36
Ash ¹	7.87	8.61	8.16	8.26	8.45	8.27
Organic Matter ¹	92.13	91.39	91.84	91.74	91.55	91.73
Crude Protein ¹	7.64	11.47	15.84	9.82	9.53	10.86
NDIN ¹	2.3	5.17	6.16	3.27	3.62	4.10
NDIN ²	30.12	45.1	38.88	33.33	37.96	37.08
Ether Extract ¹	2.46	2.44	2.06	2.04	2.44	2.29
NDF ¹	63.01	60.04	58.32	59.71	56.83	59.58
ADF ¹	24.85	23.14	22.57	24.03	22.7	23.46
Lignin ¹	4.88	4.28	3.76	4.69	3.86	4.29
Calcium ¹	0.45	0.4	0.37	0.51	0.64	0.47
Phosphorus ¹	0.16	0.21	0.24	0.18	0.15	0.19
TDN ³	57.51	58.75	59.46	58.89	60.08	58.94
NFC ⁴	19.02	17.44	15.62	20.17	22.74	19.00

NDIN: neutral detergent insoluble nitrogen; NDF: neutral detergent fiber; ADF: acid detergent fiber; TDN: total digestible nutrients; NFC: non-fibrous carbohydrate; ¹%DM; ²%CP; ³TDN=83.39 – 0.4171 NDF (Capelle et al., 2001); ⁴NFC=100 – (%CP + % NDF + %EE + %Ash) (Sniffen et al.. 1992)

The accumulated rainfall between March and April (144.3 mm. Figure 1), ally with the pasture fertilization provided higher levels of CP, occasioning a smaller decrease in the relation TDN:CP, when compared with the other months. When the ratio between these components is unbalanced, a limitation and a deficiency in the rumen microbial protein utilization will occur, compromising animal performance (Detmann et

al., 2014). During the rainy season, is common to find a relative protein excess in relation to energy levels in the pasture, especially if it was fertilized, as observed in the present study (Table 2). These findings justify corn inclusion as an energy source in the supplement provided to the animals, since it increases the amount of available energy and leads to a better ratio TND:CP in the diet.

Voluntary supplement intake during the experimental period averaged 0.289 kg/animal, day⁻¹ for the CONT, 0.262 kg/animal, day⁻¹ for the VM, 0.157 kg/animal, day⁻¹ for the MON and 0.194 kg/animal, day⁻¹ for the VM+MON treatments. The expected supplement consumption (400 g/animal, day⁻¹) was not reached during the experimental period, what led to an average additive intake of 33.5; 18.8 and 26.3 mg per 100 kg of BW of VM, MON and VM+MON, respectively.

Individual supplement intake was not measured in the present study. Notwithstanding, a high voluntary daily supplement consumption variability was observed, with variation coefficient (VC) between 47.75 and 58.22% (Figure 3). Bovine individual consumption of supplement in grazing systems presents higher intake variability for mineral mixtures (VC of 47 to 100%) than for proteic ingredients or energetic protein supplements (VC of 24 to 37%) (Dixon et al., 2003).

Despite the supplement used in the present study have considerable amounts of ground corn, the elevated VC found indicates that the inclusion of an energetic ingredient in mineral supplements does not control the consumption variations. Besides the daily variations in individual consumption, an elevated number of animals might have not consumed the supplement (Cockwill et al., 2000; Dixon et al., 2003), what also contributes to elevate the VC of studies with supplements for bovine in pasture. Thus, strategies that aim minimize supplement consumption variations, avoiding daily variations of additive dose must be evaluated for grazing animals.

There was a reduction of 45.7 and 32.9% in the voluntary intake of supplement due to the inclusion of MON or VM+MON, respectively, in comparison to the CONT group. This reduction in the supplement intake due to addition of monensin, is commonly reported in beef cattle studies supplemented under pasture (Fieser et al., 2007; Palma et al., 2015) but, the reduction mechanisms provided by monensin are not well defined in the literature. Differently from MON, VM inclusion resulted in a small decrease (9.3%) in supplement consumption, in comparison to the CONT group.

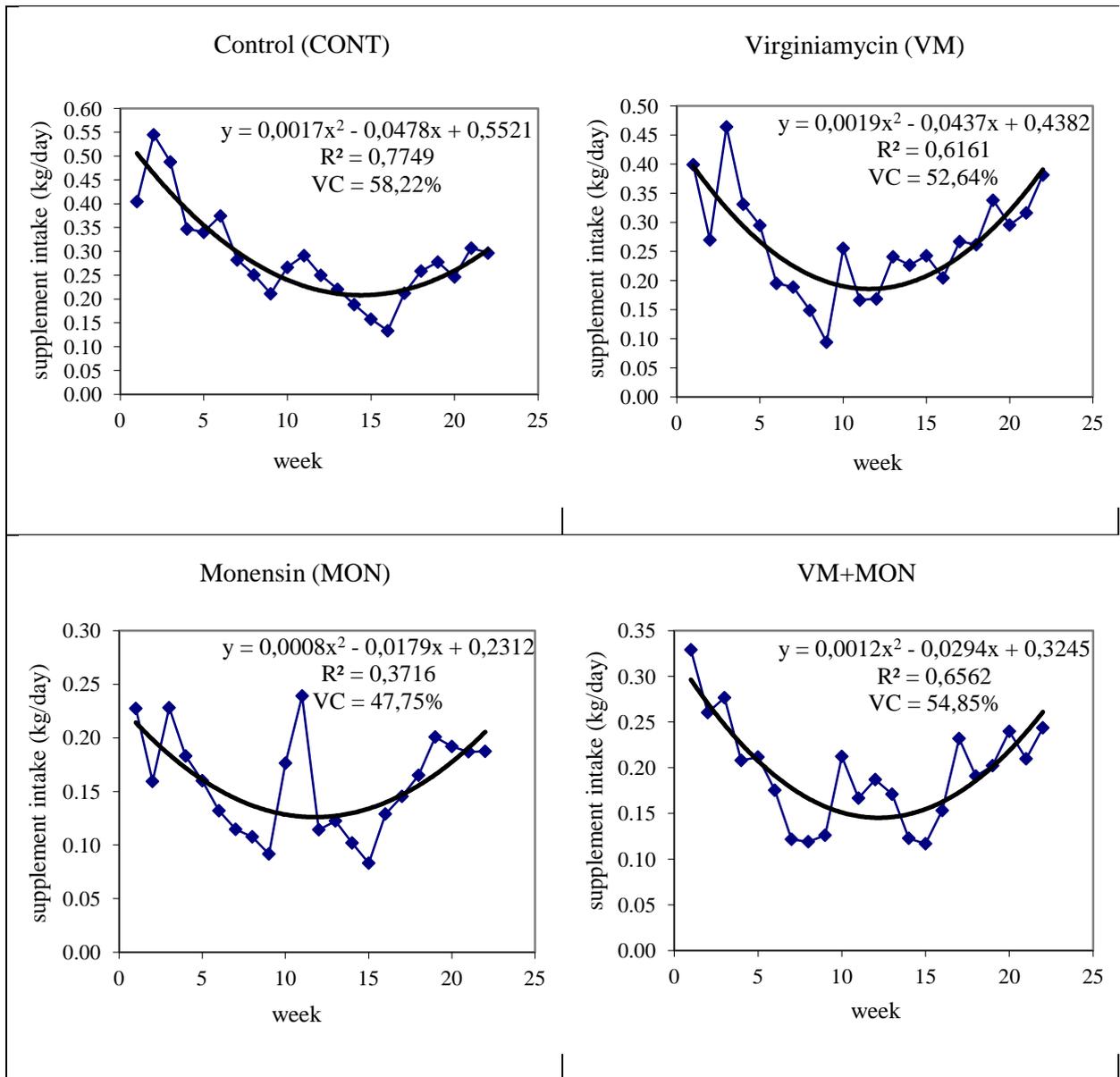


Figure 3. Daily voluntary intake of energetic mineral supplement by 4 treatments of heifers during 22 weeks of the rainy season. The regression equations are presented for each treatment. R2: regression coefficient. VC: variation coefficient

The estimated total DMI was 7.96 kg/day, equivalent to 2.65% of BW, with no differences between treatments (Table 3), suitable with the observed ADG in May (0.847 kg/animal, day⁻¹), according to the calculated nutrient requirements by Valadares Filho et al. (2010). The treatments with additives, in comparison to CONT, decreased the supplement consumption, however, the total DMI and the ADG during the

experimental period were not altered (Table 3). In animals fed forage diet, monensin usually leads to depression in feed intake (Rivera et al., 2010), however, the limited number of studies with grazing animals that presents DMI data, makes difficult to establish relations between monensin and the amount of consumed forage (Bretschneider et al., 2008). To VM, there are no reports in the literature about the DMI of grazing animals.

