BRUNA GOMES ALVES

Efeito de metabólitos produzidos por actinobactérias sobre a digestibilidade *in vitro* e fermentação ruminal

Pirassununga

2016

BRUNA GOMES ALVES

Efeito de metabólitos produzidos por actinobactérias sobre a digestibilidade in vitro e fermentação ruminal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos

De acordo: Marcos Veiga dos Santos

Orientador

Pirassununga

2016

VERSÃO CORRIGIDA

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3303
FMVZ

Alves, Bruna Gomes
Efeito de metabólitos produzidos por actinobactérias sobre a digestibilidade *in vitro* e fermentação ruminal / Bruna Gomes Alves. -- 2016.
102 f. il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos.

1. Ionóforos. 2. Digestibilidade in vitro. 3. Bovinos. 4. Fermentação. 5. Aditivos. I. Título.

São Paulo, 04 de novembro de 2015

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "EFEITO DE METABÓLITOS PRODUZIDOS POR ACTINOBACTÉRIAS SOBRE A DIGESTIBILIDADE IN VITRO E FERMENTAÇÃO RUMINAL ", protocolado sob o CEUA nº 2038140514, sob a responsabilidade de Marcos Veiga Dos Santos, foi aprovado na reunião de 29/04/2015, e está de acordo com os princípios éticos da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "EFFECT ON METABOLITES PRODUCED BY ACTINOMYCETES ON IN VITRO DIGESTIBILITY AND RUMINAL FERMENTATION", protocol number CEUA 2038140514, under the responsibility Marcos Veiga Dos Santos, was approved in the meeting of day 04/29/2015, and agree with Ethical Principles adopted by Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ALVES, Bruna Gomes

Título: Efeito de metabólitos produzidos por actinobactérias sobre a digestibilidade *in vitro* e fermentação ruminal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

DEDICATÓRIA

Aos melhores incentivadores de tudo que faço, mesmo longe sei que as orações são as mais intensas, os votos de sucesso são os mais sinceros e é de onde vem a minha maior força, para fazer tudo com dedicação e amor, aos meus queridos pais, Marlene e Hélvio.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela luz que me ilumina quando tudo parece desabar, pelo conforto e calma, pelas bênçãos, por todos os caminhos que me abriu, pelas oportunidades e pelo seu amor.

Aos meus pais, Marlene e Hélvio, que não mediram esforços durante toda minha vida, para me ver realizada e feliz. A toda minha família, em quem eu sempre me espelhei para crescer profissionalmente.

A Universidade de São Paulo, Campus Pirassununga, que me proporcionou horas de estudo, conhecimento, lazer, e sem sombra de dúvidas algumas paisagens mais lindas que já vi. Poder estudar em um lugar deste é realmente para poucos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, pela confiança depositada, pelo exemplo de dedicação, empenho, seriedade com o que se faz e muito profissionalismo. Agradeço por ter permitido que eu realizasse este trabalho, com o qual aprendi muito.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2014/08905-5 pela concessão da bolsa de mestrado, permitindo a realização do presente estudo com maior tranquilidade.

Ao Departamento de Nutrição e Produção Animal, onde sempre me senti em casa. Aqui pude fazer grandes amizades, ter a oportunidade de conviver não só com excelentes pesquisadores, mas com pessoas de bom coração, gente unida, alegre e do bem: Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, Prof. Dr. Francisco Palma Rennó, Prof. Dr. Romualdo Shigueo Fukushima, Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva, Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues, Prof. Dr. Augusto Hauber Gameiro, Prof. Dr. Ricardo de Albuquerque, Prof. Dr. Alexandre Augusto de Oliveira Gobesso, Prof. Dra. Angélica Simone Cravo Pereira, Prof. Dr. Anibal de Sant'Anna Moretti, Prof. Dra. Cristiane Soares da Silva Araújo, Prof. Dr. Marcio Antônio Brunetto, Prof. Dra. Maria de Fátima Martins e Prof. Dr. Messias Alves da Trindade Neto. Têm minha eterna admiração!

Ao Laboratório Qualileite, à família Qualileite, agradeço a todos, com quem convivi e aprendi, com quem dividi bons momentos e outros não tão bons assim, e passamos por tudo, mesmo na crise! Pelo bom dia de cada dia, pelo 'bom fim de semana' né Cristian? Muito obrigada por terem me recebido tão bem! Jú, Tomazi, Juliano, Marquinhos, Cristian, Cristina, Suzana, Alê, Dani, Aline, e meus companheiros de estrada Du e Rê, contem comigo sempre!

Aos alunos de Iniciação Científica do Lab.: Larissa, Melina (Melissa), Mari Pallú, Gabriel. Sigam sempre competentes e focados que vocês vão longe!

Aos técnicos do Qualileite, Zeca e Lú, muito obrigada pelas indicações, ajudas, dúvidas tiradas, risadas, tudo! Lu, obrigada por todos os momentos que passamos fora do Lab., sushis, cachorro-quente, almocinhos, manicure e boas risadas!

Ao nosso grupinho nutrição do Lab., Cristian e Marquinhos vocês são feras! Obrigada por permitir passar momentos muito bons com vocês, pelas estatísticas, pelos líquidos ruminais, pelos tratos. Acordar cedo e ficar sem dormir durante os experimentos fica muito mais fácil quando você tem dois irmãos que tão ali pra tudo! Que sejamos sempre empenhados em trabalhar com o que gostamos, e que nunca acabem nossas forças!

Ao professor Dr. Francisco Palma Rennó, por ter me recebido para o estágio supervisionado e por ter aberto as portas da USP para mim. Obrigada pelos ensinamentos, por me passar sempre a sua vontade de crescer profissionalmente e seu amor pelo que faz.

A todos os técnicos do VNP, que sempre me auxiliaram quando precisei.

Ao João, secretário da Pós, que me acudia quando eu estava com problemas e me recebia sempre com boas risadas e muita dedicação.

A Alessandra e Fábia, secretárias da graduação, sempre dispostas a ajudar.

A todas as queridas da limpeza, que sempre me recebem com um sorriso no rosto, Dona Dalva, Dona Maria, Cecília e várias outras, obrigada por serem tão carinhosas e cuidarem tão bem de todos nós!

Ao professor Dr. Alberto de Moraes, por ter tido colaboração fundamental neste trabalho e por confiar em mim na realização desta etapa. Muito Obrigada!

Ao Laboratório de Fermentabilidade Ruminal, pela execução dos ensaios in vitro, e pela oportunidade de aprender cada dia mais frente a novos desafios. À técnica Priscila Maldonado, pela colaboração sem igual, pela boa vontade em tudo que faz, com muita competência.

Ao professor Dr. Ives Bueno, pelos ensinamentos, pela ajuda nos ensaios, pela possibilidade de auxiliar neste trabalho, com muita sabedoria, presença e dedicação.

Aos amigos do LPBL, onde comecei minha jornada em Pirassununga, onde me sinto bem com os animais e onde posso exercer tudo que aprendo. Filipe, Cati, Bumba, Gui, Komixa, Sacudo, Del Valle, Mineirinho, Pablito, que ainda estão firmes e para os que já saíram, Bisão, Vitor, Gu (Boi), Jefinho, Zé Esler, muito obrigada pelos ensinamentos e convivência!

Ao Filipe e ao Cati, amigos que fiz aqui, mas que parecem ser antigos; meus meninos, que sempre estão comigo e sei que sempre será assim, guardo sempre a amizade de vocês. Muito obrigada por TUDO! Vocês sabem o quanto são importantes!

A todas as amizades que pude fazer em Pirassununga, todas mesmo, não quero me esquecer de colocar algum nome aqui, então falo para todos, sejam da FMVZ, FZEA, Zumba, Pilates, Rep. Sagatiba, CCAA, estagiários, todo mundo, obrigada!

Por fim agradeço de todo coração aos animais, às minhas pretinhas (vaquinhas) que colaboram tanto a cada dia para que eu seja sempre dedicada à minha profissão. Obrigada por participarem a cada dia das minhas escolhas, se tento me empenhar e me dedicar é para retornar tudo a vocês.

OBRIGADA!

‘Lute com determinação, abrace a vida com paixão,

Perca com classe e vença com ousadia.

O mundo pertence a quem se atreve e a

Vida é muito curta para ser insignificante ‘

Charles Chaplin

RESUMO

ALVES, B. G. **Efeito de metabólitos produzidos por actinobactérias sobre a digestibilidade *in vitro* e fermentação ruminal.** [Effect of metabolites produced by actinobacteria on in vitro digestibility and ruminal fermentation]. 2016. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Actinobactérias são microrganismos capazes de produzir compostos bioativos presentes em extratos brutos com ação antibiótica e ionófora. A hipótese deste estudo foi de que extratos brutos de actinobactérias apresentem eficácia similar à monensina sódica para modulação da fermentação ruminal; no aumento da digestibilidade da matéria seca e matéria orgânica, aumento da concentração de propionato e redução da produção de gases totais, da desaminação protéica e de metano. Portanto, o objetivo foi avaliar *in vitro* dois extratos brutos (AMC e Caat) sobre a fermentação ruminal (produção total de gases, de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e de metano (CH_4); digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), da matéria orgânica (DIVMO) e produção de nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_3$). O estudo foi dividido em duas fases; a primeira objetivou estabelecer a curva dose-resposta dos extratos e a segunda para avaliação com controle positivo de monensina sódica. Para ambas fases, foram utilizadas como doadoras de líquido ruminal (inóculo) três vacas da raça Holandesa em lactação, portadoras de fístula ruminal. As dietas fornecidas foram à base de silagem de milho, farelo de soja, ureia, milho moído e suplemento mineral, com relação volumoso:concentrado de 60:40. Amostras de fluido ruminal foram coletadas por meio de bomba de vácuo, armazenadas em garrafas e caixas térmicas e transportadas ao laboratório para incubação em frascos de vidro. Para a primeira fase, foram avaliadas 4 doses (0,3; 0,6; 0,9 e 1,20 mg) de 2 extratos (AMC e Caat) em ensaio *in vitro* de 72 horas, no qual foram mensuradas a produção de gás durante a incubação e, ao final, as concentrações de AGCC, DIVMS e DIVMO foram determinadas. Na segunda fase, o ensaio foi de 24 horas, e ao final foram feitas análises para CH_4 e $N\text{-}NH_3$, além de AGCC, DIVMS, DIVMO e produção de gás. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado (DIC) para ambas as fases. Na primeira fase, a inclusão do Caat diminuiu linearmente a DIVMO após 72 hs e reduziu as concentrações de ácido isovalérico, butírico, da relação acetato:propionato e da produção de gás acumulado por 24, 48 e 72 h. Na segunda fase, a inclusão dos extratos causaram diminuição da produção de gás acumulada em 24 horas, sendo menor no tratamento monensina e no Caat. Houve efeito de inclusão do Caat e da monensina sobre a concentração

de AGCC, aumentando a concentração de propionato e diminuindo a concentração de butirato, acetato e a relação acetato:propionato. A concentração de N-NH_3 foi menor mediante inclusão do extrato Caat e da monensina enquanto que a concentração de CH_4 foi maior para a inclusão dos extratos quando comparados com a inclusão de monensina, entretanto não foram maiores do que o controle. A inclusão do extrato Caat foi capaz de modificar a fermentação *in vitro* de forma semelhante à monensina sódica, mas não alterou a digestibilidade da fibra. Por outro lado, o AMC não alterou a fermentação ruminal, seja na digestibilidade da fibra, na produção de gases totais, metano, nitrogênio amoniacal e AGCC.

Palavras-chave: Ionóforos. Digestibilidade *in vitro*. Bovinos. Fermentação. Aditivos.

ABSTRACT

ALVES, B. G. **Effect of metabolites produced by actinobacteria on in vitro digestibility and ruminal fermentation.** [Efeito de metabólitos produzidos por actinobactérias sobre a digestibilidade *in vitro* e fermentação ruminal]. 2016. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Actinobacteria are microorganisms that can produce bioactive compounds present in crude extracts with antibiotic and ionophore activity. Our hypothesis was that actinobacteria crude extracts showed similar efficacy to monensin on ruminal fermentation; increasing the digestibility of dry matter and organic matter, increasing propionate concentration and reducing the total gas production, protein deamination and methane. Therefore, the objective was to evaluate two crude extracts (AMC and Caat) on in vitro ruminal fermentation (total gas, short chain fatty acids (SCFA) and methane (CH_4) production; in vitro digestibility of dry matter (IVDDM), of organic matter (IVOMD) and ammonia nitrogen production (NH_3-N). The study was divided into two phases: the first aimed to establish the dose-response curve of the extracts and the second aimed to evaluate a positive monensin control. For both, it was used three lactating Holstein cows with ruminal fistula as rumen fluid donors (inoculum). The diets were based on corn silage, soybean meal, urea, ground corn and mineral supplement under forage:concentrate ratio of 60:40. Ruminal fluid samples were collected by a vacuum pump, stored in bottles and coolers and transported to the laboratory for incubation in glass bottles. For the first phase, they were evaluated 4 doses (0.3; 0.6; 0.9 and 1.20 mg) of 2 extracts (AMC and Caat) on a 72 hours in vitro assay, which were measured gas production during incubation and in the end, SCFA, IVDMD and IVOMD concentrations were determined. In the second phase, it was a 24 hours assay, and include final analyzes for CH_4 and NH_3-N, plus SCFA, IVDMD, IVOMD and gas production. The experimental design was completely randomized (DIC) for both phases. In the first phase, the Caat inclusion linearly decreased IVOMD after 72 hours and reduced isovaleric acid and butyric acid concentration and acetate:propionate ratio and cumulative gas production by 24, 48 and 72 h. In the second stage, the inclusion of the extracts caused a reduction of the cumulative gas production in 24 hours, being lower in monensin and Caat treatments. There was an effect of Caat and monensin inclusion on SCFA concentration, increasing the propionate concentration and reducing the butyrate and acetate concentration and the acetate: propionate ratio. The NH_3-N concentration was lower by Caat inclusion and monensin while the CH_4 concentration was

higher for the extracts inclusion as compared with monensin, however were not bigger than control. The Caat inclusion was able to modify the in vitro fermentation similarly to monensin, but did not affect the fiber digestibility. Moreover, AMC did not affect the rumen fermentation, either in fiber digestibility, total gas, methane, ammonia nitrogen and SCFA production.

Keywords: Ionophores. In vitro digestibility. Cattle. Fermentation. Additions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema ilustrativo do procedimento de micro extração do extrato bruto.....44

Figura 2 - Sistema de cromatografia líquida (HPLC) acoplado a espectrômetro de massas utilizado na identificação e caracterização química de metabólitos derivados de actinobactérias.....44

Figura 3 -- Vacas utilizadas para coleta de líquido ruminal.....46

Figura 4 - Preparação dos frascos de vidro (garrafas) para produção de gás *in vitro*.....47

Figura 5 - Preparação das garrafas com os inóculos filtrados.....48

Figura 6 - Sequência de avaliação da pressão de gás.....49

Figura 7 - Filtragem das garrafas nos cadinhos para mensuração da DIVMS e DIVMO 50

Figura 8 - Produção acumulada de gases *in vitro* de acordo com a inclusão de dois extratos brutos (AMC e Caat) em quatro doses (0,30, 0,60, 0,90 e 1,20 mg) sobre substrato e inóculo ruminal de vacas leiteiras 55

Figura 9 - Potencial da produção *in vitro* de gás (A, ml/g MS) e tempo de colonização (L, horas) de substrato adicionado de dois extratos brutos (Caat e AMC) em quatro doses (0,30, 0,60, 0,90 e 1,20 mg) produzidos por actinobacterias em inóculo ruminal de vacas leiteiras.....56

Figura 10 - Produção acumulada de gás (24, 48 e 72 horas) de substrato com dois extratos brutos (Caat e AMC) em quatro doses (0,30, 0,60, 0,90 e 1,20 mg) produzidos por actinobacterias em inóculo ruminal de vacas leiteiras 57

Figura 11 - Digestibilidade *in vitro* da matéria seca e matéria orgânica de substrato adicionado de dois extratos brutos (Caat e AMC) em quatro doses (0,30, 0,60, 0,90 e 1,20 mg) derivados de actinobactérias em inóculo ruminal de vacas leiteiras 59

Figura 12 - Liberação dos gases produzidos na fermentação após as leituras de pressão em cada tempo com auxílio de seringas.....75

Figura 13 - Produção acumulada de gases *in vitro* de dois extratos brutos (Caat e AMC) produzidos por actinobactérias e monensina sódica sobre substrato e inóculo ruminal de vacas leiteiras 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química do substrato utilizado na fermentação in vitro sob inóculo de vacas em lactação 46
Tabela 2 - Composição das soluções utilizadas para o preparo do tampão do meio de cultura final 47
Tabela 3 - Produção cumulativa de gás (ml / g), potencial de produção de gás (assintótica A, ml / g de MS) e tempo de colonização (L, horas) de extratos brutos (Caat e AMC) derivados de actinobacterias em fermentação in vitro sob inóculo de vacas leiteiras 53
Tabela 4 - Efeito de dois extratos brutos (Caat e AMC) e quatro doses (0,30, 0,60, 0,90 e 1,20 mg) produzidos por actinobactérias sobre a DIVMS e DIVMO de inóculo ruminal de vacas leiteiras 58
Tabela 5 - Efeito da inclusão de dois extratos brutos (Caat e AMC) em quatro doses (0,30, 0,60, 0,90 e 1,20 mg) derivados de actinobactérias sobre a concentração (mM e %) in vitro de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) sob inóculo ruminal de vacas leiteiras 61
Tabela 6 - Produção acumulada de gás em 24 horas (ml / g), produção de gás assintótica (A, ml / g de MS), taxas fracionais b e c e tempo de colonização (L, horas) de extratos brutos produzidos por actinobactérias utilizando inóculo de vacas leiteiras 79
Tabela 7 - Efeito da inclusão de monensina e extratos brutos produzidos por actinobactérias sobre a DIVMS e DIVMO de inóculos de vacas leiteiras 79
Tabela 8 - Efeito da inclusão de monensina e extratos brutos produzidos por actinobactérias sobre a produção in vitro de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) 81
Tabela 9 - Efeito da inclusão de monensina e extratos brutos produzidos por actinobactérias sobre a concentração in vitro de nitrogênio amoniacal (N-NH_3) e metano (CH_4) de inóculo de vacas leiteiras 82