Table 3. Dry matter intake (DMI), feed efficiency (FE) and animal performance of heifers grazing on Marandu grass receiving energetic mineral supplement with added virginiamycin and/or monensin

Parameters	Supplement				Average	SEM	P-value
	CONT	VM	MON	VM+MON			
ADG (kg/day) ¹	0.999	0.706	0.761	0.924	0.847	0.06	0.10
DMI (kg/day)	8.50	8.22	7.53	7.58	7.96	0.21	0.32
DMI (%BW)	2.85	2.78	2.52	2.46	2.65	0,10	0.49
FE	0.121	0.087	0.104	0.122	0.108	0.009	0.35
Final weight (kg)	336.40	349.17	344.67	333.17	340.85	3.77	0.49
Total ADG (kg/day)	0.567	0.600	0.572	0.507	0.561	0.01	0.13

Means within a row with different superscript letters are significantly different by Tukey's test ($P \leq 0.05$); ADG: average daily gain; DMI: dry matter intake; BW: body weight; FE: Feed efficiency; SEM: standard error mean; ¹ ADG for the month of provide indicator (may)

The nutrients provided by the forage (Table 2), along with the energetic mineral supplementation, allowed an adequate ADG to zebu raising heifers. The difference in ADG between animals supplemented or non-supplemented with additives was lower when pasture presents increased nutritional value (Bretschneider et al., 2008). Therefore, the forage quality has a great impact in the response of growth promoters

use, since the additional ADG is minor as better is the forage quality (Duffiel et al., 2012).

Total DMI, ADG and feed efficiency (FE) did not differ among treatments (Table 3). The ionophores can increase FE of grazing animals by increasing ADG, due to microbial population changes, to the relative increase of propionate in relation to acetate and the decreased rumen protein deamination (Tedeschi et al., 2011). However, factors such as high variation in the daily intake of antimicrobial, due to the high daily variation of supplement intake and the consequently reduced molecule disponibility may contribute to the absence of positive results (Cockwill et al., 2000), what might have happened in the present study.

Data from the use of monensin for growing and terminating beef cattle were compiled by Duffiel et al. (2012) in a meta-analysis study. The average monensin dose used in the experiments was 28.1 mg per kg of diet and a linear effect was observed for ADG with increasing ionophores dose. Vendramini et al. (2015) evaluated the effects of monensin in crossbreed Angus x Brahman heifers kept in *Paspalum notatum* pasture with a concentrate supplementation restricted of 400 mg/animal, day⁻¹ and did not observed differences in ADG between animals supplemented or not with monensin (200 mg/animal, day⁻¹), corresponding to 58 mg per 100 kg BW, a dose value above the one consumed by animals in the present study, but with similar results. Vendramini et al. (2015) also tested 0, 14.5, 29.0 and 43.5 mg of monensin per kg of DMI, using cannulated young bulls, consuming 0.2% of BW of hay and concentrate. These doses corresponded to 0, 31.8, 63.7 and 95.6 mg per 100 kg BW and no differences were found on DMI.

The VM dose is not yet well elucidated in the literature. Alves Neto et al. (2013) using 0, 35, 55 and 75 mg of VM per 100 kg BW in an energetic proteic supplements and found better performance (higher weight and carcass gain) of Nellore grazing consuming 47 mg VM per 100 kg BW. Goulart (2010) observed that 20.7 mg of VM per 100 Kg BW added to the mineral mixture increased in 16% the weight gain of grazing animals.

Is important to highlight that although the additives did not increase ADG, the lower supplement intake can make their inclusion an economically viable strategy, since it reduces the supplementation cost (R\$/animal, day-1). Considering the supplement

costs (Table 1) and the period of 149 days during the rainy season, the supplementation cost was \$52.10, \$60.50, \$30.17 and \$47.11 per animal for CONT, VM, MON and VM+MON treatments, respectively. Since there was no additive effect on ADG, we can observe that the VM inclusion increased the supplement cost in 28% and since the intake reduction was only 9.3% in relation to the CONT, indicating a higher cost of supplementation. The monensin presented the smaller supplementation cost, once it only increased in 6.6% the supplement cost and reduced supplement intake in 45.7%, without altering the animals ADG.

3.5. CONCLUSIONS

The additive inclusion in the energetic mineral supplement does not alter the total dry matter intake and the performance of bovines, but reduces the energetic mineral supplement intake. The major reduction was occasioned by monensin. There is variability in supplement consumption and in the daily additive ingested dose by grazing bovines, what can influence animals performance. The monensin inclusion provides smaller costs with supplementation, due to the consumption reduction, without altering the animal weight gain.

3.6. REFERENCES

Alves Neto, J.A., Benatti, J.M.B., Moreira, A.D., Moretti, M.H., Silva, R.C., Gonçalves, P.H., Resende, F.D. and Siqueira, G.R., 2013. Determination the best dose of virginiamycin in supplements for Nellore cattle in pasture. In: 50^o Annual Meeting of Brazilian Society of Animal Science, Campinas

Association of official analytical chemists. 1990. Official methods of analysis, 15th edition. AOAC, Arlington, VA, USA

Beck, P., Hess, T., Hubbell, D., Hufstedler, G.D., Fieser, B. and Caldwell, J., 2014. Additive effects of growth promoting technologies on performance of grazing steers and economics of the wheat pasture enterprise. *Journal of Animal Science*, 92, 1219-1227

Bowman, J.G.P. and Sowell, B.F., 1997. Delivery method and supplement consumption by grazing ruminants: a review. *Journal of Animal Science*, 75, 543-550

Bretschneider, G., Elizalde, J. C. and Pérez, F. A., 2008. The effect of feeding antibiotic growth promoters on the performance of beef cattle consuming forage-based diets: A review. *Livestock Science*, 114, 135-149

Capelle, E.R., Valadares Filho, S.C., Silva, J.D. and Cecon, P.R., 2001. Estimativas do valor energético a partir de características químicas e bromatológicas dos alimentos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30, 1837-1856

Cockwill, C.L., Mcallister, T.A., Olson, M.E., Milligan, D.N., Ralston, B.J., Huisma, C. and Hand, R.K., 2000. Individual intake of mineral and molasses supplements by cows, heifers and calves. *Canadian Journal of Animal Science*, 80, 681-690

Detmann, E., Paulino, M.F., Valadares Filho, S.C. and Huhtanen, P., 2014. Nutritional aspects applied to grazing cattle in the tropics: a review based on Brazilian results. *Semina: Ciências Agrárias*, 35, suppl.4, 2829-2854

Dixon, R.M., White, A., Fry, P. and Petherick, J.C., 2003. Effects of supplement type and previous experience on variability in intake of supplements by heifers. *Crop and Pasture Science*, 54, 529-540

Duffield, T. F., Merrill, J. K. and Bagg, R. N., 2012. Meta-analysis of the effects of monensin in beef cattle on feed efficiency, body weight gain, and dry matter intake. *Journal of Animal Science*, 90, 4583-4592

Euclides, V.P.B., Macedo, M.C.M. and Oliveira, M.P., 1992. Avaliação de diferentes métodos de amostragem para se estimar o valor nutritivo de forragens sob pastejo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 21, 691-702

Fieser, B.G., Horn, G.W. and Edwards, J.T., 2007. Effects of energy, mineral supplementation, or both, in combination with monensin on performance of steers grazing winter wheat pasture. *Journal of Animal Science*, 85, 3470-3480

Garnett, T., Appleby, M.C., Balmford, A., Bateman, I.J., Benton, T.G., Bloomer, P., Burlingame, B., Dawkins, M., Dolan, L., Fraser, D., Herrero, M., Hoffmann, I., Smith, P., Thornton, P.K., Toulmin, C., Vermeulen, S. J. and Godfray, H.C.J., 2013. Sustainable intensification in agriculture: premises and policies. *Science*, 341, 33-34

Godfray, H.C.J., Beddington, J.R., Crute, I.R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J.F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S. M. and Toulmin, C., 2010. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science*, 327, 812-818

Goulart, R.C.D., 2010. Avaliação de antimicrobianos como promotores de crescimento via mistura mineral para bovinos de corte em pastejo. 128 p. (Tese Doutorado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba)

Guan, H., Wittenberg, K.M., Ominski, K.H. and Krause, D.O., 2006. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. *Journal of Animal Science*, 84, 1896-1906

Hodgson, J., 1990. Grazing management – science into practice, (Longman Scientific and Technical, New York)

MCMENIMAN, N.P., 1997. Methods of estimating intake of grazing animals. In: Simpósio sobre Tópicos Especiais em Zootecnia, p.133-168.

Moore, J.E., Brant, M.H., Kunkle, W.E. and Hopkins, D.I., 1999. Effects of supplementation on voluntary forage intake, diet digestibility, and animal performance. *Journal of Animal Science*, 77, suppl.2, 122-135

National Research Council, 1996. Nutrient Requirements of Beef Cattle. 7th ed. National Academy of Sciences, Washington, DC, USA.

Núñez, A.J.C., Caetano, M., Berndt, A., Demarchi, J.J.A.A., Leme, P.R and Lana, D.P.D., 2013. Combined use of ionophore and virginiamycin for finishing Nelore steers fed high concentrate diets. *Scientia Agricola*, 70, 229-236

Palma, A.S.V., Barra, C.N., Herling, V.R., Gomide, C.A. and Netto, A.S., 2015. Suplementação com aditivos nutricionais e minerais orgânicos no desempenho de bezerros Nelore recém-desmamados em pastagem. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 50, 1071-1078

Paulino, M.F., Detmann, E. and Valadares Filho, S. C., 2006. Suplementação animal em pasto: energética ou protéica? In: Simpósio sobre Manejo Estratégico da Pastagem, 359-392.