LISTA DE ABREVIATURAS

AGCC – Ácidos graxos de cadeia curta

AGNE – Ácidos graxos não esterificáveis

AMC – Extrato bruto AMC

BDA – Batata-dextrose ágar

BHBA – β-hidroxibutirato

C - Controle

Ca – Cálcio

Caat – Extrato Caat (extraído do bioma caatinga)

CH_4 – Metano

CNF – Carboidratos não fibrosos

CO_2 – Dióxido de carbono

DIVMO – Digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica

DIVMS – Digestibilidade *in vitro* da matéria seca

DMSO - Dimetilsulfóxido

EE – Extrato Etéreo

FDA – Fibra em detergente ácido

FDN - Fibra em detergente neutro

IVDDM – In vitro Digestibility Dry Matter

IVDOM – In vitro Digestibility Organic Matter

K – Potássio

LDA – Lignina Detergente Ácido

LEMAPN – Laboratório de Espectometria de Massas Aplicada a Produtos Naturais

Mg – Magnésio

MM – Matéria mineral

MS – Matéria seca

MON - monensina

Na – Sódio

$N\text{-}NH_3$ – Nitrogênio amoniacal

PB – Proteína bruta

pH – potencial hidrogeniônico

SCFA – Short Chain Fatty Acids

SF_6 – Hexafluoreto de enxofre

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL 19

2 REVISÃO DE LITERATURA 21

2.1 UTILIZAÇÃO DE ADITIVOS ALIMENTARES PARA VACAS EM LACTAÇÃO 21

2.1.1 **Monensina sódica como aditivo alimentar** 23

2.1.1.1 Efeito do uso de ionóforos na fermentação ruminal 23

2.1.1.2 Efeito do uso de ionóforos sobre metanogênese 27

2.1.1.3 Efeito do uso de ionóforos sobre a produção e composição do leite 29

2.1.1.4 Prevenção de distúrbios metabólicos 32

2.1.2 **Moléculas alternativas à monensina** 33

2.2 UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS IN VITRO PARA AVALIAÇÃO DE EFICIÊNCIA DE FERMENTAÇÃO RUMINAL 35

2.2.1 Digestibilidade in vitro 36

2.2.2 Produção de gases 36

2.2.3 Produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) 37

2.2.4 Produção de gás metano 37

2.2.5 Quantificação de nitrogênio amoniacal (N-NH3) 38

3 PADRÃO DOSE-RESPOSTA DE EXTRATOS BRUTOS PRODUZIDOS POR ACTINOBACTÉRIAS SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL IN VITRO 40

3.1 INTRODUÇÃO 42

3.2 MATERIAL E MÉTODOS 43

3.2.1 **Seleção de metabólitos e caracterização química** 43

3.2.2 **Coleta de líquido ruminal para fermentação e preparo do meio de cultura** 45

3.2.3 **Fermentação ruminal in vitro** 48

3.2.3.1 Produção de gases 48

3.2.3.2 Produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) 50

3.2.3.3 Digestibilidade da MS e MO 50

3.2.4 **Análises Estatísticas** 51

3.3 RESULTADOS 52

3.3.1 **Produção de Gases** 52

3.3.2 **Digestibilidade in vitro da matéria seca e matéria orgânica** 58
3.3.3 **Produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)** 59
3.4 DISCUSSÃO 62
3.5 CONCLUSÃO 63
REFERÊNCIAS **65**
4 ATIVIDADE DE EXTRATOS BRUTOS de ACTINOBACTÉRIAS SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL IN VITRO **68**
4.1 INTRODUÇÃO 70
4.2 MATERIAL E MÉTODOS 71
4.2.1 **Seleção de metabólitos e caracterização química** 71
4.2.2 **Coleta de líquido ruminal para fermentação e preparo do meio de cultura** 72
4.2.3 **Fermentação ruminal in vitro** 74
4.2.3.1 Produção de gases 74
4.2.3.2 Produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) 75
4.2.3.3 Digestibilidade da MS e MO 75
4.2.3.4 Produção de nitrogênio amoniacal (N-NH3) 76
4.2.3.5 **Produção de metano** 76
4.2.4 **Análises Estatísticas** 77
4.3 RESULTADOS 78
4.3.1 **Produção de Gases** 78
4.3.2 **Digestibilidade in vitro da matéria seca e matéria orgânica** 79
4.3.3 **Produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)** 80
4.3.4 **Produção de Nitrogênio Amoniacal (N-NH3)** 81
4.3.5 **Produção de Metano (CH4)** 82
4.4 DISCUSSÃO 82
4.5 CONCLUSÃO 85
REFERÊNCIAS **86**
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS **90**
REFERÊNCIAS **91**

1 INTRODUÇÃO GERAL

A cadeia de produção leiteira tem buscado constantemente aumentar a eficiência de produção no setor primário, por meio de adequações de instalações, melhoramento genético e aprimoramento do manejo nutricional. Tais esforços são necessários para assegurar a rentabilidade da produção de leite de alta qualidade isento de resíduos e seguro para os consumidores.

Devido a essa alta demanda por aumento da eficiência, alguns rebanhos têm adotado o uso de aditivos alimentares. Dentre os aditivos mais utilizados nas dietas dos ruminantes estão os ionóforos, capazes de modular e aumentar a eficiência da fermentação ruminal. Inicialmente, os ionóforos foram utilizados como coccidiostáticos nas dietas de aves; entretanto, o uso para dietas de ruminantes tem como objetivo principal aumentar a eficiência energética da dieta, por meio da redução da metanogênese, da proteólise e da desaminação ruminal (BERGEN; BATES, 1984).

Sendo assim, a inclusão de ionóforos na dieta de ruminantes pode ser uma ferramenta para melhoria da saúde e produção animal, pelo aumento da produção de propionato e o aumento e/ou manutenção do pH ruminal. A ação inibidora seletiva dos ionóforos ocorre principalmente sobre as bactérias Gram positivas, produtoras de ácido acético e butírico, ao passo que as Gram negativas, produtoras de ácido propiônico, possuem uma membrana protetora que dificulta a passagem de cátions (RANGEL et al., 2008).

A utilização de ionóforos para vacas em lactação influencia a fermentação em nível ruminal e por isso afeta o desempenho produtivo. Os aumentos de produção de propionato, juntamente com a diminuição da produção de acetato, butirato e metano favorecem maior aporte de glicose para a síntese de leite. Por esse aumento da demanda de glicose também podemos observar efeitos adicionais e alterações do perfil hormonal, o que ocasiona modificações da partição de nutrientes e composição do leite (NRC, 2001).

A monensina, composto produzido por *Streptomyces cinnamonensis* (HANEY; HOEHN, 1967) é atualmente um dos principais ionóforos utilizados em vacas leiteiras sendo que estudos prévios determinaram a dose recomendada, o período e as interações em diferentes dietas. A inclusão de monensina na dieta de vacas leiteiras reduz o consumo de matéria seca, aumenta a produção de leite/vaca/dia, o que resulta em maior eficiência de produção. Entretanto, estudos indicam algumas doses específicas para animais em crescimento, vacas em período de transição ou em lactação, além de doses que podem

ocasionar redução de desempenho ou intoxicações (PLAIZIER et al., 2000). Além disso, a monensina está associada com aumento da digestibilidade da matéria seca e com a diminuição das concentrações de nitrogênio amoniacal ruminal.

Entretanto, mesmo com todos os benefícios observados com a inclusão de monensina sódica na diea, foram relatados problemas de resistência cruzada entre análogos da monensina ou ausência de resultados devido a um longo período de suplementação. Assim, a busca e desenvolvimento de compostos análogos à monensina, capazes de atuar de forma similar em relação à produção de leite se faz necessária; ao passo que haja possibilidade de utilização alternada de compostos sem que ocasione prejuízos diretos ao animal ou à microbiota ruminal por mecanismos de adaptação. Dentre essas alternativas os produtos naturais com compostos bioativos vêm sendo estudados com resultados promissores.

Alguns compostos bioativos produzidos por actinobactérias presentes em alguns biomas desempenham importante papel biológico, pela capacidade de produzir substâncias bioativas (GOODFELLOW; FIEDLER, 2010). Cerca de 9000 moléculas biologicamente ativas já foram isoladas das actinobactérias e destas, 60% são aplicadas na medicina e na agricultura. Dentre essas moléculas ativas, os principais compostos estudados são produzidos por bactérias *Streptomyces* e são conhecidos pelas atividades biológicas que desempenham (DEMAIN; SANCHEZ, 2009). Por outro lado, esses metabólitos ativos produzidos pelas actinobactérias podem variar de acordo com o ambiente a partir do qual as cepas são isoladas.

O uso do '*screening*', ou seja, do isolamento de espécies de bactérias a partir de ambientes específicos têm sido utilizado para a descoberta de novos extratos com aplicações biotecnológicas. Sendo assim, o presente estudo tem por objetivo avaliar extratos brutos produzidos por actinobactérias utilizando como controle positivo a monensina sódica, na modulação da fermentação ruminal, incluindo a digestão de fibras, produção de gases, metano, produção de ácidos graxos de cadeia curta e nitrogênio amoniacal em vacas leiteiras em lactação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 UTILIZAÇÃO DE ADITIVOS ALIMENTARES PARA VACAS EM LACTAÇÃO

Na dieta dos ruminantes, os carboidratos fermentados a ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e parte da massa microbiana são responsáveis por fornecer a maior parte da demanda energética, cerca de 70 a 80 % das exigências diárias. Adicionalmente, a proteína oriunda da dieta é degradada no rúmen a aminoácidos simples para então serem também convertidos aos AGCC e amônia (HUNGATE, 1966).

Entretanto, em momentos de maior oferta de alimento e consequentemente maior demanda nutricional, a produção de AGCC no rúmen não consegue suprir as exigências do animal e a fermentação dos nutrientes pode ficar prejudicada. Como resultado, várias estratégias têm sido utilizadas para melhorar a eficiência alimentar de ruminantes, seja melhorias no processamento dos grãos ou presença de ingredientes inertes indisponibilizando o alimento ao ataque de microrganismos no rúmen. Outra técnica para melhorar a eficiência da fermentação incluiu a adição de compostos antimicrobianos da classe dos aditivos nas formulações a fim de alterar o balanço microbiano do rúmen, favorecendo alguns microrganismos mais resistentes à ação dos aditivos.

Os aditivos são substâncias ou microrganismos não consumidos como alimento, mas adicionados intencionalmente às dietas dos ruminantes, no intuito de melhorar as características do alimento ou dos produtos de origem animal. Este pode ter ou não algum valor nutritivo, porém não tem o propósito inicial de nutrir. Os classificados em nutricionais e zootécnicos tem maior utilização pela cadeia de produção animal enquanto que os tecnológicos e sensoriais são empregados no setor industrial (SINDIRAÇÕES, 2009).

Dentre os aditivos mais utilizados na alimentação de bovinos leiteiros, destacam-se os ionóforos, antibióticos promotores de desempenho, leveduras, sabões de cálcio, tamponantes, enzimas, ácidos orgânicos, extratos de plantas, própolis, entre outros. A utilização dos aditivos alimentares na alimentação de vacas leiteiras tem por objetivo permitir a modulação da fermentação animal no intuito de aumentar a produção de leite e consequentemente a rentabilidade de setores de exploração leiteira (CAMPOS NETO et al., 1995). Nesse contexto, os ionóforos vêm sendo largamente utilizados visto sua facilidade de obtenção e benefícios comprovados com a utilização do produto.

Os ionóforos são produtos resultantes da fermentação dos actinomicetos, sendo produzidos principalmente pelas bactérias do grupo *Streptomyces sp*p, especialmente o *Streptomyces cinnamonensis*, inicialmente utilizado como anti-coccidiostáticos em dietas de aves (RICHARDSON et al., 1976). São caracterizados como moléculas orgânicas altamente lipofílicas de médio a alto peso molecular capazes de se ligarem a cátions, mono ou bivalentes, como Ca^{+2}, Mg^{+2}, K^{+} e Na^{+}. Possuem um exterior hidrofóbico e o interior hidrofílico, o que aumenta essa capacidade de ligação (RUSSELL; STROBEL, 1989).

Essas moléculas podem ser tóxicas para algumas bactérias, protozoários e fungos (RUSSELL; STROBEL, 1989). Essa toxicidade é resultante da capacidade da molécula em penetrar nas membranas biológicas e assim alterar o fluxo de íons ao interior da célula. Os ionóforos funcionam como transportadores seletivos; na criação de poros que facilitam o influxo e efluxo dos íons pela membrana. Dentro dessa divisão, a monensina, por exemplo, serve de antiporte, ou seja, há a troca de cátions H^{+} por cátions monovalentes (FELLNER; SAUER; KRAMER, 1997) e ela se liga preferencialmente ao sódio, mas também tem a capacidade de transportar potássio (RUSSELL; STROBEL, 1989).

Essa atividade de troca iônica é específica e cada ionóforo catalisa o transporte de determinado íon, ao passo que é dependente do pH do meio, do gradiente de concentração de cada cátion e do mecanismo de transporte via membrana lipídica (SCHELLING, 1984). A descoberta dos ionóforos ocorreu por meio de estudos sobre o transporte energético de moléculas pela membrana mitocondrial. Essa descoberta proporcionou a ligação entre transporte e metabolismo energético, como também deu início a estudos em nível molecular para estabelecer o correto mecanismo de ação de cada substância com ação ionófora (PRESSMAN, 1976).

Na década de 1970, a “Food and Drug Administration” (FDA) dos EUA permitiu o uso dos ionóforos como aditivos na dieta de ruminantes: a monensina sódica foi permitida em 1976 e a lasalocida em 1982 para uso em bovinos (RUSSELL; STROBEL, 1989).

2.1.1 Monensina sódica como aditivo alimentar

Há mais de 30 anos a monensina sódica vem sendo utilizada nas produções de ruminantes, com destaque para a cadeia leiteira e cada vez mais tem seu uso consolidado quando se objetiva aumentar a produção de leite, aumentar a eficiência de fermentação ruminal e diminuir a incidência de doenças metabólicas. Entretanto, as pesquisas que envolvem monensina para vacas em lactação produzem resultados ainda variáveis, indicando que podem existir muitos fatores, desde a fisiologia própria de cada animal até as diferenças dietéticas de cada formulação, que interferem na resposta esperada da suplementação (IPHARRAGUERRE; CLARK, 2003).

Assim, alguns fatores fisiológicos como o período de lactação, ordem de partos e nível de produção e fatores dietéticos, tais como a forma como a dieta é ofertada (volumoso, pastejo, concentrados) estão intimamente relacionados com a resposta esperada após a administração da monensina. Ainda assim, a dose do aditivo utilizado também se torna fator importante quando se deseja aumentar a produção de leite dos animais, uma vez que podem produzir efeitos negativos aos esperados (GANDRA, 2009).

Têm sido descrito que a principal ação dos ionóforos nos ruminantes esteja relacionada por sua capacidade de modular a população microbiana do rúmen e assim algumas bactérias seriam beneficiadas enquanto outras teriam sua função prejudicada. Diante disso, vários aspectos puderam ser descritos como benéficos ao animal, desde ao maior estoque de energia pela produção de propionato até a diminuição da produção de metano pela diminuição da população das bactérias metanogênicas (RANGEL et al., 2008).

2.1.1.1 Efeito do uso de ionóforos na fermentação ruminal

Quando há aumento da taxa de fermentação do rúmen e o ambiente ruminal torna-se mais adequado para o metabolismo dos microrganismos, os animais têm aumento do desempenho produtivo decorrente da utilização mais eficaz dos nutrientes (HUNGATE, 1966).

Alguns estudos foram desenvolvidos para determinar os efeitos diretos e indiretos dos ionóforos sobre a modulação da fermentação ruminal. Os efeitos mais estudados foram a

diminuição da relação acetato:propionato, com consequente aumento da disponibilidade energética para o animal; modulação do pH ruminal, diminuição da desaminação protéica no rúmen e diminuição indireta dos níveis de gás metano produzido (RANGEL et al., 2008).

O mecanismo de ação dos ionóforos sobre as bactérias ruminais é baseado nas diferenças da parede celular de cada organismo, responsável por equilibrar o meio interno e o meio externo. Quando o ionóforo realiza a troca de cátions na membrana da bactéria, particularmente da Gram positiva, esta tenta exportar esses cátions que vão se acumulando no interior celular na tentativa de manter o pH interno adequado. Ao utilizarem bombas Na^+/K^+ ATPase e/ou próton ATPase, utilizam energia no processo e acabam morrendo por esgotamento energético (BAGG, 1997).

Além das bactérias ruminais, os protozoários também têm sido reportados como alvo dos ionóforos em estudos *in vivo*, porém o grau de sensibilidade pode variar com a espécie ou com o tipo de substrato a que o animal é submetido (RICHARDSON et al., 1976). As bactérias Gram negativas se mostram mais resistentes aos ionóforos do que as Gram positivas, ao passo que apresentam em sua constituição uma membrana externa de proteção que impede a ação dos ionóforos. Dentre as bactérias Gram negativas podemos citar as produtoras de ácido propiônico enquanto que as Gram positivas englobam as produtoras de metano e ácido lático (RUSSELL; STROBEL, 1989).

A primeira descoberta da atuação da monensina data de 1974, quando foi observado aumento da produção de propionato ruminal e mudanças na produção de AGCC e daí então a monensina teve melhor aplicação comercial para a bovinocultura de corte, no intuito de otimizar a utilização de energia nas dietas de terminação (RAUN, 1974). Um dos benefícios do aumento da concentração de ácido propiônico no rúmen é a diminuição de perdas de energia por incremento calórico, já que o incremento calórico do ácido acético é maior do que o do propiônico (BERGEN; BATES, 1984), o que pode resultar em maior disponibilidade de energia para a produção ou menos energia exigida para mantença (TEDESCHI; FOX; TYLUTKI, 2003).

O propionato é o maior precursor gliconeogênico do fígado de ruminantes (ASCHENBACH et al., 2011), responsável por uma contribuição estimada de 32-73% para a gliconeogênese na produção de glicose como fonte energética (SEAL; REYNOLDS, 1993). Para novilhos alimentados com forragem e concentrado, a administração de monensina aumentou significativamente a produção de propionato em até 76% em relação ao grupo controle (ROGERS; DAVIS, 1982), enquanto que para vacas leiteiras no pós-parto Markantonatos et al. (2009) observaram que a administração de 300 mg por dia de monensina

afetou a concentração de acetato antes do parto até 23%, mas não conseguiu afetar a concentração de propionato antes e após o parto, possivelmente pela alta exigência energética desse período.

Em contrapartida, outro estudo mostrou aumento da glicose hepática pós-parto em resposta ao aumento das inclusões de amido na dieta juntamente com a monensina. As vacas que se alimentavam com dietas mais propiogênicas (amido ou monensina) tiveram aumento da produção de leite e consumo de matéria seca no pós-parto imediato. A monensina também causou diminuição da gordura do leite e porcentagens de lactose (MCCARTHY et al., 2015a).

Quando administrada juntamente com diferentes teores de amido e óleo de milho *in vitro,* a monensina adaptada ou não à microbiota causou efeito de inclusão, embora os principais efeitos dos teores de amido, do pH, do óleo de milho e da monensina não tenham afetado a produção líquida de AGCC após 24 horas de fermentação. Entretanto foi observada redução na relação acetato:propionato para os dois tipos de inóculo (adaptado ou não) (WEIMER et al., 2011).

Em outro estudo *in vitro* juntamente com a administração de fonte de gordura (óleo de palma), a monensina alterou a fermentação ruminal reduzindo a produção de gás, a concentração de AGCC, a proporção de acetato e relação acetato:propionato, enquanto que mostrou aumento na proporção de propionato. Entretanto, estudos *in vitro* com interação de fontes de gordura ainda são limitados, porém sugere-se que a adição de gordura possa diminuir a magnitude da atividade da monensina ou ainda que a fonte de gordura altere a solubilidade da monensida em lipídeos (KIM et al., 2014).

Adicionalmente, a inclusão de monensina na alimentação de vacas leiteiras propiciou menores concentrações de betahidroxibutirato (BHBA), acetoacetato e ácidos graxos não esterificados (AGNE). Isso pode ser resultado do aumento de glicose observado, o que é benéfico para as vacas em transição (DUFFIELD; RABIEE; LEAN, 2008a).

No período de transição (final do pré-parto e início do pós-parto) as vacas de maior produção mobilizam muita gordura corporal a fim de atender a demanda energética não atendida pelo baixo consumo de alimentos. Sendo assim, pode ocorrer acúmulo de corpos cetônicos e levar o animal a um quadro de cetose. Com o aumento do propionato ruminal há maior disponibilidade de glicose e ATP e consequentemente menor mobilização das reservas corporais, sendo benéfica a suplementação nesse período (RANGEL et al., 2008).

Os efeitos da monensina podem se apresentar isoladamente ou em conjunto com a administração com outros ionóforos ou antibióticos. Ao fazer a administração combinada de virginiamicina com monensina houve aumento da energia líquida para a produção leiteira

quando comparada ao efeito de cada composto isoladamente. Ambas suplementações diminuíram as concentrações de BHBA, demonstrando grande potencial para utilização durante o balanço energético negativo afim de melhorar a performance do animal nesta fase (ERASMUS et al., 2008).

Outro efeito da modulação dos ionóforos sobre a fermentação ruminal consiste na modulação do pH ruminal, permitindo melhor equilíbrio entre o momento de maior alcalinidade e o de maior fermentação (acidose). Quando o animal se alimenta com forragem, o pH do rúmen tende a permanecer perto da neutralidade enquanto que ao ingerir uma dieta com maior quantidade de grãos ocorre diminuição do pH, favorecendo a produção de ácido lático pelas bactérias ruminais. Os ionóforos diminuem a produção de lactato por inibir o crescimento do *Streptococcus bovis*, bactéria descrita como a principal causadora da acidose ruminal aguda (RUSSELL, 1987).

Devido a essa particularidade quanto ao tipo de dieta influenciar o pH, alguns resultados são muito variáveis. Para tratamentos utilizando gordura e monensina isoladamente ou em conjunto, não foram encontradas diferenças para pH (ZINN, 1988). Clary et al. (1993) também não observaram diferenças no pH quando realizaram suplementação de lasalocida, monensina e gordura isoladamente ou em conjunto.

Com a utilização de diferentes teores de monensina *in vivo* (24 mg/kg e 48 mg/kg MS), observou-se aumento para produção de leite e redução no consumo de matéria seca, entretanto não houve efeito observado para os valores de pH ruminal no tempo zero, apesar de ter sido observado efeito de aumento do pH no tempo três de coleta ruminal (três horas após a alimentação) para os animais alimentados com o teor mais alto do ionóforo. Isto pode ser explicado devido à diminuição das bactérias produtoras de ácido lático (*Streptococcus bovis),* responsáveis pela maior acidificação do rúmen (GANDRA, 2009). Quando foi comparada a outra classe de aditivos, os óleos essenciais, a suplementação de monensina a novilhos de corte por um período de um mês de adaptação não afetou a média de pH, quando receberam feno de baixa qualidade (TOMKINS et al., 2015).

As primeiras pesquisas com a administração de ionóforos para avaliação da fermentação ruminal também reportavam redução na concentração de amônia. Algumas pesquisas *in vitro* caracterizavam os efeitos da monensina no metabolismo de nitrogênio, relatando que havia redução da proteólise e do acúmulo de amônia (VAN NEVEL; DEMEYER, 1977; WHETSTONE; DAVIS; BRYANT, 1981).

Além disso, ocorre diminuição da produção de amônia pelos microrganismos ruminais em consequência da menor degradação de proteínas digestíveis no rúmen (PDR) (DONIUS;

SIMPSON; MARSH, 1976; VAN NEVEL; DEMEYER, 1977), que permite maior absorção proteica no intestino. Dessa forma, poderiam ser incluídas na dieta proteínas de maior ‘valor biológico’, ou seja, com melhor perfil aminoacídico, aminoácidos essenciais e aminoácidos limitantes para a produção de leite, tais como a lisina e metionina (VAN SOEST, 1994).

Esse melhor perfil aminoacídico no intestino pode ser observado uma vez que foi descrita maior proporção de nitrogênio no abomaso, o que indica redução da degradação ruminal da proteína (MUNTIFERING; THEURER; NOON, 1981; FAULKNER et al., 1985). Além disso, observa-se aumento da concentração de aminoácidos glicogênicos na corrente sanguínea, os quais podem ser usados como precursores para a produção de lactose na glândula mamária e reduzir mobilização de reservas corporais (SCHELLING, 1984).

Com a inclusão de cápsulas de liberação lenta de monensina para vacas leiteiras nas últimas 3 semanas do pré-parto, observou-se aumento na digestibilidade aparente da fibra, aumento da digestibilidade da proteína bruta e do balanço de nitrogênio logo após o parto. O aumento da digestibilidade do nitrogênio foi devido principalmente à diminuição da proteólise a nível ruminal, enquanto que o aumento da digestibilidade da fibra se deu pelo aumento do pH ruminal, causado pela monensina. Entretanto, não foram observadas alterações no CMS ou na excreção de nitrogênio no leite ou na urina. (PLAIZIER et al., 2000).

A interação da monensina com teores de amido também mostrou afetar a quantidade de excreta de nitrogênio no leite. Vacas alimentadas com teores reduzidos de amido (21%) ou normais (27%) foram suplementadas com 18 g de monensina por tonelada de MS, nas quais foram observados aumentos na produção, e na porcentagem de proteína no leite e nos teores de lactose. Além disso, foram observados decréscimo do nitrogênio ureico do leite (NUL) na dieta de inclusão normal de amido e tendência de aumento do mesmo quando comparado ao grupo controle (sem adição de monensina) (AKINS et al., 2014).

2.1.1.2 Efeito do uso de ionóforos sobre metanogênese

O uso dos ionóforos na dieta de ruminantes pode também ser uma estratégia para a mitigação das emissões de metano (THORNTON; OWENS, 1981; GUAN et al., 2006). Os ionóforos reduzem a formação do gás metano no ambiente ruminal de forma indireta, ao passo que a modulação do pH e inibição do crescimento de algumas bactérias Gram positivas

fazem com que estas não produzam hidrogênio e formato, intermediários na formação do metano (RANGEL et al., 2008).

Os microrganismos metanogênicos podem ser encontrados aderidos aos protozoários ou na fase intracelular dos mesmos (IRBIS; USHIDA, 2004), indicando que possa haver uma possível relação simbiótica na qual ao utilizarem o hidrogênio produzido pelos protozoários, favorecem a manutenção de um ambiente ruminal adequado (GOMES, 2009).

A emissão de metano pela fermentação entérica compreende 23% das emissões totais de metano por origens antrópicas (USEPA, 2011). Alguns estudos sugerem que a monensina sódica reduz a produção de metano ruminal em até 30% (WEDEGAERTNER; JOHNSON, 1983; RUSSELL; STROBEL, 1989; JOHNSON; JOHNSON, 1995).

O fornecimento de curto e longo prazo da monensina de forma isolada e em conjunto com a lasalocida em novilhos resultou em diminuição das emissões de metano, em L/kg de MS ou em % energética. Ambos ionóforos apresentaram efeitos similares quanto à quantidade de metano emitido e à diminuição da população total de protozoários ciliados (GUAN et al., 2006).

O efeito da diminuição de gás metano pode ser indireto pela alteração das rotas metabólicas, com o aumento da produção de propionato em vista de acetato (MOSS; JOUANY; NEWBOLD, 2000). Além disso, os ruminantes conseguem manipular as fontes produtoras de metano pela fermentação ruminal, a qual está relacionada ao tipo de alimento consumido, digestibilidade e categoria animal (RIVERA et al., 2010).

Entretanto, mesmo com a diminuição das emissões de gases, a presença de metano e CO_2 no rúmen se faz necessária para evitar o acúmulo de íons H^+, responsáveis pela diminuição do pH ruminal e por alterar o funcionamento normal do órgão (WEIMER; WEIMER, 1998). Uma alternativa para consumo destes íons está na biohidrogenação realizada por lipídios insaturados, que, além disso, promovem a deleção das arqueias metanogênicas (MACHMÜLLER et al., 1998; WADA et al., 2008).

A tentativa de diminuição das emissões de metano pelos ruminantes tem sido foco de pesquisas não só para o uso de ionóforos usados isoladamente, mas também em conjunto com outros aditivos, como os óleos essenciais (p.e. CRINA®). Em estudo recente, a proposta foi determinar o efeito da junção desses dois aditivos: CRINA® Ruminants (1 e 2 g/dia) e monensina (60 e 250 mg/dia) nas avaliações de fermentação ruminal, produção entérica de metano e seleção da população metanogênica no ambiente ruminal em novilhos Brahman (*Bos indicus*) alimentados com feno. As mensurações de metano foram realizadas durante 24 horas por um circuito aberto de respiração. Esse estudo demonstrou que a CRINA isolada não

mostrou efeito significativo na fermentação ou nas emissões de metano quando comparada com a monensina em maior dose diária (TOMKINS et al., 2015).

Em contrapartida, quando a monensina foi administrada juntamente à dieta total (TMR) em concentração de 24 mg/kg MS para vacas Holandesas em lactação alimentadas *ad libitum* (relação forragem:concentrado 60:40), houve redução de 7% (expressos em g/dia) e 9% (expressos em g/kg PV) na concentração de metano (ODONGO et al., 2007). Em outro modo de fornecimento, a monensina foi administrada a vacas de leite criadas a pasto de azevém sob duas cápsulas (240 mg/dia) de liberação lenta com intervalo de 130 dias entre uma e outra. A produção de leite foi mensurada durante 100 dias após o fornecimento de cada cápsula e o metano foi medido durante 4 dias após 25 e 81 dias após o fornecimento da primeira, e 83 dias após o fornecimento da segunda cápsula. Observou-se aumento da produção de leite e sólidos, particularmente gordura. Entretanto, não foram observadas reduções nas emissões de metano entérico a curto ou a longo prazo nessas condições (GRAINGER et al., 2008).

Em meta-análise recente de Appuhamy et al. (2013) foram compilados dados de 22 estudos sobre vacas leiteiras e novilhos de corte, nos quais foram avaliados os efeitos da monensina sobre a produção de metano (g/dia) e a porcentagem da perda energética para essa produção. Foi observado que a monensina reduziu significantemente as emissões de metano nos novilhos de corte em cerca de 20 g/dia, mas o efeito foi menos expressivo nas vacas leiteiras (-6g/dia).

O CMS e a composição nutricional da dieta parecem ser fatores que modificam o efeito do ionóforos sobre as emissões de metano, entretanto a suplementação com monensina em concentração mais alta, proporcional ao CMS pode reduzir potencialmente as emissões de metano pelas vacas leiteiras (APPUHAMY et al., 2013).

2.1.1.3 Efeito do uso de ionóforos sobre a produção e composição do leite

Os resultados em produção de leite frente ao uso de ionóforos são relacionados ao mecanismo de ação de cada um no rúmen, ao passo que o aumento do propionato relatado quando há utilização desses aditivos aumenta o fluxo de glicose via gliconeogênese, o que contribui para o aumento da produção (OBA; ALLEN, 2000). Além disso, podemos enumerar alguns fatores que interferem diretamente na resposta esperada, como estágio de lactação, tipo

de alimentação ofertada (volumoso:concentrado), categoria animal e nível de produção dos animais suplementados (DUBUC et al., 2009).

Em meta-análise com 9.677 vacas, foi analisada a inclusão de monensina sódica para vacas em lactação sobre os parâmetros de produção e composição de leite. Foi observado aumento na produção de leite concomitantemente com o decréscimo do CMS, aumentando assim a eficiência da produção de leite. Entretanto, alguns efeitos sobre produção entre os diferentes rebanhos podem depender de uma variedade de fatores, podendo afetar também a proporção de CLA no leite (DUFFIELD; RABIEE; LEAN, 2008b). Gandra (2009), em estudo comparativo de doses de monensina sódica (24 versus 48 mg/kg na MS), indica a dose de 24 mg/kg MS de monensina para vacas no terço médio de lactação, visto que a maior dose foi acompanhada de forte redução do CMS, diminuindo o desempenho produtivo dos animais em estudo.

Sob administração de 240 mg/dia de monensina em cápsulas de liberação lenta observou-se aumento da eficiência de produção de leite em vacas lactantes sob sistema em pastejo, pelo aumento da produção de sólidos, particularmente gordura. As vacas aumentaram em aproximadamente 50 g/dia a produção de gordura do leite e consequentemente em 70 g/dia a concentração de sólidos (GRAINGER et al., 2008).

Normalmente, uma suplementação com monensina causa aumento na produção de leite e diminuição da gordura e porcentagens de proteína (HAYES; PFEIFFER; WILLIAMSON, 1996; PHIPPS et al., 2000). Entretanto, o uso de análogos da monensina, tal como a lasalocida, ainda causa efeitos contraditórios na produção e composição de leite. Quando foram comparadas primíparas e multíparas, observaram-se resultados divergentes após a introdução da lasalocida. Nas primeiras houve aumento da produção de leite enquanto que nas últimas foi observada diminuição da produção (KNOWLTON; ALLEN; ERICKSON, 1996). Ainda assim, observa-se também poucos relatos do efeito da administração de lasalocida sobre os componentes do leite.

Outro estudo com vacas em lactação testou a inclusão de 24 mg monensina/kg de MS em dietas basais de grão de soja integral ou tostado e não foram observados efeitos na produção de leite bem como nas concentrações de gordura, proteína e lactose (ABDI et al., 2013). Algumas discrepâncias entre estudos podem estar relacionadas a esses fatores variáveis como fase de lactação, dieta basal, e duração do experimento. Além disso, Sauer et al. (1998) sugeriram que os microrganismos do rúmen podem se adaptar quando são submetidos à monensina, e assim os animais se tornam não-responsíveis a um novo período de suplementação. A genética também pode influenciar a resposta para a suplementação de

monensina quanto aos efeitos sobre produção de leite, no qual vacas de maior mérito genético podem responder melhor à suplementação (VAN DER WERF; JONKER; OLDENBROEK, 1998).

Os efeitos observados para produção e composição de leite também podem ser originados da combinação de mais de um tipo de aditivo utilizado nas dietas dos ruminantes. Quando são utilizados na mesma dieta um princípio de ionóforos e um não-ionóforo pode-se encontrar maximização do efeito positivo da produção de leite. Em estudo com suplementação combinada de virginiamicina (não-ionóforo) e monensina sódica observou-se aumento da produção de leite corrigida para gordura quando comparada com a administração única de cada suplemento. Assim é possível que haja efeito positivo quando há a junção dos dois aditivos, melhorando o balanço de energia, estabilizando o CMS e a fermentação ruminal, além dos efeitos pós-rúmen observados com o uso da virginiamicina (ERASMUS et al., 2008).