Rivera, A.R., Berchielli, T.T., Messana, J.D., Velasquez, P.T., Franco, A.V.M. and Fernandes, L.B., 2010. Fermentação ruminal e produção de metano em bovinos alimentados com feno de capim-tifton 85 e concentrado com aditivos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39, 617-624

Rodriguez, N.M., Saliba, E.O.S. and Guimarães Júnior, R., 2006. Uso de indicadores para estimativa de consumo a pasto e digestibilidade. In: Simpósio da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 43, 323-352

Saliba, E.O.S., Faria, E.P., Rodriguez, N.M., Moreira, G.R., Sampaio, I.B.M., Saliba, J.S., Gonçalves, L.C., Borges, I. and Borges, A.L.C.C., 2015. Use of Infrared Spectroscopy to Estimate Fecal Output with Marker Lipe®. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics*, 1, 1-10

Salinas-Chavira, J., Lenin, J., Ponce, E., Sanchez, U., Torrentera, N. and Zinn, R.A., 2009. Comparative effects of virginiamycin supplementation on characteristics of growth-performance, dietary energetics, and digestion of calf-fed Holstein steers. *Journal of Animal Science*, 87, 4101-4108

Silva, R.O., Barioni, L.G., Hall, J.A.J., Matsuura, M.F., Albertini, T.Z., Fernandes F.A. and Moran D., 2016. Increasing beef production could lower greenhouse gas emissions in Brazil if decoupled from deforestation. *Nature Climate Change*, 6, 493-497

Sniffen, C.J., O'Connor, J.D., Van Soest, P.J., Fox, D.G. and Russel, J.B., 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal Science*, 70, 3562-3577

Tedeschi, L.O., Callaway, T.R., Muir, J.P. and Anderson, R.C., 2011. Potential environmental benefits of feed additives and other strategies for ruminant production. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40, 291-309

Valadares Filho, S.C.; Marcondes, M.I.; Chizzotti, M.L. and Paulino, P.V.R., 2010. Exigências nutricionais de zebuínos puros e cruzados: BR-CORTE, (UFV, Viçosa)

Van Soest, P.J., Robertson, J.B. and Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74, 3583-3597

Vendramini, J.M.B., Sanchez, J.M.D., Cooke, R.F., Aguiar, A.D., Moriel, P., Silva, W.L., Cunha, O.F.R., Ferreira, P.D.S. and Pereira, A.C., 2015. Stocking rate and monensin supplemental level effects on growth performance of beef cattle consuming warm-season grasses. *Journal of Animal Science*, 93, 3682-3689

CAPÍTULO IV – CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO RUMINAL DO CAPIM MARANDU UTILIZANDO VIRGINIAMICINA E/OU MONENSINA SÓDICA

4.1. INTRODUÇÃO

As atividades agropecuárias têm sido apontadas como grandes agravantes do impacto ambiental, principalmente devido à emissão de gases do efeito estufa na atmosfera. Estratégias nutricionais para mitigação da emissão do gás metano por ruminantes são cada vez mais discutidas e estudadas.

Os aditivos, como antibióticos ionóforos e não ionóforos tem sido um foco das pesquisas atuais por possuírem potencial para redução da produção de metano por ruminantes, devido as modificação que acarretam na fermentação ruminal. O efeito dos aditivos na taxa de degradação ruminal de um determinado alimento pode ser estimado pelo estudo da cinética de fermentação ruminal.

Estudos *in vitro* tem se tornado cada vez mais constantes pra determinar a qualidade nutricional de alimentos utilizados em dietas de ruminantes. Além de ser uma técnica com baixo custo de execução, é possível avaliar diferentes substratos simultaneamente, sem a necessidade de utilização de grande quantidade de animais. A técnica de produção de gases *in vitro* também possibilita o estudo da cinética de fermentação ruminal, além de mensurações de produção de metano.

Objetivou-se avaliar a cinética de fermentação ruminal, a produção de metano e a degradabilidade *in vitro* da *Urochloa brizantha* cv. Marandu utilizando virginiamicina e/ou monensina sódica.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais realizados neste estudo estão de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG), protocolo nº 12/2013.

4.2.1. Local

O experimento foi conduzido no campo experimental da Embrapa Gado de leite – Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite (CNPGL), localizado no município de Coronel Pacheco/MG.

4.2.2. Período experimental, animais e tratamentos

O período experimental foi de 03 de junho a 26 de agosto de 2015, totalizando 82 dias.

Foram utilizadas quatro vacas mestiças Holandês x Gir, com peso médio inicial de $635,9 \pm 146,7$ kg (média \pm desvio padrão), não lactantes e fistuladas no rúmen. Os animais foram mantidos em baias individuais, providas de cocho, bebedouro automático e cama de borracha, mantendo uma baia vazia entre os animais para melhor conforto e facilidade de manejo nos dias de coleta de líquido ruminal.

O estudo foi composto por quatro períodos experimentais, utilizando-se o delineamento em quadrado latino 4x4, sendo quatro suplementos minerais com inclusão ou não de aditivos fornecidos aos animais. Cada um dos quatro períodos foi composto por 20 dias, sendo 15 dias de adaptação às dietas experimentais e cinco dias para coleta de amostras.

Os animais receberam silagem de milho a vontade (tabela 10) dividida em dois horários de fornecimento (8 e 16 horas). As sobras de silagem foram retiradas e pesadas diariamente, antes do fornecimento da nova alimentação e eram realizados eventuais ajustes da quantidade oferecida aos animais. O suplemento foi fornecido somente no período da manhã, antes do primeiro trato. As doses diárias de virginiamicina e/ou monensina sódica foram as mesmas utilizadas no experimento descrito no capítulo III: 33,5; 18,8 e 26,3 mg/100 kg de PV de virginiamicina, monensina e associação VM+MON, respectivamente.

As amostras de silagem de milho foram pré-secas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas e moídas em moinho tipo Willey, em peneira de malha de um milímetro, para posteriores análises segundo AOAC (1990) de matéria seca (método 934.01), proteína bruta (método 984.13), nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN) (método 984.13), extrato etéreo (método 920.85) e cinzas (método 938.08). Os teores de matéria orgânica (MO) foram calculados pela diferença entre a MS e a MM. As análises da fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina foram realizadas pelo método sequencial de Van Soest et al. (1991).

Tabela 4. Composição bromatológica da silagem de milho fornecida aos animais em cada período experimental

Parâmetros (%)	Período experimental				Média
	1º	2º	3º	4º	
MS	29,50	27,83	27,44	31,88	29,16
MM ¹	5,33	5,42	5,58	4,88	5,30
MO ¹	94,67	94,58	94,42	95,12	94,70
PB ¹	6,93	7,93	8,00	8,47	7,83
NIDN ¹	1,27	1,21	1,12	0,95	1,14
NIDA ¹	0,45	0,38	0,39	0,27	0,37
EE ¹	4,30	2,98	2,81	2,91	3,25
FDN ¹	43,34	42,35	43,84	36,78	41,58
FDA ¹	25,97	24,61	25,99	20,71	24,32
LIG ¹	3,12	2,18	2,35	1,81	2,37

MS: matéria seca, MM: matéria mineral; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta, NIDN: nitrogênio insolúvel em detergente neutro, NIDA: nitrogênio insolúvel em detergente ácido, EE: extrato etéreo, FDN: fibra insolúvel em detergente neutro; FDA: fibra insolúvel em detergente ácido, LIG: lignina, ¹: porcentagem da MS

4.2.3. Incubação *in vitro*

A incubação *in vitro* foi realizada em um delineamento em quadrado latino 4x4 em esquema fatorial 4x6, sendo quatro líquidos ruminais oriundos de vacas alimentadas com inclusão ou não de aditivos no suplemento energético-mineral e seis amostras do capim para avaliação da cinética ruminal. As amostras de pastejo simulado colhidas no período de janeiro a junho de 2014, conforme descrito no experimento do capítulo III foram utilizadas como substrato para incubação e determinação das mudanças no pH,

volume de gases, concentrações de metano e desaparecimento *in vitro* da MS e MO. As forragens foram pré-secas em estufa de ventilação forçada a 55°C durante 72 horas e moídas em moinho tipo Willey em peneira de um milímetro.

O líquido ruminal de cada animal foi retirado no 16º dia de cada período experimental, três horas após o fornecimento da dieta, utilizando uma sonda de PVC perfurada em sua extensão e acoplada a um recipiente para coleta do material. O líquido ruminal foi filtrado utilizando-se quatro camadas de gazes e armazenado em garrafas térmicas previamente aquecidas, sendo utilizada uma garrafa para cada animal. O líquido de cada animal era misturado ao meio de cultura para formação dos inóculos.