Sobre os efeitos da administração de monensina para vacas em período de transição, pode-se dizer que depende da manipulação do comportamento ingestivo nessa fase, consequentemente na resposta do pH ruminal e expressão de genes ligados ao metabolismo como um todo. Para tanto, foram utilizadas vacas lactantes durante o período de transição que recebiam 400 mg/vaca dia de monensina 21 dias antes da data prevista do parto, como também nos 21 dias do pós-parto. Entretanto, embora tenham sido observados efeitos benéficos diretamente no metabolismo, não foram observados efeitos diretos na produção de leite (MULLINS et al., 2012).

A otimização do CMS durante o período de transição é bastante importante para suprir a energia suficiente para a produção de leite subsequente. Em estudo com administração de monensina no pré-parto sob dieta ‘close-up’ e no pós parto sob diferentes teores de amido da dieta (26,2% versus 21,5%) mostrou que os animais alimentados com monensina durante o período pré-parto tiveram maior propensão em converter propionato em glicose, bem como demonstraram aumento na concentração de glicose plasmática e redução nas concentrações de corpos cetônicos, resultando em menores aparições de cetose subclínica. Assim, animais que se alimentam de dietas mais propiogênicas no início da lactação pelo aumento de amido ou inclusão de monensina têm o status energético do pós parto melhorado (MCCARTHY et al., 2015b).

Com relação ao perfil de ácidos graxos no leite após período de suplementação com monensina, vacas multíparas foram suplementadas em dietas fontes de ômega 3 e avaliadas quanto a produção e composição de leite, CMS, digestibilidade, parâmetros sanguíneos e

perfil de ácidos graxos do leite. Não foram observadas variações no CMS, entretanto a suplementação com monensina aumentou as concentrações de cis-9, trans-11 e diminuiu as concentrações de ácidos graxos saturados no leite, melhorando assim o perfil de ácidos graxos presentes no leite. Ademais, a inclusão de monensina sódica diminuiu a biohidrogenação dos ácidos graxos no rúmen, possibilitando maiores concentrações de ácidos graxos insaturados no leite (DA SILVA et al., 2007).

Em doses eficientes, a administração de ionóforos às vacas leiteiras não afeta ou diminui ligeiramente o CMS. Este, combinado com o aumento do fornecimento de nutrientes, como o propionato, causa o aumento da eficiência da produção de leite e da resposta imune do animal. A magnitude destes efeitos, no entanto, pode ser determinada por vários fatores, muitos ainda não compreendidos. Os efeitos positivos são comumente observados quando a dose de monensina varia de 240 a 335 mg/vaca/dia (IPHARRAGUERRE; CLARK, 2003).

2.1.1.4 Prevenção de distúrbios metabólicos

Outro benefício do uso de ionóforos na alimentação de ruminantes é sobre a saúde animal, visto que há modulação do pH ruminal. Em dietas baseadas em forragens, o pH ruminal mantém-se próximo da neutralidade, enquanto que em dietas mais energéticas, com maior inclusão de concentrados, ocorre a diminuição do pH ruminal. Em razão da menor produção de ácido lático pela diminuição da atividade das bactérias Gram positivas, ocorre manutenção do pH ruminal em níveis mais altos (NAGARAJA et al., 1982).

Têm se sugerido que o controle do pH ruminal seja basicamente por dois mecanismos distintos. O primeiro é sobre a inibição do *Streptococcus bovis* que, em conjunto com o *Lactobacillus* produzem ácido láctico e contribuem para a diminuição do pH e quadro acidótico. O segundo mecanismo está associado com a alteração da dinâmica alimentar de bovinos, adaptando-os em dietas de alto teor de grão e consequentemente altos níveis de carboidratos prontamente digestíveis no rúmen (carboidratos não fibrosos – CNF) (MCGUFFEY; RICHARDSON; WILKINSON, 2001).

Alguns trabalhos evidenciam o efeito da monensina sobre alguns parâmetros sanguíneos. Em meta-análise, Duffield; Rabbiee; Lean (2008a) observaram que bovinos de leite em lactação sob suplementação com monensina apresentaram menores concentrações sanguíneas de BHBA, acetoacetato e AGNE. O mesmo foi observado por Mullins et al.

(2012b) na diminuição do pico de BHBA plasmático, no entanto os valores de glicose, AGNE e insulina no pós-parto de vacas leiteiras não foram alterados. Já McCarthy et al. (2015) observaram valores diminuídos para AGNE, BHBA enquanto os valores de glicose e insulina se mostraram aumentados.

Essas alterações são benéficas para a vaca leiteira devido a todos os requerimentos energéticos que o animal precisa no início da lactação. Entretanto, ainda assim é possível observar variações dos efeitos de acordo com a dose do tratamento e o período de lactação para estes parâmetros sanguíneos (DUFFIELD; RABIEE; LEAN, 2008a).

É possível também correlacionarmos a diminuição da incidência de algumas doenças após um período de suplementação com monensina. Pesquisas europeias foram conduzidas através de 12 experimentos nos quais a monensina era oferecida para vacas leiteiras em variadas doses (150, 300 ou 450 mg/vaca/dia) no período pré-parto até as 32 semanas de lactação. Os resultados mostraram que a monensina administrada no pós-parto reduziu a incidência de mastite clínica (4%), enquanto que sob administração no pré-parto foi possível observar redução da mastite na primeira lactação em novilhas em até 13% (HEUER et al., 2001).

A oferta de monensina sob cápsulas de liberação lenta também se mostrou efetiva no combate de timpanismo (LOWE et al., 1991) e cetose subclínica, sendo que a gravidade desta última foi associada com o grau de déficit energético pelo qual o animal se encontrava (MCGUFFEY; RICHARDSON; WILKINSON, 2001). A cetose pode acontecer como um episódio único ou em associação com outras doenças, por predispor o animal a outras condições, como deslocamento de abomaso, metrite e cisto ovariano (GRÖHN; SALONIEMI; SYVÄJÄRVI, 1986). Em grupos de novilhos, onde o pH ruminal era mensurado continuamente durante 24 horas a monensina mostrou impacto na redução da acidose ruminal, associado com um consumo de matéria seca menos errático (COOPER et al., 1997).

2.1.2 Moléculas alternativas à monensina

Os produtos naturais têm sido identificados como uma fonte de compostos bioativos que podem desempenhar atividade antibiótica ou até ionófora. Actinobactérias são microrganismos capazes de produzir extratos brutos farmacologicamente ativos empregados

como agentes antifúngicos, imunossupressores, antineoplásicos, anticancerígenos e também antibacterianos. Alguns microorganismos são produzidos a partir de vários ambientes, como o solo, árvores e mangue, compostos em extratos brutos isolados, por exemplo o AMC (CREVELIN et al., 2014) e o Caat (isolado pela Embrapa Cerrado). Algumas pesquisas têm identificado metabólitos ativos por meio de micro-extração e cromatografia líquida (SMEDSGAARD, 1997) e alguns apresentam atividade ionófora semelhantes à monensina.

Os extratos AMC e Caat foram escolhidos para o presente estudo por sua maior capacidade de produzir compostos com atividade antibiótica e ionófora. Alguns têm sido utilizados como moduladores de íons em algumas aplicações, seja como cotransportadores em membranas humanas ou animais, para carreamento de cátions entre os meios intra e extra celular. A dinactina, encontrada no AMC por exemplo, tem sido isolada também de uma variedade de espécies de *Streptomyces* e apresenta atividade antibacteriana, antifúngica, acaricida, inseticida, além de efeitos coccidiostáticos e anti-helmínticos (REZANKA et al., 2004; KUSCHE et al., 2009).

A valinomicina, também encontrada no AMC, carreia cargas positivas quando ligada a cátions e é uniporte, ou seja, transporta K^+ pela membrana através de um gradiente de concentração sem que haja qualquer movimento reverso de H^+ (RAMOS; KABACK, 1977). Têm sido estudada quanto à inibição parcial da biohidrogenação em ruminantes, com consequente aumento de ácidos graxos essenciais e conjugados (FELLNER; SAUER; KRAMER, 1997). Além disso, estudos relatam que na mitocôndria, a valinomicina pode, sob algumas condições, agir como um desacoplador da fosforilação oxidativa (HARRIS et al., 1966; DE CESPEDES; CHRISTENSEN, 1974).

A actinomicina D, presente com maior atividade no extrato Caat, também conhecida como actinomicina IV, dactinomicina e actinomicina C1 é um antibiótico produzido pela actinobactéria *Streptomyces antibioticus* e reconhecidamente um potente inibidor de transcrição e replicação (BAYONA-BAFALUY; MANFREDI; MORAES, 2003). Sua ação é primariamente mediada pela inibição da formação das forquilhas de transcrição e replicação mediada pelas DNA e RNA polimerases, respectivamente (SOBELL, 1985). A actinomicina D é um método alternativo de enucleação química de ovócitos maturados *in vitro* destinados à transferência nuclear (MOURA, 2007).

No entanto, alguns estudos descrevem que o uso contínuo de determinado ionóforo pode aumentar a resistência das bactérias ruminais. O mecanismo de resistência pode estar associado com modificações dos polissacarídeos de membrana ou aumento da atividade da bomba iônica de troca (RUSSELL; STROBEL, 1989). Com relação a essa resistência,

culturas mistas de microrganismos ruminais adaptadas a propionato de laidlomicina eram menos afetadas pela monensina comparados a bovinos não adaptados (DOMESCIK; MARTIN, 1999b). Ademais, foi comprovada que a resistência à monensina aumentava a resistência à lasalocida, ou seja, resistência cruzada entre ionóforos (NEWBOLD; WALLACE; WALKER, 1993).

Entretanto, em estudo *in vitro* não foi comprovada resistência cruzada entre lasalocida e monensina, somente diante das populações bacterianas ruminais. Isso pode ser devido a diferenças no modo de ação visto que a lasalocida tem predileção por K^+ e a monensina tem maior afinidade com o Na^+ (PRESSMAN, 1976).Com relação à população de protozoários, os ionóforos causam efeito transitório na população na redução do número de protozoários mediante administração da monensina em curtos períodos, entretanto eles retornavam seu crescimento após três semanas de fornecimento (GUAN et al., 2006).

A adaptação da microbiota ruminal pode ser também influenciada pelo tipo de dieta, quando a base da alimentação é forragens ocorre menor adaptação para a monensina (BERCHIELLI; PIRES; OLIVEIRA, 2011). De acordo com Russell e Houlihan (2003), a ideia mais provável é que seria uma seleção fenotípica, já que os genes que causariam resistência da microbiota ruminal não têm sido identificados, diminuindo as chances também de transferência de resistência a antibióticos dos animais para os humanos.

2.2 UTILIZAÇÃO DE TÉCNICAS IN VITRO PARA AVALIAÇÃO DE EFICIÊNCIA DE FERMENTAÇÃO RUMINAL

Para que o estudo da fermentação ruminal seja melhor executado e apresente resultados fiéis aos dados *in vivo*, diferentes sistemas *in vitro* têm sido realizados para que a fermentação continue em condições de laboratório, seguindo as mesmas exigências do organismo do animal (LÓPEZ, 2005).

As técnicas *in vitro* para determinação da eficiência da fermentação ruminal são vantajosas quando analisamos sua uniformidade de fermentação, a rapidez das análises e a conveniência de se manter poucos animais fistulados para utilização do inóculo. Para isso, a técnica procura simular as condições naturais da digestão do animal, de variados tipos de alimentos fornecidos. Assim, é importante que cada etapa seja a mais representativa possível, aumentando a confiança dos resultados. Visto essas condições adequadas de simulação do

ambiente ruminal, podemos observar formação de AGCC, CO_2, CH_4 e produção de massa microbiana (BLÜMMEL; GIVENS; MOSS, 2005).

2.2.1 Digestibilidade in vitro

A digestibilidade pode ser derivada do desaparecimento da matéria seca (TILLEY; TERRY, 1963) como também da produção total de gás, aliada a avaliação da cinética de digestão na qual as amostras são submetidas a um período de incubação (MENKE et al., 1979). Dentre as principais vantagens dos métodos de digestibilidade *in vitro,* citam-se o custo reduzido, a rapidez na obtenção de resultados, além da possibilidade de trabalhar com alto número de tratamentos e pequenas quantidades de amostra (ARAÚJO, 2010).

Inicialmente os métodos de digestibilidade *in vitro* eram utilizados somente para avaliação da degradação de alimentos. Entretanto, atualmente com o avanço e aperfeiçoamento da técnica, têm sido possível avaliar como a fermentação microbiana atua no alimento, bem como estudar o efeito da inclusão de suplementos alimentares ou até da ação de fatores antinutricionais presentes na amostra (DETMANN et al., 2006).

2.2.2 Produção de gases

Para realizar a técnica de produção de gás *in vitro* é necessária a incubação de amostras de alimentos em garrafas de vidro, nas quais após serem vedadas a produção de gás é realizada com um medidor de pressão acoplado a uma seringa plástica graduada. A quantidade de gases produzida durante o processo de fermentação é medida de tempos em tempos, a fim de se obter uma curva de degradação da amostra e produção de gás (THEODOROU et al., 1994).

Esse método de produção de gás tem como principal benefício a determinação não só da produção de gás total, mas da cinética de fermentação para cada amostra. Com pouca quantidade de amostra por garrafa se torna possível avaliar maiores quantidades de amostra (garrafas) ao mesmo tempo, possibilitando o resultado de várias observações que seriam

realizadas caso o ensaio fosse *in vivo* ou *in situ* (BLUMMEL; ØRSKOV, 1993). Além disso, permite estimar a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da matéria orgânica (DIVMO) como também mensurar gases liberados como metano (CH_4) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (BUENO et al., 2005).

2.2.3 Produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

Os AGCC são os principais ácidos produzidos durante a fermentação ruminal, destancando-se o acético, o propiônico e o butírico. Entretanto, segundo Kozloski et al. (2012), suas taxas de produção variam com o tempo após a ingestão e com o tipo de alimento ingerido. Ao mesmo passo, a emissão de metano relacionada com a produtividade do animal irá depender da eficiência de fermentação e da eficiência de conversão dos nutrientes, esta última dependente do balanço nutricional em que o animal se encontra (NEVES, 2008).

A produção de gases reflete quantitativamente a produção de AGCC e essa mensuração se torna muito importante dada a importância dos AGCC como fonte energética dos ruminantes. Entretanto, embora a produção de gases estime a quantidade de substrato utilizado para a produção de AGCC, também é possível relacionar positivamente a produção de gases com o consumo de concentrado (BLU¨MMEL; ØRSKOV, 1993) e com a síntese de proteína microbiana (KRISHNAMOORTHY; STEINGASS; MENKE, 1991).

2.2.4 Produção de gás metano

As técnicas de mensuração da produção do metano entérico através da produção de gases *in vitro* têm refletido com acurácia os resultados obtidos *in vivo*, sendo assim, adequadas para predizer o potencial de produção de metano em diferentes formulações de dietas para ruminantes; como também servir de base para a criação de estratégias para mitigar suas emissões (GETACHEW et al., 2005; BHATTA et al., 2006). Alguns estudos têm sido realizados a fim de comparar a técnica do traçador hexafluoreto de enxofre (SF_6), a técnica da simulação ruminal (RUSITEC) e a técnica *in vitro* para estimativa da produção de metano; e

têm-se estabelecido uma alta correlação entre a estimativa *in vivo* com a do traçador SF6 (JOHNSON et al., 1994).

O método *in vitro* quando comparado aos outros métodos tem a vantagem de ser mais barato, com menor tempo de execução, além de permitir condições experimentais mais precisas do que ensaios *in vivo*. Têm sido considerado um método de rotina na avaliação dos alimentos, visto sua alta correlação entre a produção de gases *in vitro* e a digestibilidade aparente, podendo ser utilizado assim para estimar medidas de mitigação de metano pelos ruminantes (BHATTA et al., 2006). Em função dessa precisão de análise e seu baixo custo (BUENO et al., 2005), a técnica tem sido utilizada com mais frequência em estudos de produção ruminal de metano (LOVETT et al., 2003).

Entretanto, a mensuração de metano *in vitro* sofre influência de alguns fatores, como por exemplo a atividade do inóculo (líquido ruminal) (CONE; VAN GELDER; BACHMANN, 2002). Na grande maioria dos ensaios *in vitro*, o inóculo é obtido a partir de animais alimentados com uma dieta diferente da utilizada como substrato para a incubação. Assim, as características de fermentação do substrato e a quantidade de metano produzido irão depender dessas características próprias de cada inóculo, da atividade microbiana de cada um e das variações das dietas (MARTÍNEZ et al., 2010).

2.2.5 Quantificação de nitrogênio amoniacal (N-NH_3)

A quantidade de N-NH_3 disponível no rúmen sofre variações e depende da degradação de compostos nitrogenados proteicos e não-proteicos, como também da ureia reciclada através da saliva. A manutenção de sua concentração em limites adequados, entretanto, é indispensável para garantir crescimento bacteriano, já que quase a totalidade de nitrogênio formador de bactéria é oriundo do N-NH_3 (STERN; HOOVER, 1979).

A digestão da celulose também é dependente da disponibilidade de N-NH_3 e da adesão de bactérias à superfície do alimento, pois alguns microrganismos responsáveis pela digestão de carboidratos utilizam o N-NH_3 como única fonte proteica. Apesar disso, um aumento demasiado da quantidade de N-NH_3 no rúmen é indicativo de perdas proteicas e, consequentemente, perdas econômicas para o produtor.

Os ensaios *in vitro* então, são baseados na quantificação da concentração ruminal de N-NH_3 como estimativa da degradação proteica. Por serem executáveis em curto prazo, os

ensaios permitem avaliar a utilização de proteína para diferentes dietas utilizadas, como também sob suplementação de aditivos como os ionóforos. Os primeiros estudos *in vitro* realizados para estimar a de degradação proteica foram feitos com amostras de alimentos incubados em inóculos em 1963 (CALSAMIGLIA; STERN; BACH, 2000).

Alguns ensaios já foram realizados com ionóforos, sendo que, com o fornecimento da dieta com monensina a concentração de nitrogênio ruminal foi menor quando comparada às outras dietas utilizadas, o que pode ser relacionado com a menor degradação da proteína no rúmen, diminuição da atividade das bactérias fermentadoras de aminoácidos, e diminuição da desaminação (LANA; RUSSELL, 2001).

3 PADRÃO DOSE-RESPOSTA DE EXTRATOS BRUTOS PRODUZIDOS POR ACTINOBACTÉRIAS SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL IN VITRO

RESUMO

Compostos bioativos produzidos por actinobactérias podem apresentar atividade antimicrobiana e ionófora; e podem ser utilizados como aditivos de dietas para aumentar a eficiência da fermentação ruminal. Sendo assim, este estudo objetivou avaliar o efeito de dois extratos brutos (AMC e Caat) produzidos por actinobactérias sobre variáveis de fermentação *in vitro*, tais como digestibilidade da matéria seca (DIVMS), digestibilidade da matéria orgânica (DIVMO), produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e gases acumulados totais. O extrato AMC foi composto por mistura de dois ionóforos, dinactina e valinomicina; enquanto que o extrato Caat apresentou como composto principal a actinomicina. Amostras de fluido ruminal foram coletadas de três vacas Holandesas em lactação, multíparas e portadoras de fístula ruminal alimentadas com dietas à base de silagem de milho, farelo de soja, ureia, milho moído e suplemento mineral. O inóculo foi incubado em frascos de vidro (garrafas) com 1 g da dieta seca e moída, juntamente com os extratos brutos e solução tampão. Para cada extrato bruto foram avaliadas quatro doses de suplementação (0,3; 0,6; 0,9 e 1,20 mg) em delineamento experimental inteiramente casualizado. Após 72 h de incubação, os resíduos de fermentação foram utilizados para estimar a DIVMS e DIVMO, produção de AGCC e gases acumulados totais. Com a inclusão do Caat houve diminuição linear da DIVMO após as 72 h de incubação. Além disso, com a inclusão do Caat foi observada redução da concentração de ácido isovalérico e butírico e da relação acetato:propionato e redução da produção de gás acumulado por 24, 48 e 72 h. Por outro lado, não foi observado efeito da inclusão de AMC sobre a modulação da fermentação ruminal, independentemente da dose utilizada. Pode-se concluir que o extrato Caat é capaz de modular a fermentação *in vitro*; no entanto, reduz linearmente a DIVMO com o aumento da dose.

ABSTRACT

Dose-response effect of raw extracts produced by actinobacteria on in vitro rumen fermentation

Bioactive compounds produced by actinobacteria may have antimicrobial and ionophore activity; and can be used as dietary additives to increase the efficiency of rumen fermentation. Thus, this study aimed to evaluate the effect of two crude extracts produced by actinobacteria (AMC and Caat) on in vitro fermentation, such as in vitro digestibility of dry matter (IVDDM), of organic matter (IVDOM), short chain fatty acids production (SCFA) and total accumulated gases. The AMC extract was made by mixing two ionophores, dynactin and valinomycin; while Caat extract showed actinomycin compound. Ruminal fluid samples were collected from three Holstein dairy cows, multiparous with ruminal fistula fed diets based on corn silage, soybean meal, urea, ground corn and mineral supplement. The inoculum was incubated in glass bottles with 1 g of dried and milled diet with the crude extracts and buffer solution. For each crude extract were evaluated four supplementation doses (0.3, 0.6, 0.9 and 1.20 mg) in a completely randomized design. After 72 h of incubation, fermentation residues was used to estimate the IVDDM and IVDOM, SCFA production and total accumulated gases. With the Caat inclusion there was a linear decrease in IVDOM after 72 h of incubation. Furthermore, the Caat inclusion showed reduced butyric and isovaleric acid concentration and acetate: propionate ratio and reduction of cumulative gas production by 24, 48 and 72 h. On the other hand, there was no effect of AMC inclusion on ruminal fermentation, regardless of the dose used. It can be concluded that the Caat extract is able to modulate the in vitro fermentation; however, it reduces IVDOM with increasing dose.

3.1 INTRODUÇÃO

Os ionóforos são aditivos utilizados na nutrição de ruminantes com a finalidade de modular a fermentação ruminal por meio da seleção e inibição de grupos de microrganismos da microbiota ruminal. Os principais efeitos da administração de ionóforos na dieta de ruminantes foram avaliados com o uso da monensina sódica, dentre os quais destacam-se a redução da produção de metano (NARVAEZ; WANG; MCALLISTER, 2013) e da desaminação proteica (DINIUS; SIMPSON; MARSH, 1976; NARVAEZ; WANG; MCALLISTER, 2013), e o aumento da produção de ácido propiônico, o que favorece o metabolismo energético e aumenta eficiência de fermentação.

Estes aditivos têm sido utilizados amplamente entre os rebanhos leiteiros alimentados com dietas ricas com concentrados para aumentar eficiência da fermentação no rúmen, e consequentemente, a produção de leite. No entanto, embora tenham amplo uso em dietas de ruminantes, alguns estudos sugerem uma possível resistência dos microrganismos ruminais a alguns compostos, principalmente à monensina sódica que é mais utilizada; decorrente de uma relação cruzada entre outros metabólitos (NEWBOLD; WALLACE; WALKER, 1993) ou diminuição do potencial de atuação dos ionóforos quando os inóculos advém de animais já suplementados *in vivo* (DOMESCIK; MARTIN, 1999a). Desta forma, novas alternativas de aditivos se tornam necessárias.

Os metabólitos naturais produzidos por actinobactérias, fungos e cianobactérias têm sido identificados como uma fonte de compostos bioativos que podem desempenhar atividade antimicrobiana e ionófora. Recentemente, extratos brutos produzidos por actinobactérias foram isolados a partir de vários ambientes, como o solo, árvores e mangue, dentre os quais extratos AMC (CREVELIN et al., 2014) e o Caat (comunicação pessoal[1]) foram descritos por espectrometria de massas por apresentarem compostos com atividade ionófora, com alta afinidade para cátions. A identificação dos metabólitos ativos presentes nesses extratos produzidos por actinobactérias foi feita por meio de micro-extração e cromatografia líquida segundo Smedsgaard (1997), dentre os quais alguns extratos apresentaram atividade ionófora semelhantes à monensina.

Desta forma, a hipótese do presente estudo é que os extratos AMC e Caat, produzidos por actinobactérias apresentam atividade ionófora semelhante à da monensina sódica para a

[1] Comunicação pessoal cedida pelo professor Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moares - LEMAPN

modulação da fermentação ruminal. Para testar esta hipótese, os extratos AMC e Caat serão avaliados em diferentes doses em um ensaio fermentativo *in vitro* de 72 horas, sob inóculo de vacas leiteiras. A produção acumulada de gás, a produção de ácidos graxos de cadeia curta e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca e da matéria orgânica serão avaliados.

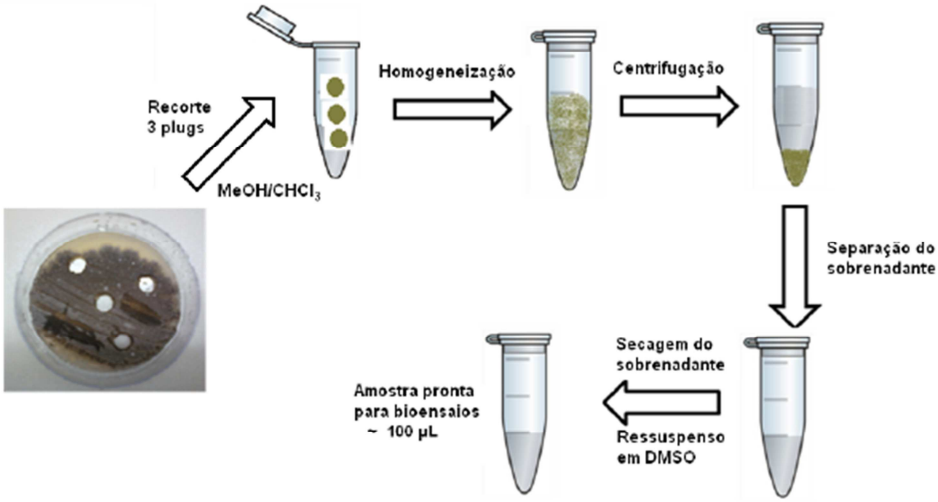
3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Seleção de metabólitos e caracterização química

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (nº 2038140514). Os metabólitos ativos utilizados no presente estudo foram fornecidos pelo Laboratório de Espectometria de Massas Aplicada a Produtos Naturais (LEMAPN) do Departamento de Química da Universidade de São Paulo. As actinobactérias produtoras desses metabólitos foram previamente isoladas pela Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna-SP) em estudo da biodiversidade microbiana do bioma caatinga e de solos de reflorestamento do estado de São Paulo. Nestes estudos foram caracterizados cerca de 500 isolados de actinobactérias de 10 gêneros diferentes que foram submetidos a processos fermentativos em meios líquidos para obtenção de extratos brutos por meio de técnica de micro extração (SMEDSGAARD, 1997) e estes submetidos à cromatografia direta para identificação de possíveis metabólitos com atividade antibiótica ou ionófora.

Para obtenção do extrato bruto, os isolados de actinobactérias foram cultivados em placas de Petri com meio batata-dextrose-ágar (BDA) durante 10 dias a uma temperatura de 27°C. Após este período foram recortados 3 discos de aproximadamente 6 mm de diâmetro, e colocados em microtubo de polietileno contendo 1 mL da mistura metanol/clorofórmio 1:1. A amostra foi centrifugada e o sobrenadante transferido para outro microtubo; e então submetida a espectrometria de massas e ensaios de bioautografia direta (SMEDSGAARD, 1997) (Figura 1).

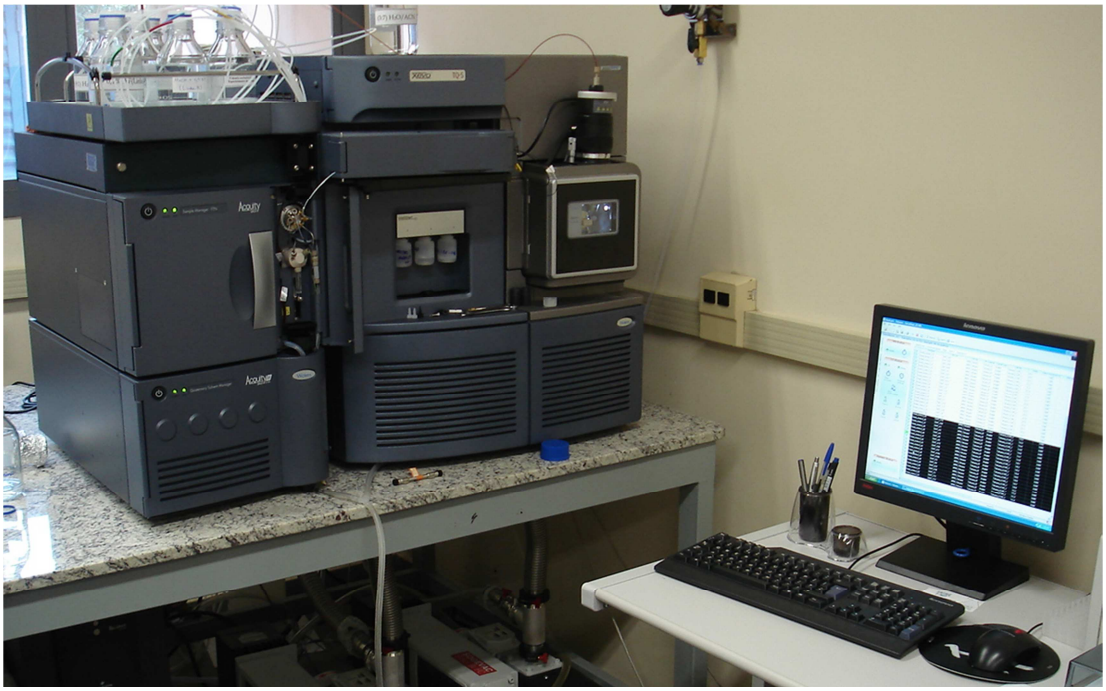
Figura 1 - Esquema ilustrativo do procedimento de micro extração do extrato bruto



Fonte: Moraes (2013)

Os espectros de massa foram submetidos a um estudo comparativo no banco de dados Chemical Abstract (CAS) e Dictionary of Natural Products (DNP) e assim as massas moleculares dos compostos analisados foram correlacionadas com os compostos catalogados nestes bancos de dados, no caso do estudo as actinobactérias de diferentes gêneros (Figura 2).

Figura 2 - Sistema de cromatografia líquida (HPLC) acoplado a espectrômetro de massas utilizado na identificação e caracterização química de metabólitos derivados de actinobactérias



Fonte: Moraes (2016).

De um total de 74 isolados de actinobactérias, foi possível identificar os principais compostos presentes nos extratos brutos com maior atividade como pertencentes à classe dos macrotetrolídeos (JANI; EMMERT; WOHLGEMUTH, 2008) como por exemplo a nonactina, monactina, dinactina, trinactina, valinomicina e actinomicina. Foram selecionados 2 extratos brutos (AMC e Caat) que apresentaram maior produção de metabólitos ativos com atividade antibiótica e alguns com capacidade de transportar cátions, de forma semelhante aos ionóforos. O extrato AMC apresentou maiores espectros de dinactina e valinomicina, enquanto o extrato Caat apresentou maior atividade do antibiótico actinomicina. Entretanto, ambos os extratos foram identificados por sua capacidade de transportar cátions, de forma similar à da monensina sódica.

3.2.2 Coleta de líquido ruminal para fermentação e preparo do meio de cultura

Três vacas da raça Holandesa, multíparas em terço médio de lactação, com 542 ± 32,25 kg de peso corporal e portadoras de fístula ruminal foram utilizadas como doadoras de líquido e massa ruminal (inóculo). As vacas foram alojadas em baias individuais com controle individual de consumo de alimento e submetidas a duas ordenhas diárias. A dieta das vacas foi fornecida em duas refeições (manhã e tarde), formuladas de forma a atenderem as exigências nutricionais de vacas em lactação com aproximadamente 600 kg de peso corporal, com produção diária de leite de 32,0 kg e com 3,5% de gordura, conforme recomendações do NRC (2001); à base de silagem de milho como volumoso, farelo de soja, ureia, milho moído e suplemento mineral, em relação 60:40 na dieta total (Figura 3).

Figura 3 - Vacas utilizadas para coleta de líquido ruminal

Fonte: Alves (2015)

Foi feita a análise bromatológica da dieta para determinação da proteína bruta (PB; N × 6,25; método 990.03; AOAC, 2000); extrato etéreo (EE; método 920.39; AOAC, 2000), fibra em detergente neutro (FDN), utilizando α-amilase sem adição de sulfito de sódio ao detergente; fibra em detergente ácido (FDA), de acordo com Mertens (2002) e lignina em detergente ácido (LDA) conforme Van Soest; Robertson; Lewis (1991). Os carboidratos não fibrosos foram calculados conforme metodologia de Mertens (1997), conforme metodologia descrita no NRC, (2001). A partir desta dieta foi estabelecido o substrato para a fermentação *in vitro* (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição química do substrato utilizado na fermentação *in vitro* sob inóculo de vacas em lactação

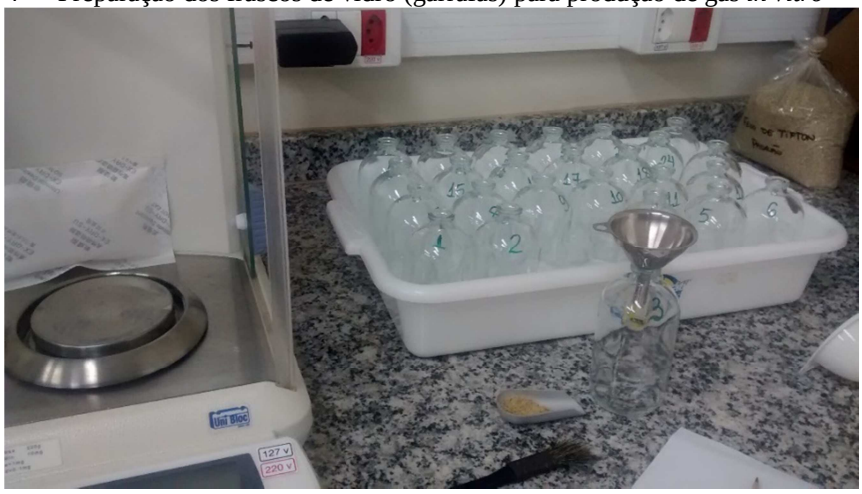
Composição química	*(g/ Kg MS)*
Proteína Bruta	92,09
Extrato Etéreo	30,87
FDN[1]	288,29
FDA[2]	169,01
Lignina	33,15
CNF[3]	561,23

[1]FDN – Fibra em Detergente Neutro; [2]FDA – Fibra em Detergente Ácido; [3]CNF – Carboidratos Digestíveis Totais

Para a realização do ensaio *in vitro*, foram utilizadas garrafas de vidro para a incubação das amostras e inóculo. Cada vaca doadora de líquido ruminal foi considerada uma repetição, e todos os tratamentos (extratos e doses) e as garrafas de controles negativos ‘brancos’ foram feitos em triplicata. Foram utilizadas 102 garrafas (3 repetições × 34 garrafas

por repetição) com capacidade de 160 mL, que foram previamente lavadas, secas e identificadas. Cada repetição foi constituída por 24 garrafas dos tratamentos (4 doses × 2 extratos × triplicata) e 10 garrafas ‘brancos’. As garrafas ‘brancos’ não receberam o substrato (dieta), entretanto, foram utilizadas para correção das produções de gases oriundas da fermentação do inóculo em resposta à dieta ofertada diretamente às vacas doadoras, além da influência dos extratos sobre o inóculo separadamente (inóculo + extratos) (Figura 4).