No dia anterior a incubação, 0,5 gramas de amostra foram pesadas em bolsas Ankom F57 em triplicata, que foram seladas e introduzidas em frascos de fermentação de 50 mL. Foram utilizados três frascos para cada amostra referente ao mês de coleta do capim e três frascos sem amostra (brancos) para cada animal e para cada tempo (24 ou 96 horas) totalizando 168 frascos por período. Os frascos contendo as amostras foram mantidos a 39°C em uma incubadora. Cada frasco foi incubado com 25 mL de inóculo, que foi preparado na proporção 1:2 de líquido ruminal:meio de cultura. O meio de cultura foi composto por solução macromineral (9,45 g/l de Na₂HPO₄.12H₂O; 6,2 g/l de KH₂PO₄ e 0,6 g/l de MgSO₄.7H₂O), solução micro mineral (132 g/mL de CaCl₂.2H₂O; 100 g/mL de MnCl₂.2H₂O; 10 g/mL de CoCl₂. 6H₂O e 80 g/mL de FeCl₃.6H₂O), solução tampão (4 g/l de NH₄CO₃ e 35 g/l de NaHCO₃), indicador (0,01g/l de Rezasurina) e agente redutor (95 mL de água destilada, 4 mL de NaOH 1M e 0,625 g de Na₂S.9H₂O).

Os frascos foram gaseados com CO₂, vedados com rolhas de silicone, lacrados e mantidos em um conjunto agitador dentro de uma incubadora a 39°C, simulando o ambiente ruminal. Em metade dos frascos era coletado gás para análise de metano no tempo 24 horas após incubação e na outra metade era mensurada a pressão de gases até 96 horas após a incubação.

4.2.4. Determinação das concentrações de metano (CH₄) e dióxido de carbono (CO₂), produção cumulativa de gases e pH

As amostras para determinação de CH₄ e CO₂ foram obtidas em metade dos frascos da incubadora após 24 horas do início da incubação. Foram coletados 10 mL de amostra do gás do interior dos frascos, utilizando uma seringa de 20 mL. Esse gás foi

imediatamente transferido para um frasco exetainer evacuado (Labco Ltda, High Wycombe, UK) para posteriores análises de concentração de CH₄ por cromatografia gasosa e CO₂ em equipamento com detector por ionização em chama.

Após a coleta de uma amostra do gás para CH₄ e CO₂, foi medido o volume gerado pela pressão dos gases na parte superior de cada frasco utilizando um aparelho de deslocamento de água em sistema vasocomunicante acoplado em uma agulha (Fedorak e Hrudey, 1983). O volume total de gás do tempo 24 horas foi calculado pela soma do volume retirado para análise de CH₄ e do volume medido pelo aparelho de deslocamento de água. Os frascos de fermentação foram abertos e os sacos de ANKOM com os resíduos foram removidos dos frascos, lavados e secos a 55°C durante 12 horas, posteriormente pesados para estimar a degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da matéria orgânica (DIVMO) no tempo 24 horas. Os dados de produção de metano foram calculados em função da matéria seca e da matéria orgânica degradada.

A quantificação de CH₄ e CO₂ foi realizada em aparelho GC (interface de software EZChrom Elite, Modelo 7820A, Agilent Technologies Brasil, Barueri, SP, Brasil). O GC foi equipado com duas válvulas de seis vias, uma sendo usada para o sistema de amostragem ligado a um circuito de 0,5 mL. O injetor foi usado no modo de divisão para 50:1 a 120°C. O sistema de separação consistia em duas colunas. A primeira coluna foi um HP-Plot/Q 30m x 0,530 mm x 40,0 µm (Agilent Technologies Brasil). O sistema de detecção constituía de um detector de condutividade térmica a 250°C, com 25 mL de H₂/min de fluxo. A segunda coluna foi uma Molesieve HP-30m x 0,530 mm x 25,0 µm, usando H₂ como gás transportador a uma taxa de 8,3 mL/min, com detector de ionização de chama a 270°C e 15 mL/min de taxa de H₂ e 350 mL/min de fluxo de ar sintético. As curvas de calibração foram realizadas com padrões de referência para concentrações de CH₄, como se segue: 0%; 5,05%; 10,2%; 14,7% e 20,1%; e para o CO₂ como se segue: 0%; 20,2%; 39,7%; 58,3% e 79,9%. Metano e CO₂ foram expressas em percentagem, mL e mL por g de MS incubada.

Na sequência de medição da produção de gás, a rolha de borracha foi removida e os frascos foram então colocados em gelo para inibir ainda mais a fermentação. O pH foi medido com um medidor de pH digital previamente calibrado com soluções padrões (pH 7,0 e 4,0). As medidas de pH foram tomadas nos tempos 24 e 96 horas, após a medida de produção de gases e abertura de cada frasco.

4.2.5. Degradabilidade *in vitro* da matéria seca e matéria orgânica

A degradabilidade *in vitro* da matéria seca após 24 e 96 horas de fermentação foi obtida pesando-se as bolsas de ankom contendo os resíduos da degradação após secagem em estufa a 105°C por 12 horas. Para cálculo da degradabilidade *in vitro* da matéria orgânica, os sacos contendo os resíduos foram queimados em forno tipo mufla a 600°C por cinco horas.

4.2.6. Produção de gases *in vitro* e cinética da fermentação ruminal

As leituras de pressão foram realizadas nos tempos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 20, 24, 28, 32, 48, 72 e 96 horas após a incubação, utilizando um aparelho de deslocamento de água em sistema vasocomunicante, acoplado em uma agulha (Fedorak e Hruday, 1983).

Para a descrição da cinética de fermentação foi utilizado o modelo bicompartimental de Pell e Schofield et al. (1993):

$$V = (V1/(1 + \exp. (2 - 4*(C1*(T - L)))))) + (V2/(1 + \exp. (2 - 4*(C2*(T - L))))))$$

Em que:

V1 = volume máximo dos gases (mL) da fração dos carboidratos não fibrosos (CNF);

C1 = taxa de degradação (mL/h) da fração dos CNF;

V2 = volume máximo dos gases (mL) da fração dos carboidratos fibrosos (CF);

C2 = taxa de degradação (mL/h) dos CF;

T = tempos de incubação (h);

L = tempo de latência (h).

Os volumes acumulados de gases foram ajustados ao modelo proposto por France et al. (1993):

$$Y = A*(1 - \exp. (-b*(t - L) - (c*(\sqrt{t} - \sqrt{L}))))$$

Em que:

Y = é a produção acumulativa de gases (mL);

A = é a máxima produção acumulada de gases (mL);

L = tempo de colonização (h);

b (h-1) e c (h-0,5) = são as taxas fracionais constantes;

t = tempo (horas).

Os dados de degradabilidade efetiva (DE) foram estimados por meio dos dados de produção de gases gerados pelo modelo de France et al. (1993) e da degradabilidade *in vitro* da MS com 96 horas de incubação.

4.2.7. Análises estatísticas

O delineamento utilizado foi quadrado latino 4x4, simples, e os tratamentos foram dispostos em arranjo fatorial 4x6 (quatro suplementos em função da inclusão ou não dos aditivos e seis meses de coleta de amostras do capim). Para análises das médias observadas foi utilizado o seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + M_j + P_k + (A * M)_{ij} + \varepsilon_{ijk}, \text{ em que:}$$

Y_{ijk} = resposta do aditivo i , no mês j , no período k ;

μ = média geral.

A_i = efeito do aditivo i ; $i = 1, 2, 3, 4$.

M_j = efeito do mês de coleta do capim j ; $j = 1, 2, 3, 4, 5, 6$.

P_k = efeito do período k ; $k = 1, 2, 3, 4$.

$(A * M)_{ij}$ = interação do aditivo i com o mês de coleta do capim j ;

ε_{ijk} = erro aleatório.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SAS 8.0. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas utilizando o teste de Tukey a 5% de significância.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Degradabilidade *in vitro* da matéria seca e da matéria orgânica

Houve interação entre aditivo e mês de coleta do capim Marandu ($p < 0,05$) para degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e matéria orgânica (DIVMO) (tabela 9). A virginiamicina e a monensina sódica utilizadas separadamente na dieta proporcionaram menor DIVMS nos meses abril e maio, respectivamente, comparado aos outros tratamentos. Quanto a DIVMO, a VM apresentou menor valor no mês de abril quando comparado a MON e VM+MON, enquanto no mês de maio foi inferior a todos os tratamentos.

O efeito benéfico desses aditivos no ambiente ruminal pode ser atribuído a diminuição da concentração de amônia ruminal, devido a menor degradação de peptídeos e aminoácidos no rúmen (Hegazy e Elias, 1997). A redução da degradação da proteína em amônia ocorre, principalmente em dietas ricas em proteína solúvel e restritas em energia, como é o caso das pastagens. Os resultados encontrados nesse estudo mostraram que os aditivos utilizados separadamente proporcionaram menor DIVMS nos meses abril e maio, onde os teores de PB da pastagem apresentaram-se elevados, o que pode estar relacionado a diminuição da degradação dessa proteína.