Figura 4 - Preparação dos frascos de vidro (garrafas) para produção de gás *in vitro*



Fonte: Alves (2015).

Foram avaliados dois extratos brutos (AMC e Caat) em concentração de 10 mg por mL, diluídos em dimetil-sulfóxido (DMSO) e organizados em quatro doses: 0,30, 0,60, 0,90 e 1,20 mg. Assim, nas garrafas foram adicionados: 1 g de substrato moído a 1 mm, 90 mL de solução tampão, 10mL de inóculo e as diferentes doses dos extratos. A solução tampão utilizada segundo metodologia de Theodorou et al. (1994) foi composta por soluções de macrominerais, microminerais, tampão e resazurina (Tabela 2).

Tabela 2 - Composição das soluções utilizadas para o preparo do tampão do meio de cultura final

Soluções	Reagentes	Unidade	Quantidade
Tampão	NH_4HCO_3	g/L	4,00
	$NaHCO_3$	g/L	35,00
Macrominerais	Na_2HPO_4	g/L	3,75
	KH_2PO_4	g/L	3,32
	$MgSO_4.7H_2O$	g/L	0,60
Microminerais	$CaCl_2.2H_2O$	g/L	132,00
	$MnCl_2.4H_2O$	g/L	100,00
	$CoCl_2.6H_2O$	g/L	10,00
	$FeCl_3.6H_2O$	g/L	80,00
Meio B	Cisteína HCl	un/100mL	625,00
	Água Destilada	un/100mL	95,00
	NAOH 1M	un/100mL	4,00
	Na_2SO_3	un/100mL	328,13
Rezasurina	Rezasurim	g/L	0,10

Fonte: Lana/Cena (2012)

Na composição do inóculo, a fase líquida e a fase sólida do conteúdo ruminal das vacas foram coletadas separadamente por meio de bomba de vácuo e kitassato; e imediatamente acondicionadas em garrafas e caixas térmicas livres de oxigênio até a realização das análises. Foram utilizados volumes iguais das duas fases do conteúdo ruminal, os quais foram agitados em liquidificador durante 10 segundos para recuperação dos microrganismos celulolíticos aderidos à fração sólida. Após a agitação, o material resultante foi filtrado em duas camadas de tecido de algodão (fraldas) e mantido a 39 ° C até ao final do preparo do inóculo e submetidos à análise de pH por um potenciômetro. A inoculação (adição do inóculo às garrafas) foi realizada por meio de seringa de plástico graduada de 10 mL e as garrafas foram posteriormente seladas com rolhas de borracha, agitadas e, em seguida, incubadas em estufa de circulação forçada de ar a 39°C (tempo zero de fermentação) (Figura 5).

Figura 5 - Preparação das garrafas com os inóculos filtrados

Fonte: Alves (2015)

3.2.3 Fermentação ruminal in vitro

3.2.3.1 Produção de gases

As leituras de pressão dos gases acumulados em cada garrafa de fermentação foram feitas utilizando um transdutor de pressão e um “data logger” (PDL800, LANA/CENA/USP,

Piracicaba/SP, Brasil), nos tempos 4, 8, 12, 18, 24, 27, 30, 36, 48, 60 e 72 horas após a inoculação (Figura 6). Após cada leitura, o restante dos gases foi liberado até que a pressão lida pelo transdutor fosse zero e rapidamente, as garrafas foram agitadas e colocadas em estufa novamente. Esse procedimento foi adotado para evitar acúmulo de pressão excessiva no interior das garrafas, porque, de acordo Abdalla et al. (2012), pode ocorrer inibição da fermentação por microrganismos do rúmen quando a pressão no interior ultrapassa 7 psi.

O volume de gás foi estimado de acordo com Mauricio et al. (1999) e para descrever a dinâmica da produção de gás ao longo do tempo, foi aplicado o seguinte modelo exponencial proposto pela France et al. (1993):

$$Vt = A \{1 - \exp [- b(t - L) - c \times (\sqrt{t} - \sqrt{L})]\}$$

onde: Vt representa o volume final do gás acumulado no tempo t (mL), A é a produção assintótica de gás (ml), L é o tempo de colonização (fase lag) e b (h^{-1}) e c ($h^{-1/2}$) = taxas fracionais constantes.

Figura 6 - Sequência de avaliação da pressão de gás

Fonte: Alves (2015)

Legenda: I. Aparelho de avaliação da pressão DATALOGGER.
II. Mensuração de pressão avaliada durante 72 horas.

3.2.3.2 Produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

As concentrações de AGCC no fluido ruminal foram medidas por cromatografia gasosa (GC-2014, Shimadzu, Japão) utilizando coluna capilar (Stabilwax ®, Restek, EUA) a 145 ° C (isotérmico) e um injetor *splitless* e detector dual FID a 250 ° C utilizando o método descrito por Erwin; Marco e Emery (1961), adaptado por Getachew et al. (2004). As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e centrifugadas a 14500 × g durante 10 min. O sobrenadante (800 µL) foi transferido para um frasco limpo e seco com 200 µL de ácido fórmico a 98-100% PA ACS e 100 µL de padrão interno (ácido 2-etil-butírico 100 µM, Chemservice, EUA). O padrão externo foi preparado com os ácidos acético, propiônico, isobutírico, butírico, valérico e isovalérico (Service Chem, EUA). O software GCSolution® (Shimadzu, Japão) foi utilizado para os cálculos das concentrações de AGCC.

3.2.3.3 Digestibilidade da MS e MO

Os coeficientes de DIVMS e DIVMO foram determinados de acordo com Menke et al. (1979). O resíduo da fermentação após 72 horas foi obtido por filtração das garrafas em cadinhos de vidro com placa porosa com peso vazio conhecido (Figura 7). Os resíduos foram secos a 105°C durante 24 horas e pesados para que fossem calculados os coeficientes de DIVMS com base na diferença do cadinho vazio. A DIVMO foi estimada pela diferença dos resíduos de cinzas obtidos em mufla (400°C).

Figura 7 - Filtragem das garrafas nos cadinhos para mensuração da DIVMS e DIVMO

Fonte: Alves (2015)

3.2.4 Análises Estatísticas

Os resultados foram analisados pelo programa computacional Statistical Analysis System ® (SAS, 2001) como delineamento experimental inteiramente casualizado. Inicialmente, foram verificadas a normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias pelo PROC UNIVARIATE. Os graus de liberdade foram calculados de acordo com o método Satterthwaite (DDFM = Satterth). As variáveis resposta da fermentação ruminal *in vitro* foram avaliadas pelo procedimento MIXED do SAS; sendo que foram avaliados como efeitos fixos a inclusão dos extratos e as doses, enquanto os animais (repetições) foram adotados como efeito aleatório. Os tratamentos foram organizados em arranjo fatorial 4 × 2 (dois extratos e 4 doses) totalizando 8 tratamentos e o modelo avaliou os efeitos principais dos extratos, das doses e suas interações. A estrutura de erro escolhida para cada variável foi feita de acordo com o critério de informação bayesiano (BIC). As variáveis AGCC, DIVMS e DIVMO foram analisadas de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ij} = \mu + E_i + D_j + Ei \times D_j + e_{ij},$$

onde Yij = é o valor observado ; μ = média geral; Ei = efeito fixo do extrato i; Dj = efeito fixo da dose j; Ei × Dj= efeito fixo da interação entre o extrato e dose; e eijk = erro aleatório associado a cada observação. As produções acumuladas de gases em 24, 48 e 72 horas foram analisadas como medidas repetidas no tempo e a estrutura de erro também escolhida de acordo com o critério de informação bayesiano (BIC) para avaliação de cada variável, segundo o modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + E_i + D_j + Ei \times D_j + T_k + T_k \times E_i + T_k \times D_j + T_k \times D_j \times E_i + e_{ijk},$$

onde Yijk = é o valor observado ; μ = média geral; Ei = efeito fixo do extrato i; Dj = efeito fixo da dose j; Ei*Dj= efeito fixo da interação entre o extrato e dose; Tk = efeito fixo de tempo k; Tk*Ei = efeito fixo da interação entre tempo e extrato; Tk*Dj = efeito fixo da interação entre tempo e dose; Tk*Dj*Ei = efeito fixo da interação tempo, dose e extrato; eijk = erro aleatório associado a cada observação. As médias ajustadas foram calculadas e comparadas pela opção DIFF do ‘statement’ LSMEANS. O efeito de dose de cada extrato foi decomposto em três contrastes ortogonais polinomiais (linear, quadrático e cúbico). Os interceptos e os coeficientes angulares foram obtidos utilizando a opção “estimate” do

procedimento MIXED. Para todas as análises estatísticas foi utilizada o nível de significância de P⩽0.05 e tendência de P⩽0.10.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Produção de Gases

A produção cumulativa de gases em 24, 48 e 72 horas de incubação, bem como o potencial de produção de gases (assíndota A), foram reduzidos com a inclusão do extrato Caat, quando comparado ao AMC. Houve aumento de 13% nos valores de A quando houve a inclusão de AMC, enquanto que as produções acumuladas de gás para 24, 48 e 72 horas foram 28%, 14% e 15,4% menores com a inclusão de Caat, respectivamente (Tabela 3).

A cinética de produção total de gás *in vitro* de ambos os extratos de acordo com as quatro doses e ao longo dos 11 tempos de observação sofreu efeito isolado de extrato e dose, ou seja, redução da produção de gases totais acumulados com a adição do Caat quando comparados com a inclusão do extrato AMC (P = <.0001); sendo que essa redução também foi explicada pelo efeito isolado de dose incluída (P = 0.021). Entretanto, não foram observados efeitos de interação do extrato com a dose, ou ainda dessas variáveis com o tempo (Figura 8).

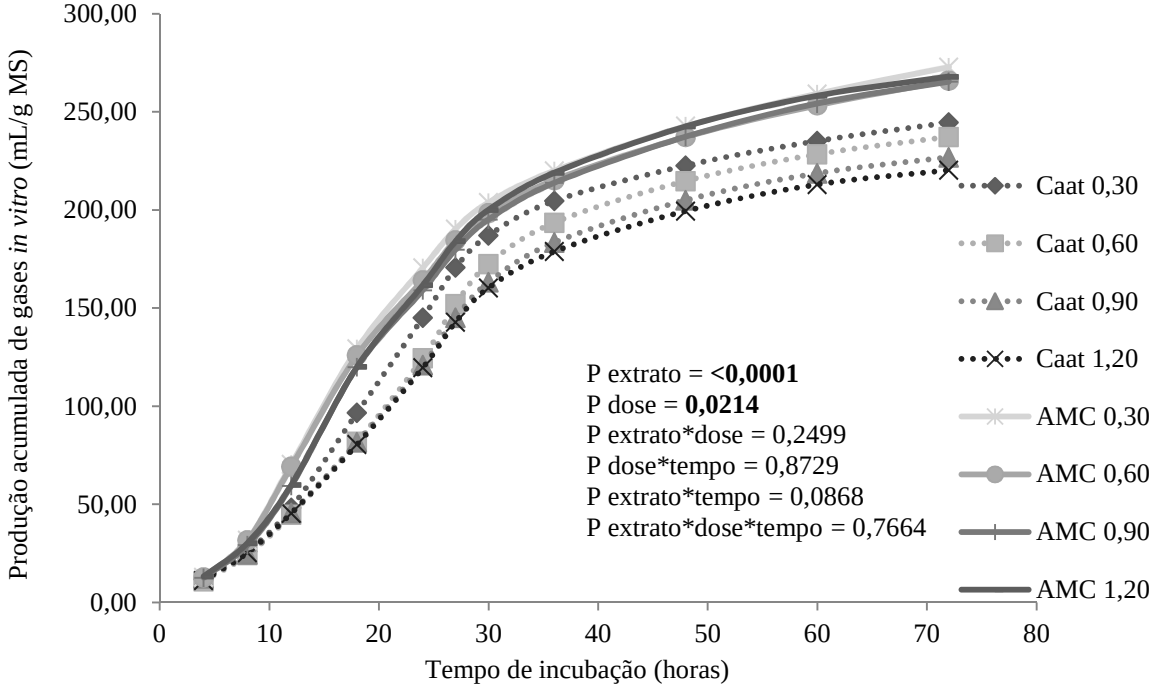
Tabela 3 - Produção cumulativa de gás (ml / g), potencial de produção de gás (assintótica A, ml / g de MS) e tempo de colonização (L, horas) de extratos brutos (Caat e AMC) derivados de actinobacterias em fermentação *in vitro* sob inóculo de vacas leiteiras

	Extratos Brutos										**EPM**	**P-Valor**		
	Caat (mg)					**AMC (mg)**						**Extrato**	**Dose**	**Int.**
	0,30	**0,60**	**0,90**	**1,20**	**Média**	**0,30**	**0,60**	**0,90**	**1,20**	**Média**				
A (ml/g)	242,93	239,10	228,77	222,53	233,33[b]	264,07	260,20	261,77	268,63	263,67[a]	6,12	**<0,0001**	0,566	0,223
L (horas)	5,56	6,11	7,08	5,51	6,06	9,65	2,74	3,57	3,59	4,89	1,05	0,625	0,715	0,603
Horas	**Produção de Gás Acumulada (ml / g)**													
24	145,12	124,46	121,01	119,62	127,55[b]	170,47	164,22	159,16	161,73	163,90[a]	6,43	**<0,0001**	0,095	0,669
48	222,63	214,80	204,99	199,48	210,47[b]	242,73	237,28	237,36	242,61	239,99[a]	5,86	**<0,0001**	0,078	0,094

72	244,55	237,32	226,89	220,29	232,26[b]	272,84	265,93	265,41	267,97	268,03[a]	6,27	**<0,0001**	0,090	0,306

Legenda: A: produção potencial de gases; L: tempo de colonização; EPM: erro-padrão da média; Int.: interação extrato-dose
*média seguidas por letras diferentes, nas linhas, diferem entre si (P < 0,05).

Figura 8 - Produção acumulada de gases *in vitro* de acordo com a inclusão de dois extratos brutos (AMC e Caat) em quatro doses (0,30, 0,60, 0,90 e 1,20 mg) sobre substrato e inóculo ruminal de vacas leiteiras



Fonte: Alves (2015)

De acordo com a análise de regressão da produção de gases, a assíndota A reduziu linearmente de acordo com a inclusão de extrato Caat em 0.23 vezes [Y = 251.22 - 0.2384 × Caat (mg)] (P = 0.040). Foi observado que para cada unidade do extrato Caat incluída houve redução da produção cumulativa de gás em 1.06, 0.36 e 0.30 vezes para 24 (P = 0.0296), 48 (P = 0.0003) e 72 horas (P = 0.008), respectivamente. De forma semelhante, com a inclusão de extrato de AMC a produção acumulada de gás em 24 horas de fermentação foi reduzida linearmente em 0.47 vezes [Y = 182.74 - 0.4718 × AMC (mg)] (P = 0.010) (Figuras 9 e 10).