A suplementação de monensina impacta a retenção de nitrogênio (N) ruminal (Russell e Strobel, 1989). Ela é capaz de reduzir em 50% a degradação de aminoácido ruminal, evitando o acúmulo de N amoniacal. Esse efeito é descrito como um efeito "poupador de proteína ruminal" (Dinius et al., 1976; Russell e Strobel, 1989; Yang e Russell, 1993), sendo causado por várias espécies de bactérias ruminais que são responsáveis pela deaminação de mais de 25% da proteína alimentar. Estudos demonstraram que os ionóforos afetam negativamente três espécies de bactérias produtoras de amônia, *Clostridium sticklandii*, *Peptostreptococcus anaerobicus* e *Clostridium aminophilum* (Russell, 1987), podendo reduzir as populações dessas bactérias em até dez vezes (Callaway et al., 1997; Krause e Russell, 1996; Yang e Russell, 1993).

Não existem estudos que demonstrem se a virginiamicina tem efeito similar a monensina quanto a diminuição da deaminação de proteína no rúmen, mas considerando o mecanismo de ação desse aditivo, similar a monensina ao selecionar bactérias gram-

positivo e alterar a fermentação ruminal, há um indicativo de que ela também possa proporcionar esses benefícios quando adicionada a dietas de ruminantes.

Tabela 5. Degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da matéria orgânica (DIVMO) após 96 horas de incubação de amostras de simulação de pastejo do capim Marandu colhidas em diferentes meses e em função dos aditivos virginiamicina (VM) e/ou monensina (MON)

	Mês	Aditivo				Valor de p		
		Controle	VM	MON	VM+MON	Aditivo	Mês	A x M
DIVMS	Janeiro	64,81aA	63,54aA	63,98aAB	64,8aA			
	Fevereiro	65,02aA	64,91aA	65,42aB	65,29aA			
	Março	71,79aB	71,95aC	73,06aD	73,38aC	<0,001	<0,001	<0,001
	Abril	75,67bC	69,67aB	77,19bE	75,99bD			
	Maior	70,06bB	69,47bB	62,70aA	69,99bB			
	Junho	70,37aB	69,70aB	71,01aC	70,16aB			
Janeiro	68,02aA	66,63aAB	67,41aA	68,11aA				
Fevereiro	68,16aA	68,49aB	68,34aA	68,66aA				
DIVMO	Março	74,71aC	75,20aD	75,15aC	76,43aC	<0,001	<0,001	<0,001
	Abril	70,61aAB	72,01aC	78,96bD	78,62bC			
	Maior	73,09bBC	65,13aA	71,92bB	72,95bB			
	Junho	73,42aC	73,51aCD	72,99aBC	73,26aB			

Médias com letras diferentes minúsculas na linha e maiúsculas na coluna diferem pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade; DIVMS: Degradabilidade *in vitro* da matéria seca, coeficiente de variação (CV)=2,28; DIVMO: Degradabilidade *in vitro* da matéria orgânica, CV=2,98

Os resultados disponíveis na literatura quanto aos efeitos da utilização dos aditivos para bovinos na degradação da parede celular dos alimentos são inconsistentes devido a grande variação na quantidade adicionada do aditivo à dieta, nas espécies de microrganismos utilizadas, na variedade de dietas e nos tipos de aditivos utilizados (Martin e Nisbet, 1992).

Em dieta com feno de baixa qualidade, Linneen et al. (2015) observaram que a adição de monensina (40mg/100kg de PV.dia⁻¹) não teve impacto nos parâmetros de digestibilidade da MS, FDN e FDA. Assim como observado no presente estudo, os aditivos não alteraram a degradabilidade da MS e MO nos meses de pior qualidade do capim.

Salinas-Chavira et al. (2009) avaliando o efeito da suplementação com VM e MON sob as características da digestão ruminal e da digestão do trato digestivo total observaram que a VM não afetou a digestão ruminal da MO e FDN. Já a MON em comparação com a dieta controle, diminuiu a digestão da MO (4,2%) e da FDN (29,5%) no trato digestivo total. A redução da digestão ruminal da MO tem sido uma resposta característica à suplementação de monensina (Poos et al., 1979; Zinn e Borques, 1993; Zinn et al., 1994; Surber e Bowman, 1998).

O efeito de antimicrobianos sobre a degradação da fibra e do amido foi estudado por Van Nevel e Demeyer (1992). A virginiamicina e os ionóforos como salinomicina, lasalocida e monensina foram os inibidores mais potentes da degradação da fibra, com diminuição da produção de AGV e da matéria orgânica fermentada.

De acordo com Rodrigues et al. (2000) a melhoria do desempenho de animais com a utilização de ionóforos ocorre devido a melhoria da digestibilidade da dieta, frente a redução da taxa de passagem. O aumento da digestibilidade da matéria seca concomitante ao aumento da produção de propionato pode fazer com que os aminoácidos também sejam poupados de deaminação (Macrae e Lobley, 1986) resultando em mais aminoácidos disponíveis no trato gastrointestinal pós-ruminal (Tedeschi et al., 2003), o que explicaria a melhora no desempenho animal, principalmente quando a dieta é composta por grãos. No entanto, não foi observado melhoria na degradabilidade do capim no presente estudo.

Na maioria dos tratamentos observou-se um efeito quadrático da DIVMS e DIVMO ao longo dos meses, com maior valor entre os meses de março e abril (tabela 9). Isso pode estar relacionado a melhor composição bromatológica do capim nesses meses de coleta devido a adubação realizada na pastagem no mês de março e a pluviosidade acumulada ocorrida entre março e abril (144,3 mm, tabela 1), que proporcionou melhor qualidade da forragem. Sá et al. (2011) avaliaram a cinética de fermentação de amostras de capim Marandu, retiradas de canteiros a 20 cm do solo e encontraram DIVMS variando de 73 a 67% para a pastagem colhida aos 28 e 54 dias, respectivamente, valores próximos aos encontrados nesse estudo.

4.3.2. Parâmetros da fermentação ruminal - pH

Os valores de pH encontrados para os substratos de fermentação do capim Marandu sob o efeito dos aditivos nos tempos 24 e 96 horas após incubação mostraram interação entre os aditivos e o mês de coleta do capim (Tabela 10).

Tabela 6. pH do substrato da fermentação após 24 e 96 horas de incubação de amostras de simulação de pastejo do capim Marandu colhidas em diferentes meses e em função dos aditivos virginiamicina (VM) e/ou monensina (MON)

	Mês	Aditivo				Valor de p		
		Controle	VM	MON	VM+MON	Aditivo	Mês	A x M
pH 24 horas	Janeiro	6,51aA	6,55aAB	6,48aA	6,53aA	<0,001	<0,001	<0,001
	Fevereiro	6,50aA	6,53aA	6,50aA	6,53aA			
	Março	6,51aA	6,57aAB	6,52aA	6,53aA			
	Abril	6,52aA	6,63bB	6,55aA	6,57abA			
	Maio	6,47aA	6,57bAB	6,52abA	6,50abA			
	Junho	6,46aA	6,58bB	6,48aA	6,56bA			
pH 96 horas	Janeiro	5,83aA	6,08cB	5,90abA	5,95bA	<0,001	<0,001	<0,001
	Fevereiro	5,77aA	5,89bA	5,87abA	5,95bA			
	Março	5,85aA	6,05bB	5,95abA	5,97bA			
	Abril	5,86aA	6,08cB	5,96abA	6,01bcA			
	Maio	5,80aA	6,03bB	5,95bA	5,96bA			
	Junho	5,81aA	6,02bB	5,93bA	5,99bA			

Médias com letras diferentes minúsculas na linha e maiúsculas na coluna diferem pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade; pH 24 horas, CV=0,52; pH 96 horas, CV=0,82. Os dados de pH foram transformados em raiz quadrada.

Os valores de pH encontrados no tempo 24 horas mostraram que a virginiamicina foi eficiente em manter o pH maior quando comparado ao grupo monensina e ao grupo controle nos meses abril e junho e no mês de maio a superioridade da VM foi somente em relação ao grupo controle.

No tempo 96 horas após a incubação, os valores de pH foram superiores em todos os meses para VM em comparação com o grupo controle. Na maioria dos meses avaliados não houve diferença para VM em relação a MON ou a associação VM+MON.

Esse aumento do pH sugere que possíveis mudanças na população microbiana podem ter ocorrido no presente estudo, quando os aditivos foram adicionados a dieta. O pH ruminal está diretamente relacionado aos produtos finais da fermentação e também

com a taxa de crescimento dos microrganismos ruminais. Dietas ricas em volumosos, como no presente estudo, geralmente proporcionam pH ruminal mais elevado, permitindo o crescimento de bactérias celulolíticas (Church, 1979). A faixa ideal de pH para otimização da digestão da fibra e do crescimento das populações de bactérias celulolíticas está entre 6,5 e 6,8 (Ørskov, 1982).

Ørskov (1982) e Mould et al. (1983) indicaram que o pH ruminal abaixo de 6,2 reduziria a atividade de bactérias celulolíticas e a digestão de feno. Esses pesquisadores indicaram que a depressão no pH ruminal poderia ser responsável pela redução na digestibilidade da fibra associada com suplementação de grãos.

Estudos mostraram que a suplementação de VM em dietas com 65% de concentrado proporcionou aumento de pH ruminal de novilhos, o que pode ser explicado pelo aumento na população de bactérias que utilizam o ácido lático e queda das bactérias produtoras de ácido lático (Guo et al, 2010). A VM manteve o pH elevado também em dietas ricas em concentrado, consequência da redução nas concentrações de acetato e lactato (Coe et al., 1999). No experimento de Candanosa et al. (2008) o pH ruminal de ovelhas recebendo dietas com 60% de concentrado não foi alterado com adição de monensina (25 mg dia^{-1}) ou virginiamicina (15 mg dia^{-1}) até as 10 horas após a inclusão dos aditivos via fístula ruminal.

Assim como os resultados apresentados na literatura, a VM possui potencial para aumentar o pH ruminal de animais recebendo diferentes dietas, com variações nas proporções volumoso:concentrado.

4.3.3. Produção de gases e metano

A produção de gás total e de metano (mL) não teve interação entre aditivo e mês de coleta do capim, no entanto houve efeito do aditivo, sendo a produção de gases menor para os grupos tratados com aditivos em comparação com o controle. Essa redução foi, em média 10% para a produção de gases em mL e em mL por grama de MS. Para a produção de metano (mL) a VM proporcionou menor produção de metano do que a MON e a associação VM+MON, e o grupo controle foi superior a todos os aditivos (tabela 11).

Castro et al. (2007) estabeleceram relação entre a digestibilidade da matéria seca e a produção acumulada de gases em diferentes idades de corte do capim Marandu. Os autores observaram que a produção acumulada de gases está diretamente relacionada à

velocidade de fermentação, que é em função da composição de carboidratos na forragem. A composição do capim sofre interferência da idade da planta, apresentando aumento da parede celular e à diminuição do conteúdo celular na célula vegetal concomitante ao seu envelhecimento (Van Soest, 1994).

Tabela 7. Produção de gases total e por g de matéria seca (MS) e produção de metano (mL) em 24 horas de incubação de amostras de simulação de pastejo do capim Marandu em função dos aditivos virginiamicina (VM) e/ou monensina (MON)

Parâmetros	Aditivo				CV	Valor p		
	Controle	VM	MON	VM+MON		Aditivo	Mês	A x M
Produção de gases total (mL)	36,13b	31,41a	33,19a	33,02a	13,01	<0,001	ns	ns
Produção de gases (mL/gMS) ¹	79,92b	69,51a	73,48a	73,01a	13,01	<0,001	ns	ns
Produção de metano (mL)	25,45c	21,36a	23,92b	23,14b	14,16	<0,001	ns	ns

Médias com letras diferentes na linha diferem pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade; ¹mL/gMS: mL por grama de matéria seca; CV: coeficiente de variação; ns: não significativo

Sá et al. (2011) relataram produção total de gases do capim Marandu no tempo 24 horas de incubação de 76,1; 77,9 e 55,3 mL para as idades de corte de 28, 35 e 54 dias, respectivamente. Os autores relataram que o maior volume de gases produzido pela degradação do capim aos 28 e 35 dias de idade ocorreu devido aos teores elevados de carboidratos solúveis no capim disponível para os microrganismos. Esses valores são superiores aos encontrados no presente estudo, o que pode ser explicado pela menor qualidade da pastagem, já que estava submetida ao pastejo contínuo dos animais, enquanto no trabalho de Sá et al. (2011) foram colhidas de canteiros.

As produções de metano em função da matéria seca e matéria orgânica degradada (MSD e MOD, respectivamente) sofreram interação entre aditivo e mês de coleta do capim (tabela 12).

A maior DIVMS ocorreu em amostras de capim dos meses de março e abril (tabela 9) para todos os tratamentos, no entanto não foi observado o mesmo comportamento para produção de metano (tabela 12). O mês de coleta do capim não influenciou a produção de metano (mL g⁻¹ de MSD) para os tratamentos com MON e associação VM+MON.

A VM foi mais eficiente em reduzir a produção de metano nos meses de janeiro a março, enquanto a MON e VM+MON somente no mês de janeiro em comparação ao grupo controle. De acordo com Sá et al. (2011) dietas com altos teores de proteína bruta apresentam baixa produção de gás. Isso pode ocorrer quando a forragem apresenta menores teores de CNF e teores elevados de PB, o que causa uma redução no crescimento microbiano e conseqüentemente na produção de gases. Isso foi observado para produção de metano nos mês de março, que foi onde o capim apresentou alto teor de PB.

Tabela 8. Produção total de metano em 24 horas de incubação de amostras de simulação de pastejo da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu colhidas em diferentes meses e em função dos aditivos virginiamicina (VM) e/ou monensina (MON)

	Mês	Aditivo				Valor de p		
		Controle	VM	MON	VM+MON	Aditivo	Mês	A x M
Produção total de metano (mL/gMSD ¹)	Janeiro	169,77bC	138,43aB	135,04aA	133,04aA	<0,001	<0,001	0,007
	Fevereiro	154,82bBC	132,09aAB	137,22abA	137,66abA			
	Março	135,29bAB	112,33aA	132,59abA	129,63abA			
	Abril	121,74abA	109,14aA	120,35abA	141,19bA			
	Maior	137,40aAB	123,08aAB	134,64aA	130,65aA			
	Junho	137,75aAB	121,59aAB	127,44aA	119,98aA			
Produção total de metano (mL/gMOD ²)	Janeiro	150,01bC	120,93aB	120,95aA	118,34aA	<0,001	<0,001	0,01
	Fevereiro	136,26bBC	115,64aAB	122,49abA	117,64aA			
	Março	122,69bAB	101,25aAB	120,11bA	116,73abA			
	Abril	111,83abA	98,91aA	110,50abA	127,49bA			
	Maior	124,36aAB	110,45aAB	121,32aA	116,99aA			
	Junho	123,59aAB	108,96aAB	113,85aA	107,91aA			

Médias com letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna diferem pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade; ¹MSD: matéria seca digestível, coeficiente de variação (CV)=15,17; ²MOD: matéria orgânica digestível, CV=14,76, T x M: efeito da interação entre aditivo e mês.

Diferenças para emissões de metano podem ser atribuídas a diferenças na composição das pastagens e na maturidade da forragem no momento do pastejo (Chaves et al., 2006). De acordo com Chaves et al. (2006) essas diferenças refletem nas estimativas de digestibilidade *in vitro*, o que pode ser extrapolado para produção de metano *in vivo*.

Alimentos que proporcionam maior produção de gás e maior DIVMS tendem a ter maior produção de $\text{CH}_4 \text{ g}^{-1}$ de MS incubada (Durmic et al., 2010; Njidda e Nasiru, 2010; Jayanegara et al., 2011). A VM proporcionou menor DIVMS e menor produção de metano (mL) no presente estudo, o que corrobora com esses autores.

Ionóforos como a monensina podem reduzir a emissão de metano por selecionarem bactérias gram-negativo no rúmen (Johnson e Johnson, 1995), o que resulta em uma mudança na proporção dos AGV, direcionando para produção de propionato, e, conseqüentemente, a produção de metano é reduzida (National..., 2001).

Segundo Tedeschi et al. (2003) a suplementação de MON pode reduzir a produção de metano em 25%. Tomkins et al. (2015) mostraram que a redução de metano (g/kg de CMS, CMO e CFDN) só foi conseguida com a dose de 110,6 mg de monensina/100 kg PV para bovinos alimentados com feno de baixa qualidade. A alta dose de monensina utilizada por esses autores também reduziu a proporção de acetato em comparação com animais do grupo controle.

Os estudos que avaliaram a influência da VM na produção de metano apontam como causa primária o aumento das concentrações de propionato provocado por esse aditivo (Van Nevel et al., 1984; Godfrey et al., 1995; Nagaraja et al., 1995a, 1995b; Van Nevel e Demeyer, 1996). No entanto, alguns estudos sugerem ligação entre a inclusão de VM com redução de protozoários no líquido ruminal (Murray et al., 1992; Finlay et al., 1994).

No estudo de Fonseca et al. (2015) a emissão de metano (litros kg^{-1} de MS e litros kg^{-1} de MSD) medida em câmara respirométrica foi menor em bovinos alimentados com a combinação de VM e MON (30 e 22 mg kg^{-1} de MS, respectivamente) em comparação ao grupo não suplementado com aditivos, recebendo dieta com relação volumoso: concentrado de 50:50.

Getachew et al. (2005) utilizaram a técnica *in vitro* de produção de gás para medir a produção total de gás e a produção de metano a partir de dietas totais para vacas em lactação e mostraram que a estimativa da quantidade de CH_4 produzido no processo *in vitro* foram semelhantes aos anteriormente relatado *in vivo*. Isto sugere que os métodos *in vitro* podem ter valor na estimativa das diferenças entre a produção de CH_4 de diferentes dietas para ruminantes.