Figura 9 - Potencial da produção *in vitro* de gás (A, ml/g MS) e tempo de colonização (L, horas) de substrato adicionado de dois extratos brutos (Caat e AMC) em quatro doses (0,30, 0,60, 0,90 e 1,20 mg) produzidos por actinobacterias em inóculo ruminal de vacas leiteiras

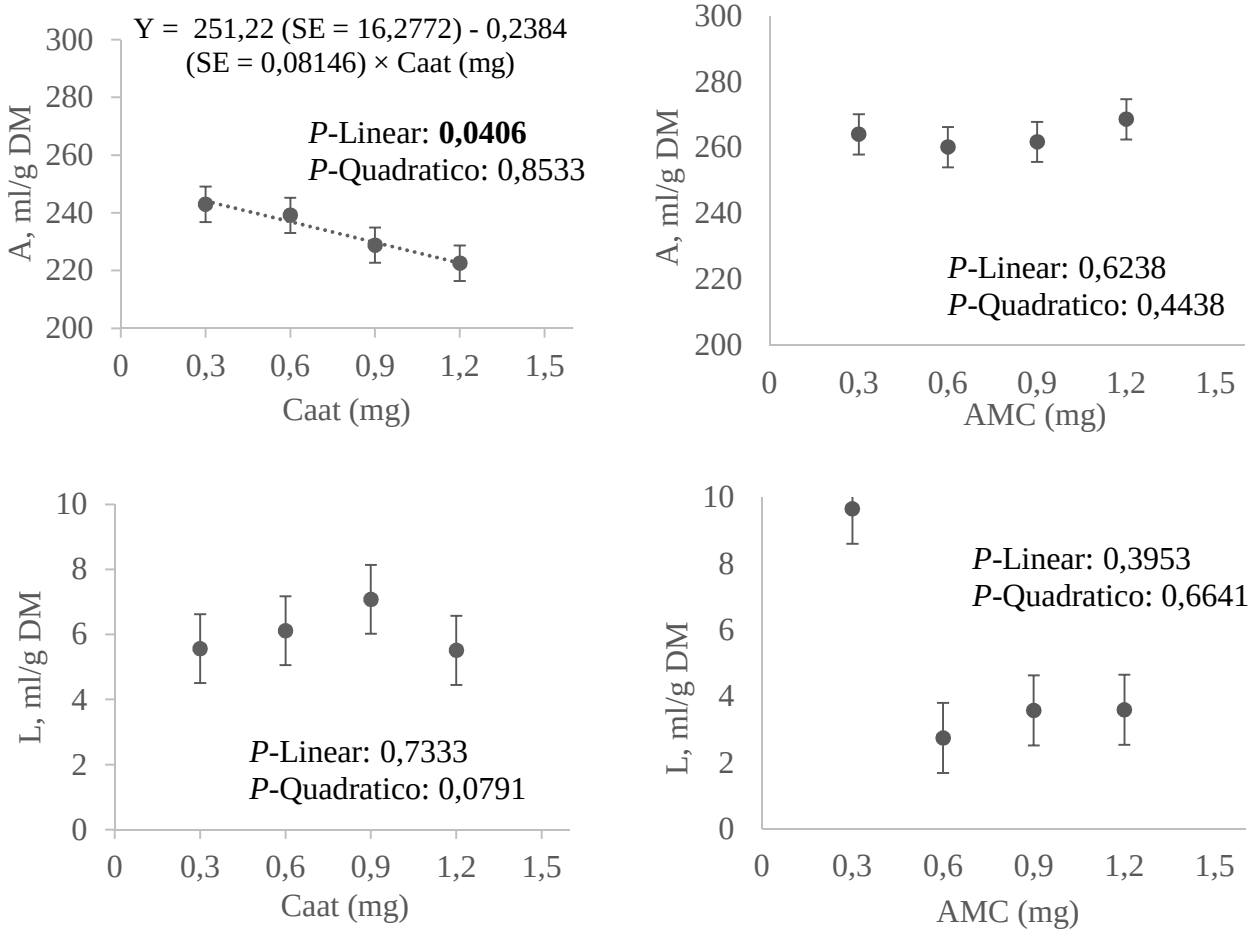
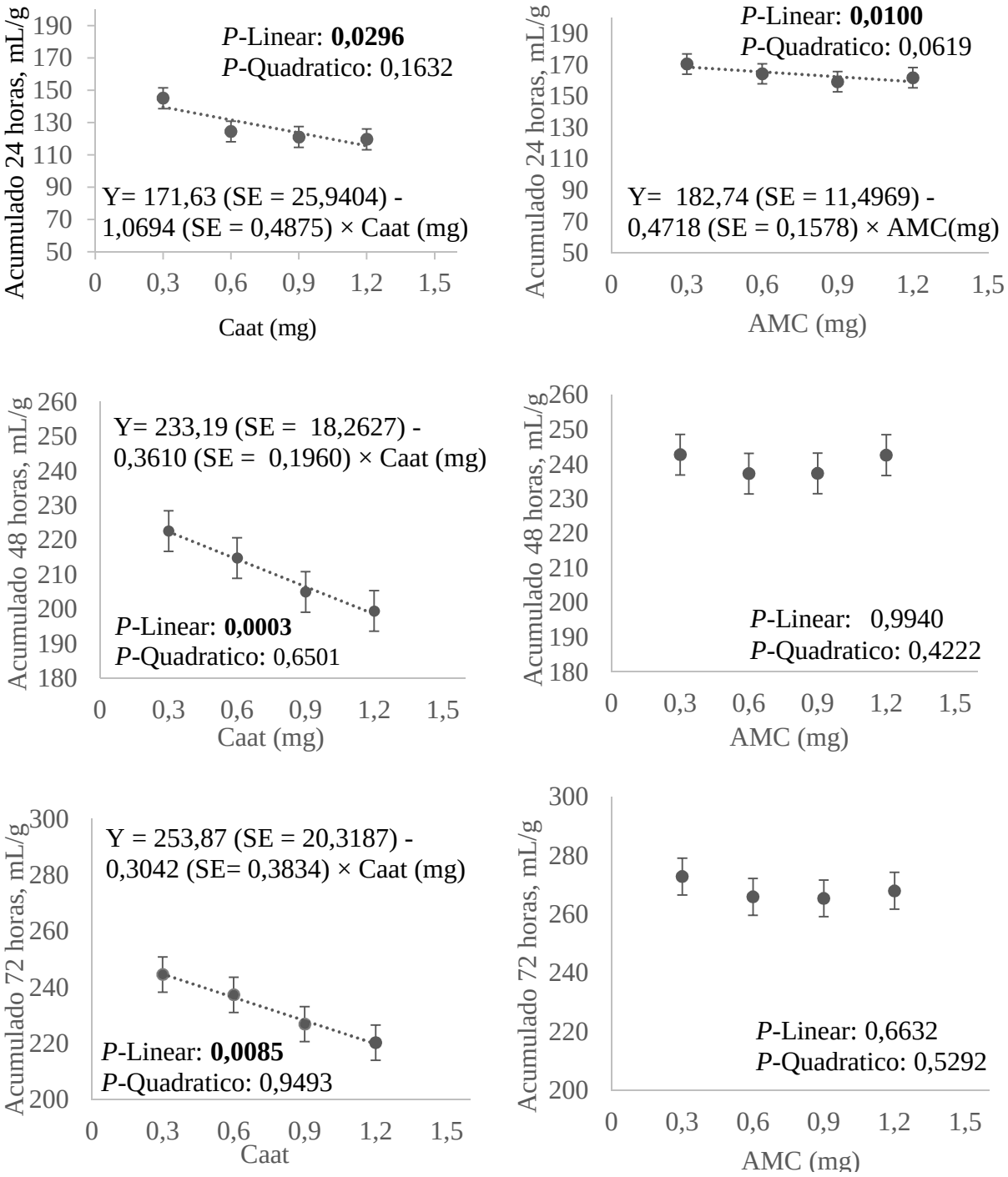


Figura 10 - Produção acumulada de gás (24, 48 e 72 horas) de substrato com dois extratos brutos (Caat e AMC) em quatro doses (0,30, 0,60, 0,90 e 1,20 mg) produzidos por actinobacterias em inóculo ruminal de vacas leiteiras



3.3.2 Digestibilidade in vitro da matéria seca e matéria orgânica

Não houve efeito isolado de ambos extratos, dose e da interação sobre a DIVMS. Entretanto, para a DIVMO foi observado houve efeito isolado de dose (P = 0.005) após os 11 tempos de observação (4, 8, 12, 18, 24, 27, 30, 36, 48, 60 e 72) mediante inclusão do extrato Caat (Tabela 4).

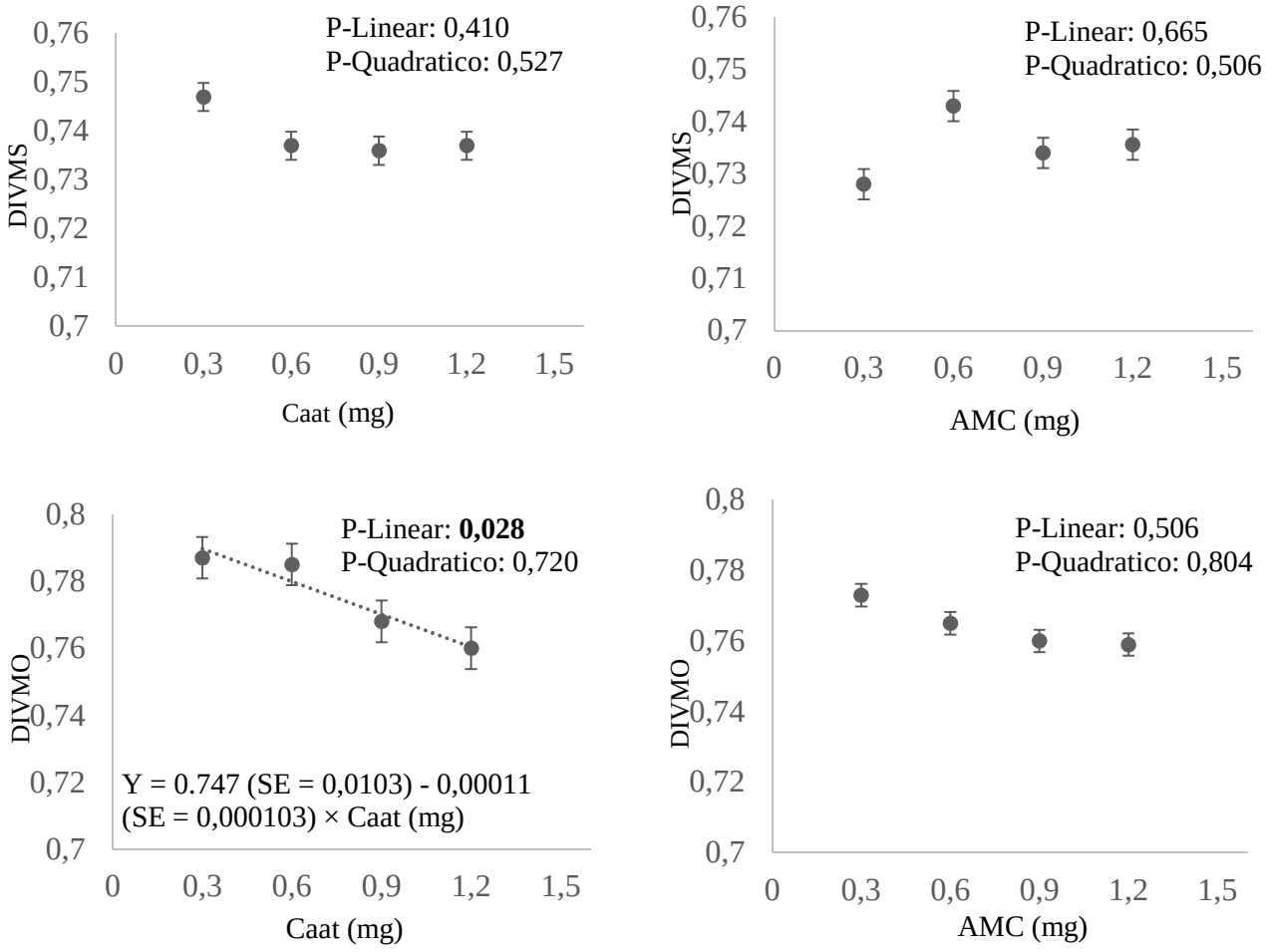
Tabela 4 - Efeito de dois extratos brutos (Caat e AMC) e quatro doses (0,30, 0,60, 0,90 e 1,20 mg) produzidos por actinobactérias sobre a DIVMS e DIVMO de inóculo ruminal de vacas leiteiras

Variáveis	**Extratos Brutos**								**Média Geral**	**EPM**	**Probabilidade**		
	Caat				**AMC**								
	0,30	**0,60**	**0,90**	**0,120**	**0,30**	**0,60**	**0,90**	**0,120**			**Extrato**	**Dose**	**Inter.**
DIVMS	0,737	0,737	0,744	0,736	0,728	0,741	0,739	0,735	0,737	0,0021	0,4884	0,3789	0,6468
DIVMO	0,786	0,784	0,769	0,759	0,773	0,783	0,760	0,759	0,771	0,0041	0,2597	**0,0051**	0,8077

[1] DIVMS - Digestibilidade da Matéria Seca; [2]DIVMO - Digestibilidade da matéria orgânica; [3] EPM - erro padrão da média.

De acordo com a análise de regressão da DIVMO, foi observado após 72 horas de incubação, que para cada unidade de aumento na inclusão do extrato Caat, a DIVMO reduziu linearmente em 0.00011 vezes [Y = 0,747 – 0,00011 × Caat (mg)] (P = 0,028); ao passo que a DIVMO diminuiu com o aumento proporcional da inclusão de Caat, embora a inclusão do AMC não alterou os valores de DIVMS e DIVMO (Figura 11).

Figura 11 - Digestibilidade *in vitro* da matéria seca e matéria orgânica de substrato adicionado de dois extratos brutos (Caat e AMC) em quatro doses (0,30, 0,60, 0,90 e 1,20 mg) derivados de actinobactérias em inóculo ruminal de vacas leiteiras



3.3.3 Produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

A inclusão do extrato Caat aumentou a concentração de ácido propiônico em 28% (em mM) e 27% (% do total de ácidos produzidos) em comparação com a inclusão do AMC. Adicionalmente, a inclusão do Caat reduziu a concentração em % de ácido isobutírico (0.96%) em comparação com a inclusão de AMC (1.11%). Além disso a inclusão do extrato Caat diminuiu em 59% e 11% as concentrações em mM de ácido butírico e isovalérico, respectivamente; e redução da relação acetato:propionato em 22% em relação à inclusão do AMC (Tabela 5).

De acordo com a análise de regressão, a inclusão de Caat reduziu linearmente a concentração de ácido isobutírico de acordo com a dose, sendo que as menores concentrações foram observadas na dose de maior inclusão do Caat. Esse mesmo efeito do tratamento Caat foi observado sobre as concentrações em mM e % de ácido butírico, sendo que para cada unidade incluída do extrato Caat houve diminuição de 0.03 e 0.04 vezes, respectivamente [$Y = 12.3992 - 0.03859 \times$ Caat (mg); $Y = 15.3844 - 0.04110 \times$ Caat (mg)]. Além disso a inclusão de Caat também diminuiu linearmente ($P = 0.0374$) a concentração (%) de ácido isovalérico de acordo com o aumento da dose incluída.

Tabela 5 - Efeito da inclusão de dois extratos brutos (Caat e AMC) em quatro doses (0,30, 0,60, 0,90 e 1,20 mg) derivados de actinobactérias sobre a concentração (mM e %) *in vitro* de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) sob inóculo ruminal de vacas leiteiras

	Extratos Brutos										**EPM**	**P-Valor**						
	Caat (mg)				**Média**	**AMC (mg)**				**Média**		**Extrato**	**Dose**	**Ext*Dose**	**Caat**		**AMC**	
AGCC	**0,30**	**0,60**	**0,90**	**1,20**		**0,30**	**0,60**	**0,90**	**1,20**						**L**	**Q**	**L**	**Q**
						mM												
Acético	35,18	33,91	34,57	34,21	34,47	34,02	35,40	32,65	35,02	34,27	0,67	0,855	0,872	0,633	0,809	0,783	0,850	0,700
Propiônico	28,25	27,34	28,16	28,93	28,17[a]	22,33	23,16	20,81	21,29	21,90[b]	0,96	**<,0001**	0,950	0,681	0,563	0,482	0,476	0,929
Iso Butírico	0,90	0,75	0,67	0,62	0,74	0,96	0,79	0,73	0,89	0,85	0,07	*0,0716*	*0,0530*	0,401	**0,0057**[1]	0,381	0,557	0,154
Butírico	11,60	9,71	8,62	8,10	9,51[b]	15,61	15,06	14,83	15,32	15,20[a]	1,03	**<,0001**	*0,0542*	0,176	**0,0021**[2]	0,216	0,740	0,501
IsoValérico	1,25	1,11	1,09	1,04	1,12[b]	1,23	1,27	1,21	1,30	1,25[a]	0,10	**0,0078**	0,485	0,162	*0,0833*	0,552	0,642	0,676
Valérico	1,47	1,41	1,33	1,29	1,38	1,44	1,52	1,47	1,52	1,49	0,07	0,301	0,953	0,832	0,220	0,920	0,619	0,809
Relação A/P	1,29	1,26	1,23	1,20	1,24[b]	1,60	1,61	1,59	1,65	1,61[a]	0,07	**0,0001**	0,991	0,921	0,297	0,989	0,748	0,783
						%												
Acético	44,66	45,69	46,41	46,24	45,75	44,95	45,81	45,52	46,54	45,71	0,40	0,961	0,655	0,959	0,130	0,425	0,117	0,881
Propiônico	36,51	37,11	38,32	39,02	37,74[a]	29,80	30,18	29,41	28,58	29,49[b]	1,50	**<,0001**	0,946	0,462	*0,080*	0,960	0,512	0,694
Iso Butírico	1,12	1,00	0,87	0,83	0,96[b]	1,27	1,02	0,98	1,17	1,11[a]	0,08	**0,0471**	*0,0888*	0,468	**0,0018**[3]	0,399	0,586	0,165
Butírico	14,35	12,84	11,24	10,77	12,30[b]	20,47	19,38	20,41	20,02	20,07[a]	1,23	**<,0001**	*0,1005*	0,119	**<,0001**[4]	*0,0798*	0,970	0,723
IsoValérico	1,54	1,47	1,41	1,39	1,45[b]	1,61	1,63	1,64	1,67	1,64[a]	0,11	**<,0001**	0,722	0,123	**0,0374**[5]	0,594	0,204	0,999
Valérico	1,83	1,88	1,74	1,74	1,80	1,89	1,97	2,04	2,02	1,98	0,08	0,193	0,990	0,887	0,380	0,826	0,316	0,595

[1] Y = 0,9737 (SE = 0,2365) -0,00309 (SE = 0,000675) x Caat (mg)
[2] Y = 12,3992 (SE = 2,7313) - 0,03859 (SE = 0,007322) x Caat (mg)
[3] Y = 1,2060 (SE = 0,2789) - 0,00332 (SE = 0,000588) X Caat (mg)
[4] Y = 15,3844 (SE = 3,1487) - 0,04110 (SE = 0,004418) x Caat (mg)
[5] Y = 1,5783 (SE = 0,3827) - 0,00166 (SE = 0,000555) x Caat (mg)

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa das médias de produção de AGCC por extrato bruto

3.4 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo indicam que o extrato bruto Caat derivado de actinobactérias foi capaz de modular a fermentação ruminal *in vitro*, pois houve diminuição da produção acumulada de gases e da digestibilidade da matéria orgânica e alteração da concentração de AGGC's produzidos.