Importante considerar que o presente estudo parece ser o primeiro a avaliar o efeito dos aditivos sobre a produção de metano decorrente da fermentação de pastagem tropical ao longo dos meses. No cenário atual, onde há uma necessidade por sistemas

mais eficientes e que sejam ambientalmente sustentáveis, estratégias para mitigação da emissão de metano por ruminantes, como a utilização de aditivos alimentares merecem destaque.

4.3.4. Cinética de fermentação ruminal

Os dados obtidos no presente experimento foram testados pelo modelo de Pell e Schofield et al. (1993) para obtenção dos parâmetros de cinética de fermentação ruminal. Não houve interação entre aditivos e mês de coleta do capim Marandu para os parâmetros da cinética de produção de gases. Houve efeito do aditivo para a produção de gases dos carboidratos fibrosos (CF) e sua taxa de degradação e para a taxa de degradação da fração dos carboidratos não fibrosos (CNF) (tabela 13). A produção de gases dos CF foi menor para os tratamentos com MON e VM+MON e a taxa de degradação dos CF (k1) foi menor para VM e VM+MON. A taxa de degradação dos CF foi menor para VM+MON comparado aos demais tratamentos.

Tabela 9. Parâmetros da cinética de fermentação *in vitro* dos carboidratos não fibrosos (CNF) e dos carboidratos fibrosos (CF) de amostras de simulação de pastejo do capim Marandu colhidas em diferentes meses e em função dos aditivos virginiamicina (VM) e/ou monensina (MON)

Parâmetro	Aditivo				CV	Valor p		
	Controle	VM	MON	VM+MON		Aditivo	Mês	A x M
CF	137,03a	135,57a	124,65b	126,86b	8,62	<0,001	ns	ns
K1	0,0228a	0,0207b	0,0231a	0,0209b	9,30	<0,001	ns	ns
CNF	67,68	65,27	66,48	68,68	17,85	ns	ns	ns
K2	0,1015a	0,0978a	0,0973a	0,0900b	11,92	0,008	0,02	ns
L	4,4138b	5,4884a	5,0001a	5,0522a	18,67	0,002	ns	ns

Médias com letras diferentes na linha diferem pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade; CF: volume máximo de gases da fração de carboidratos fibrosos, em mL; K1: taxa de degradação da fração de CF, em mL/hora CNF: volume máximo de gases da fração de carboidratos não fibrosos, em mL; K2: taxa de degradação da fração de CNF, em mL/hora; L: tempo de latência, em horas; CV: coeficiente de variação; ns: efeito não significativo

A associação entre os aditivos VM e MON proporcionou maior impacto nos parâmetros de cinética, com redução da produção de gases da fração dos CF e redução

da taxa de degradação das frações dos CF e CNF, o que pode estar relacionado a seleção de microrganismos ruminais e consequente mudança da fermentação ruminal.

No estudo de Sá et al. (2011) avaliando o capim Marandu em três idades de corte, foi encontrado valores de 68,0 a 116,8 ml g⁻¹ de MS para o volume máximo de gases da fração dos carboidratos não fibrosos (CNF) com uma taxa de 0,05 ml hora⁻¹, em 96 horas de incubação, valores diferentes do encontrado no presente estudo.

Não foram encontrados trabalhos que tenham avaliado o efeito dos aditivos na produção de gases das frações dos CF e CNF. O foco principal dos estudos sobre cinética é o tipo de dieta utilizada, sendo que dietas ricas em CNF proporcionam altas taxas de digestão devido a disponibilidade nutricional rápida, completa e constante, fazendo com que o alimento não permaneça por tempo prolongado no rúmen (Cabral et al., 2002).

Houve efeito do mês de coleta do capim somente para a taxa de produção de gases dos CNF (K2), com valores de 0,1018; 0,1013; 0,0901; 0,0929; 0,0951 e 0,0986 mL hora⁻¹ para os meses de janeiro, fevereiro, março, abril, maio e junho, respectivamente. A taxa de degradação da fração de CNF foi menor para os meses de março e abril, onde o capim apresentou melhor valor nutritivo. De acordo com Sá et al. (2011) plantas que apresentam alto teor de proteína contribuem para o desenvolvimento dos microrganismos ruminais, e com isso a fibra será mais digerida, o que refletiria nessa taxa de degradação, como observado no presente estudo.

O tempo de latência foi maior para os grupos com inclusão dos aditivos em relação ao CONT (5,18 vs 4,41 h), sugerindo que a fermentação ruminal ocorreu mais lentamente na presença dos aditivos. O tempo de latência (L) estima o tempo gasto para a colonização e início da fermentação do substrato pelos microrganismos ruminais. De acordo com Tomich et al. (2003), reduções no tempo de colonização ocorrem quando há presença de substratos prontamente fermentáveis ou por características físicas e químicas da parede celular da amostra, capazes de facilitar a colonização microbiana.

Os dados de volume acumulado de gases também foram testados pelo modelo de France et al. (1993) para obtenção da degradabilidade efetiva em diferentes taxas de passagem. Não houve interação entre os tratamentos e mês de coleta do capim. Foi observado efeito do mês de coleta para as três taxas de passagem (tabela 14). Os meses de melhor qualidade do capim apresentaram maior degradabilidade efetiva indiferente da taxa de passagem.

Tabela 10. Parâmetros de degradabilidade efetiva para as taxas de passagem 2, 5 ou 8% hora⁻¹ de amostras de simulação de pastejo do capim Marandu colhidas em diferentes meses

Parâmetro	Mês						CV	Valor p		
	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun		Trat	Mês	T x M
DE 2%	61,77d	62,73d	70,01b	73,43 ^a	67,03c	67,43bc	6,05	ns	<0,001	ns
DE 5%	58,76d	59,87d	66,79b	70,18 ^a	63,75c	63,98c	5,98	Ns	<0,001	ns
DE 8%	55,87d	57,10d	63,68b	67,02 ^a	60,60c	60,67c	6,38	ns	<0,001	ns

Médias com letras diferentes na linha diferem pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade; DE 2, 5 e 8%: Degradabilidade efetiva da matéria seca para as taxas de passagem 2, 5 e 8%, respectivamente; CV: coeficiente de variação; ns: efeito não significativo

Sousa et al. (2011) encontraram valores para degradabilidade efetiva da MS na taxa de passagem de 2% por hora de 57 a 69% dependendo do período de coleta do capim Marandu, sendo os maiores valores observados no período chuvoso, de novembro a março, o que corrobora com os resultados do presente estudo.

4.4. CONCLUSÕES

A suplementação com aditivos afeta a degradabilidade *in vitro* da matéria seca do capim Marandu. A redução da degradabilidade *in vitro* é mais evidente quando o capim apresenta melhor qualidade.

Os aditivos reduzem a produção de gases totais.

A virginiamicina possui maior potencial para reduzir produção de metano e aumentar o pH ruminal.

A associação entre virginiamicina e monensina proporciona menor produção de gases da fração dos carboidratos não fibrosos e menor taxa de degradação dessa fração.

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CABRAL, L. S.; VALADARES FILHO, S. C.; DETMANN, E. et al. Cinética ruminal das frações de carboidratos, produção de gás, digestibilidade in vitro da Matéria Seca e NDT estimado da silagem de milho com diferentes proporções de grãos. *Rev. Bras. Zootec.*, v.31, n.6, p. 2332-2339, 2002.
- CALLAWAY, T. R.; DE MELO, A. M. S. C.; RUSSELL, J.B. The effect of nisin and monensin on ruminal fermentations *in vitro*. *Cur. Microbiol.*, v.35, n.2, p.90-96, 1997.
- CANDANOSA, E.; VILLA-GODOY, A.; CASTILLO, D. A.; MENDOZA, G. D. Effects of monensin, virginiamycin and sodium bicarbonate on ruminal fermentation and acid-base status in sheep. *J. Anim. Vet. Advan.*, v.7, n.2, p.184–189, 2008.
- CASTRO, G. H., GRAÇA, D. S., GONÇALVES, L. C. et al. Cinética de degradação e fermentação ruminal da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu colhida em diferentes idades ao corte. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, v.59, n.6, p.1538-1544, 2007.
- CHAVES, A. V.; THOMPSON, L. C.; IWAASA, A. D. et al. Effect of pasture type (alfalfa vs. grass) on methane and carbon dioxide production by yearling beef heifers. *Canad. J. Anim. Sci.*, v.86, n.3, p.409-418, 2006.
- CHURCH, D. C. Digestive physiology and nutrition of ruminants. In: DIGESTIVE PHYSIOLOGY, 3. ed. Oregon: Bookstores, 1979. 350 p.
- COE, M. L.; NAGARAJA, T. G.; SUN, Y. D. et al. Effect of virginiamycin on ruminal fermentation in cattle during adaptation to a high concentrate diet and during an induced acidosis. *J. Anim. Sci.*, v.77, p.2259-2268, 1999.
- DINIUS, D. A.; SIMPSON, M. E.; MARSH, P. B. Effect of monensin fed with forage on digestion and the ruminal ecosystem of steers. *J. Anim. Sci.*, v.42, p.229-234, 1976.
- DURMIC, Z., HUTTON, P.; REVELL, D. K. et al. *In vitro* fermentative traits of Australian woody perennial plant species that may be considered as potential sources of feed for grazing ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.160, n.3, p.98-109, 2010.
- FEDORAK, P. M.; HRUDEY, S. E. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic culture in serum bottles. *Environ. Technol. Lett.*, v.4, p.425-432, 1983.

FINLAY, B. J.; ESTEBAN G.; CLARKE, K. J. et al. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microb. Letters.*, v.117, p.157-161, 1994.

FONSECA, M. P.; BORGES, A. L. C. C.; SILVA, R. R. et al. Intake, apparent digestibility, and methane emission in bulls receiving a feed supplement of monensin, virginiamycin, or a combination. *Anim. Prod. Sci.*, 2015.

FRANCE, J.; DHANOA, M. S.; THEODOROU, M. K. et al. A model to interpret gas accumulation profiles associated with *in vitro* degradation of ruminant feeds. *J. Theor. Biol.*, v.163, p.99-111, 1993.

GETACHEW, G.; DEPETERS, E. J.; ROBINSON, P. H. et al. Use of an *in vitro* rumen gas production technique to evaluate microbial fermentation of ruminant feeds and its impact on fermentation products. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.123, p.547-559, 2005.

GODFREY, S. I.; ROWE, J. B.; THORNILEY, G. R. et al. Virginiamycin to protect sheep fed wheat, barley or oats from grain poisoning under simulated drought feeding conditions. *Aust. J. Agric. Res.*, v.46, p.393-401, 1995.

GUO, T. J.; WANG, J. Q.; LIU, K. L. et al. Evaluation of the microbial population in ruminal fluid using time PCR in steers treated with virginiamycin. *Czec. J. Anim. Scie.*, v.55, n.7, p.276-285, 2010.

HEGAZY, M. A.; ELIAS, A. N. Influence of dietary monensin and lasalocid on age and weight of Barki ram- and ewe-lambs at puberty. *Assiut Veter. Medic. J.*, v.37, n.74, p.1-15, 1997.

JAYANEGARA, A.; WINA, E.; SOLIVA, C. R. et al. Dependence of forage quality and methanogenic potential of tropical plants on their phenolic fractions as determined by principal component analysis. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.163, p.231-243, 2011.

JOHNSON, K. A.; JOHNSON, D. E. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Scie.*, v.73, p.2483-2492, 1995.

KRAUSE, D. O.; RUSSELL, J. B. An rRNA approach for assessing the role of obligate amino acid-fermenting bacteria in ruminal amino acid-fermenting bacteria in ruminal amino acid deamination. *Ap. Environ. Microbiol.*, v.62, n.3, p.815-821, 1996.

LINNEEN, S. K.; HARDING, A. R.; SMALLWOOD, M. T. et al. *In vivo* ruminal degradation characteristics and apparent digestibility of low-quality prairie hay for steers consuming monensin and Optimase. *J. Anim. Sci.*, v.93, n.8, p.3941-3949, 2015.

MACRAE, J. C.; LOBLEY, G. E. Interactions between energy and protein. In: MILLIGAN, L.P.; GROVUM, W.L.; DOBSON, A. (Eds.) CONTROL OF DIGESTION AND METABOLISM IN RUMINANTS. Englewoods Cliffs: Prentice-Hall, 1986. p.367-385.

MARTIN, S. A.; NISBET, D. J. Effect of direct-fed microbials on rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.*, Champaign, v.75, n.6, p.1736-1744, 1992.

MOULD, F. L.; ØRSKOV, E. R.; GAULD, S. A. Associative effects of mixed feeds. II. The effect of dietary addition of bicarbonate salts on the voluntary intake and digestibility of diets containing various proportions of hay and barley. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.10, n.1, p.31-47, 1983.

MURRAY, P. J.; ROWE, J. B.; AITCHISON, E. M.; WINSLOW, S. G. Liveweight gain and wool growth in sheep fed rations containing virginiamycin. *Aust. J. Exper. Agric.*, v.32, p.1037-1043, 1992.

NAGARAJA, T. G.; GODFREY, S. I.; WINSLOW, S. W. et al. Effect of virginiamycin on ruminal fermentation in faunated or ciliate-free sheep overfed with barley grain. *Small Rum. Res.*, v.17, p.1-8, 1995a.

NAGARAJA, T. G.; GODFREY, S. I.; WINSLOW, S. W.; ROWE, J. B. Responses in ciliated protozoa and rumen fermentation in sheep supplemented with barley plus virginiamycin. *Aust. J. Agric. Res.*, v.46, p.1137-1147, 1995b.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7.ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 2001. 381p.

NJIDDA, A. A.; NASIRU, A. *In vitro* gas production and dry matter digestibility of tannin-containing forages of semi-arid region of north-eastern Nigeria. *Pakist. J. Nutr.*, v.9, p.60-66, 2010.

ØRSKOV, E. R. *Protein nutrition in ruminants*. London: Academic Press, 1982. 160 p.

PELL, A.N., SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. *J. Dairy Sci.*, v.76, n.4, p.1063-1073, 1993.

POOS, M. I.; HANSON, T. L.; KLOPFENSTEIN, T. J. Monensin effects on diet digestibility, ruminal protein bypass and microbial protein synthesis. *J. Anim. Sci.*, v.48, p.1516-1524, 1979.

RODRIGUES, P. H. M.; LUCCI, C. S.; MELOTTI, L. Efeitos da lasalocida sódica e proporção volumoso/concentrado sobre a degradabilidade *in situ* do farelo de soja e do feno Coast Cross [*Cynodon dactylon* (L) Pers] em vacas secas. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.37, n.3, p.253-258, 2000.

RUSSELL, J. B. A proposed mechanism of monensin action in inhibiting ruminal bacterial growth: effects on ion flux and protonmotive force. *J. Anim. Sci.*, v.64, p.1519-1525, 1987.

RUSSELL, J. B.; STROBEL, H. J. Mini-review: the effect of ionophores on ruminal fermentation. *Appl. Env. Microbiol.*, v.55, n.1, p.1-6, 1989.

SÁ, J. F.; PEDREIRA, M. S.; SILVA, F. F. et al. Cinética da fermentação *in vitro* do capim-Marandu em diferentes idades de corte. *Acta Scient. Anim. Sci.*, v.33, n.3, p.225-231, 2011.

SALINAS-CHAVIRA, J.; LENIN, J.; PONCE, E. et al. Comparative effects of virginiamycin supplementation on characteristics of growth-performance, dietary energetics, and digestion of calf-fed Holstein steers. *J. Anim. Sci.*, v.87, p.4101-4108, 2009.

SAS INSTITUTE INC. *SAS/STAT User's guide. Version 8*, Cary, NC: SAS. Institute Inc., 1999.

SOUSA, L. F., MAURÍCIO, R. M., GONÇALVES, L. C. et al. Cinética de fermentação ruminal *in vitro* da forrageira *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em sistema silvipastoril. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, n.2, p.382-391, 2011.

SURBER, L. M.; BOWMAN, J. G. Monensin effects on digestion of corn or barley high-concentrate diets. *J. Anim. Sci.*, v.76, p.1945-1954, 1998.

TEDESCHI, L. O.; FOX, D. G.; TYLUTKI, T. P. Potential environmental benefits of ionophores in ruminant diets. *J. Environ. Qual.*, v.32, p.1591-1602, 2003.

TOMICH, T. R.; GONÇALVES, L. C.; MAURÍCIO, R. M. et al. Composição química e cinética de fermentação ruminal de híbridos de sorgo com capim-sudão. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.55, n.6, p.747-755, 2003.

TOMKINS, N. W.; DENMAN, S. E.; PILAJUN, R. et al. Manipulating rumen fermentation and methanogenesis using an essential oil and monensin in beef cattle fed a tropical grass hay. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v. 200, p.25-34, 2015.

VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I. Control of rumen methanogenesis. *Environ. Monit. Asses.*, v.42, p.73-97, 1996.

VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I. Influence of antibiotics and a deaminase inhibitor on volatile fatty acid production from detergent washed hay and soluble starch by rumen microbes *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.37, p.21-31, 1992.

VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I.; HENDERICKX, H. K. Effect of virginiamycin on carbohydrate and protein metabolism in the rumen *in vitro*. *Arch. Tiererneh.*, v.34, p.149-165, 1984.

VAN SOEST, P. J. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2. ed. Cornell University Press, Ithaca, New York, 1994, 476p.

YANG, C. M. J.; RUSSELL, J. B. The effect of monensin supplementation on ruminal ammonia accumulation *in vivo* and the number of amino acid-fermenting bacteria. *J. Anim. Sci.*, v.71, p.3470-3276, 1993.

ZINN, R. A.; BORQUES, J. L. Influence of sodium bicarbonate and monensin on utilization of a fat-supplemented, high-energy growing-finishing diet by feedlot steers. *J. Anim. Sci.* v.71, p.18-25, 1993.

ZINN, R. A.; PLASCENCIA, A.; BARAJAS, R. Interaction of forage level and monensin in diets for feedlot cattle on growth performance and digestive function. *J. Anim. Sci.*, v.72, n.9, p.2209-2215, 1994.