Com a inclusão do extrato Caat, foi observado aumento na concentração do ácido propiônico; principal precursor da via gliconeogênica e responsável pela maior rota de síntese de glicose dos ruminantes. Duffield et al. (2008), em meta-análise sobre os efeitos da administração da monensina sódica para ruminantes; observaram efeito semelhante da inclusão de monensina sobre as concentrações de propionato, pois animais suplementados apresentaram maior fluxo hepático da produção de glicose (gliconeogênese). Adicionalmente, a inclusão do Caat reduziu a concentração dos ácidos isobutírico, butírico e isovalérico, sugerindo que o metabólito actinomicina possa ter selecionado bactérias Gram-positivas (produtoras destes ácidos) em detrimento das Gram-negativas produtoras de propionato, semelhante ao modo de ação da monensina (RUSSELL, 1987).

O presente estudo também observou que a inclusão do extrato Caat alterou a relação acetato:propionato (A:P), de forma que a relação foi cerca de 30% menor (1,24) quando comparada à da inclusão do extrato AMC (1,61). Em ensaio *in vitro* de 24 h, Castro-Montoya et al. (2012) analisaram a incubação de 5 e 8 µM de monensina sobre substrato com 70% de volumoso e descreveram diminuição da relação A:P. Essa diminuição também foi observada em estudo *in vivo* com a administração de 33 mg/kg de monensina para novilhos da raça Holandesa (KHORRAMI et al., 2015). Em contrapartida, em outro estudo *in vivo*, 350 mg/kg de monensina foi oferecida a 4 vacas em lactação e a relação A:P não foi afetada (BENCHAAR et al., 2006). Essa diferença de efeitos sobre a relação A:P *in vivo* é atribuída às possíveis interações da monensina com as dietas oferecidas ou diferenças quanto a categoria de animais em estudo (BENCHAAR et al., 2006).

Schelling (1984) relatam mudanças na fermentação ruminal diante da suplementação com monensina *in vivo*, seja sobre a mudança da produção de AGCC, consumo ou produção de gás. Para a produção cumulativa de gases do presente estudo, verificou-se que os valores assíndota A, bem como a produção de gases acumulada para 24, 48 e 72 horas reduziram linearmente mediante o aumento da dose do extrato Caat. Sugere-se que essa menor produção de gases, observados com a adição do Caat possa ser explicada pela ação do composto sobre

as bactérias ruminais, selecionando as menos produtoras de gases metano e CO_2 (NAGARAJA et al., 1997).

Semelhante ao encontrado no presente estudo, Faria et al. (2008) observaram redução da produção acumulada de gases das 12 às 96 horas e do tempo de colonização (L) (1,08 horas) em ensaio *in vitro* com a adição de propilenoglicol e monensina. Foi utilizada a silagem de milho como substrato e a produção de gases avaliada com duas, quatro, seis, 12, 24, 48 e 96 horas.

Para a DIVMS e DIVMO, foi observado menores coeficientes de DIVMO com a inclusão de extrato bruto Caat quando comparadas a inclusão do AMC. Lemenager et al. (1978) realizaram ensaio *in vitro* com inóculo de animais previamente adaptados ou não à monensina, e observaram redução da digestibilidade, no caso da MS, nos animais não adaptados. Ao contrário do que ocorre *in vivo*, os sistemas de produção de gás *in vitro* segundo Nisa et al. (1999) podem permitir uma acumulação excessiva dos produtos finais da fermentação, o que pode interferir na atividade microbiana e até inibi-la, resultando menor DIVMS.

Russell e Strobel (1988) incubaram uma mistura de bactérias ruminais em ensaio de 24 horas e observaram que com a adição de monensina houve diminuição da digestão da celulose pelos microrganismos ruminais, provavelmente explicada pela seleção das bactérias Gram-positivas no rúmen; o que pode ter ocorrido no ensaio *in vitro* do presente estudo, diminuindo a digestibilidade da matéria orgânica.

O presente estudo utilizou extratos brutos, que constituem em mistura com mais de um metabólito ativo. No caso do extrato AMC foi caracterizada ação de principalmente dois metabólitos, a dinactina e a valinomicina, enquanto o Caat apresentou maior atividade do composto actinomicina. Sugere-se para estudos futuros que os metabólitos ativos presentes nos extratos utilizados no presente estudo sejam isolados de modo que um novo teste *in vitro* com base na dose do princípio ativo seja possível de ser realizado.

3.5 CONCLUSÃO

O extrato Caat foi capaz de alterar a fermentação ruminal *in vitro*, pois aumenta a concentração de propionato, reduz a concentração de butirato, isobutirato e a relação acetato:propionato e reduz a produção cumulativa de gases por 24, 48 e 72 horas. Porém a

inclusão de Caat reduz a digestibilidade da matéria orgânica. De outra forma, o uso de AMC apenas reduz a produção cumulativa de gás por 24 horas de incubação. De acordo com os resultados obtidos a dose de melhor atividade foi de 1,20 mg.

REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official methods of analysis. 16.ed. Washington, D.C.: AOAC, 1995. p. 2000.

ABDALLA, A. L.; LOUVANDINI, H.; SALLAM, S. M. A. H.; BUENO, I. C. S.; TSAI, S. M.; FIGUEIRA, A. V. O. In vitro evaluation, in vivo quantification, and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. **Tropical animal health and production**, v. 44, n. 5, p. 953–64, jun. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22083272>. Acesso em: 18 dez. 2015.

BENCHAAR, C.; PETIT, H. V; BERTHIAUME, R.; WHYTE, T. D.; CHOUINARD, P. Y. Effects of addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk production, and milk composition in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 11, p. 4352–4364, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72482-1>. Acesso em: 12 mar. 2015.

CASTRO-MONTOYA, J. M.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Effects of monensin on the chemical composition of the liquid associated microbial fraction in an in vitro rumen fermentation system. **Livestock Science**, v. 150, n. 1-3, p. 414–418, dez. 2012. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187114131200385X>. Acesso em: 12 mar. 2015.

CREVELIN, E. J.; CROTTI, A. E. M.; ZUCCHI, T. D.; MELO, I. S.; MORAES, L. a. B. Dereplication of *Streptomyces* sp. AMC 23 polyether ionophore antibiotics by accurate-mass electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 49, n. 11, p. 1117–1126, 2014. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/jms.3432>. Acesso em: 12 mar. 2015.

DINIUS, D. A.; SIMPSON, M. E.; MARSH, P. B. Effect of Monensin Fed with Forage on Digestion and the Ruminal Ecosystem of Steers. **Journal of Animal Science**, v. 42, n. 1, p. 229–234, 1 jan. 1976. Disponível em: <https://dl.sciencesocieties.org/publications/jas/abstracts/42/1/JAN0420010229>. Acesso em: 15 jan. 2016.

DOMESCIK, E. J.; MARTIN, S. A. Effects of Laidlomycin Propionate and Monensin on the In Vitro Mixed Ruminal Microorganism Fermentation. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 8, p. 2305–2312, 1999.

DUFFIELD, T. F.; RABIEE, A. R.; LEAN, I. J. A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 1. Metabolic effects. **Journal of Dairy Sience**, v. 91, n. 4, p. 1334–46, abr. 2008. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203020871261X>. Acesso em: 12 mar. 2015.

FARIA, B. N.; REIS, R. B.; MAURÍCIO, R. M.; LANA, A. M. Q.; SOARES, S. R. V.; SATURNINO, H. M.; COELHO, S. G. Efeitos da adição de propilenoglicol ou monensina à silagem de milho sobre a cinética de degradação dos carboidratos e produção cumulativa de gases in vitro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 4, p. 896–903, ago. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-

09352008000400019&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 4 dez. 2015.

FRANCE, J.; DHANOA, M. S.; THEODOROU, M. K.; LISTER, S. J.; DAVIES, D. R.; ISAC, D. A Model to Interpret Gas Accumulation Profiles Associated with In Vitro Degradation of Ruminant Feeds. **Journal of Theoretical Biology**, v. 163, n. 1, p. 99–111, jul. 1993. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022519383711094>. Acesso em: 18 dez. 2015.

JANI, P.; EMMERT, J.; WOHLGEMUTH, R. Process analysis of macrotetrolide biosynthesis during fermentation by means of direct infusion LC-MS. **Biotechnology Journal**, v. 3, n. 2, p. 202–8, fev. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18064609>. Acesso em: 2 fev. 2016.

KHORRAMI, B.; VAKILI, A. R.; MESGARAN, M. D.; KLEVENHUSEN, F. Thyme and cinnamon essential oils: potential alternatives for monensin as a rumen modifier in beef production systems. **Animal Feed Science and Technology**, v. 200, p. 8–16, 2015. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0377840114003940>. Acesso em: 9 dez. 2015.

LEMENAGER, R. P.; OWENS, F. N.; SHOCKEY, B. J.; LUSBY, K. S.; TOTUSEK, R. Monensin Effects on Rumen Turnover Rate, Twenty-Four Hour VFA Pattern, Nitrogen Components and Cellulose Disappearance. **Journal of Animal Science**, v. 47, n. 1, p. 255–261, 1 jul. 1978. Disponível em: <https://dl.sciencesocieties.org/publications/jas/abstracts/47/1/JAN0470010255>. Acesso em: 9 dez. 2015.

MAURICIO, R. M.; MOULD, F. L.; DHANOA, M. S.; OWEN, E.; CHANNA, K. S.; THEODOROU, M. K. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 79, n. 4, p. 321–330, jun. 1999. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840199000334>. Acesso em: 27 ago. 2015.

MERTENS, D. R. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 7, p. 1463–81, jul. 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9241608>. Acesso em: 19 jan. 2016.

MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 6, p. 1217–40, jan. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12477183>. Acesso em: 23 fev. 2016.

NAGARAJA, T. G.; NEWBOLD, C. J.; VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I. Manipulation of ruminal fermentation. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Ed.). **The Rumen Microbial Ecosystem**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1997. p. 523–632.

NARVAEZ, N.; WANG, Y.; MCALLISTER, T. Effects of extracts of Humulus lupulus (hops) and Yucca schidigera applied alone or in combination with monensin on rumen fermentation and microbial populations in vitro. **Journal of the Science of Food and**

Agriculture, v. 93, n. 10, p. 2517–22, 15 ago. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23483574>. Acesso em: 15 jan. 2016.

NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J.; WALKER, N. D. The effect of tetronasin and monensin on fermentation, microbial numbers and the development of ionophore-resistant bacteria in the rumen. **The Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, n. 2, p. 129–34, ago. 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8407673>. Acesso em: 10 set. 2015.

NISA, M. U.; SARWAR, M.; BILAL, Q. Review: effect of ionophores on metabolic energetics in cattle. **International Journal Agricultural Biological**, v. 1, p. 66–69, 1999.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7th ed. Washington, DC: NRC, 2001.

RANGEL, A. H.; LEONEL, F. P.; SIMPLÍCIO, A. A.; MENDONÇA JUNIOR, A. F. Utilização de ionóforos na produção de ruminantes Ionophores in ruminant production. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 8, n. 2, p. 173–182, 2008.

RUSSELL, J. B. A proposed mechanism of monensin action in inhibiting ruminal bacterial growth: effects on ion flux and protonmotive force. **Journal of Animal Science**, v. 64, n. 5, p. 1519–25, maio 1987. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3583956>. Acesso em: 30 mar. 2015.

RUSSELL, J. B.; STROBEL, H. J. Effects of additives on in vitro ruminal fermentation: a comparison of monensin and bacitracin, another gram-positive antibiotic. **Journal of Animal Science**, v. 66, n. 2, p. 552–8, fev. 1988. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3372392>. Acesso em: 3 fev. 2016.

SCHELLING, G. T. Monensin mode of action in the rumen. **Journal of Animal Science**, v. 58, n. 6, p. 1518–27, jun. 1984. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6378867>. Acesso em: 14 set. 2015.

SMEDSGAARD, J. Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. **Journal of Chromatography. A**, v. 760, n. 2, p. 264–70, 31 jan. 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9062989>. Acesso em: 18 dez. 2015.

THEODOROU, M. K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M. S.; MCALLAN, A. B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 48, n. 3-4, p. 185–197, ago. 1994. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0377840194901716>. Acesso em: 10 set. 2015.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3583–97, out. 1991. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1660498>. Acesso em: 24 ago. 2014.

4 ATIVIDADE DE EXTRATOS BRUTOS DE ACTINOBACTÉRIAS SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL IN VITRO

RESUMO

Compostos bioativos presentes em extratos brutos produzidos por actinobactérias têm sido utilizados como agentes antibióticos e alguns apresentam atividade ionófora semelhante à monensina sódica. A hipótese deste estudo foi que esses extratos brutos de actinobactérias tem efeito similar ao da monensina na modulação da fermentação ruminal em dietas de ruminantes. Dessa forma, o objetivo foi avaliar *in vitro* o efeito de dois extratos brutos (AMC e Caat) sobre as variáveis: digestibilidade da matéria seca (DIVMS), digestibilidade da matéria orgânica (DIVMO), produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), gases totais, metano (CH_4) e nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_3$). O extrato AMC foi composto por dois ionóforos, dinactina e valinomicina e o extrato Caat composto por um antibiótico, a actinomicina. Amostras de fluido ruminal foram coletadas de três vacas em lactação da raça Holandesa, multíparas e portadoras de fístula ruminal. As vacas foram alimentadas com dietas à base de silagem de milho, farelo de soja, uréia, milho moído e suplemento mineral. Os tratamentos consistiram da inclusão de: a) controle - C; b) monensina – MON (5µM Bovensin® - Phibro); c) AMC (1,20 mg) e d) Caat (1,20 mg). A dieta foi seca, moída e incubada em garrafas juntamente com os tratamentos, inóculo (fluido ruminal) e solução tampão. O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado (DIC). Após 24 horas de incubação, os resíduos foram usados para estimar a DIVMS e a DIVMO. Não foram observados efeitos de tratamento sobre os parâmetros da equação de produção de gases (A, b, c e L). Houve efeito de tratamento sobre a produção de gases acumulada em 24 horas, sendo que a produção de gases da MON foi menor do que nos extratos AMC e Caat e entre estes, o Caat se destacou com a menor produção de gases em 24 horas. Observou-se que os tratamentos monensina e Caat aumentaram a concentração de propionato (mM e %), diminuiram a concentração de butirato e acetato produzidos; o que resultou em menor relação acetato:propionato. A concentração de $N\text{-}NH_3$ foi menor nos tratamentos Caat e monensina, enquanto a concentração de CH_4 produzida (mL) foi maior para ambos extratos quando comparados à monensina, entretanto não foi maior do que a concentração do tratamento controle. Com os resultados do presente estudo, pode-se concluir que o extrato Caat é capaz de modular a fermentação *in vitro* de forma semelhante à monensina sódica, mas não altera a digestibilidade da fibra.

ABSTRACT

Actinobacteria crude extracts activity on in vitro ruminal fermentation

Bioactive compounds in crude extracts produced by actinobacteria have been used as antibiotic agents and some have ionophore activity similar to monensin. Our hypothesis was that these crude extracts has a similar effect to monensin on ruminal fermentation in ruminant diets. Thus, the objective was to evaluate the in vitro effect of two crude extracts (AMC and Caat) on the variables: digestibility of dry matter (IVDDM), organic matter digestibility (IVDOM), short chain fatty acids production (SCFA), total gases, methane (CH_4) and ammonia nitrogen ($N\text{-}NH_3$). The AMC extract was composed of two ionophores, dynactin and valinomycin and Caat extract had mainly actinomycin antibiotic. Ruminal fluid samples were collected from three multiparous lactating Holstein cows with ruminal fistula. The cows were fed diets based on corn silage, soybean meal, urea, ground corn and mineral supplement. The treatments consisted of: a) control - C; b) monensin - MON (5µM Bovensin® - Phibro); c) AMC (1,20 mg) and d) Caat (1,20 mg). The diet was dried, ground and incubated in bottles with treatments, inoculum (ruminal fluid) and buffer solution. The experimental design was completely randomized (DIC). After 24 hours of incubation, the residues were used to estimate the IVDDM and IVDOM. There were no treatment effects on parameters of gas production equation (A, B, C and U). There was a treatment effect on the cumulative gas production in 24 hours, and the gas production of monensin was lower than in AMC and Caat treatments and among these, the Caat showed the lowest gas production in 24 hours. It was observed that monensin and Caat treatments increased propionate concentration, decreased the butyrate and acetate concentration; which resulted in a lower acetate:propionate ratio. The NH_3-N concentration was lower in Caat and monensin treatment, while the CH_4 concentration was higher in both extracts compared to monensin, however was not greater than the control. The results of this study, it can be conclude that the Caat extract is able to change the in vitro fermentation similarly to monensin, but does not affect the fiber digestibility.

4.1 INTRODUÇÃO

Aditivos alimentares da classe dos ionóforos são utilizados na nutrição de ruminantes com a finalidade da modulação da fermentação ruminal. O mecanismo de ação dos ionóforos ocorre pela seleção de microrganismos ruminais e inibição do crescimento de bactérias Gram-positivas. A atividade dos ionóforos sobre a membrana celular das bactérias permite selecionar aquelas produtoras de propionato, que favorecem o aumento do metabolismo de energia, em detrimento das produtoras de acetato, lactato e metano. Assim, os principais efeitos de administração dos ionóforos são o aumento da concentração de propionato e consequentemente da disponibilidade de glicose, diminuição da produção de metano (NARVAEZ; WANG; MCALLISTER, 2013), redução da degradação e desaminação da proteína dietética (DINIUS; SIMPSON; MARSH, 1976; NARVAEZ; WANG; MCALLISTER, 2013) e aumento da digestibilidade dos alimentos.

Atualmente, já foram descritos cerca de 120 ionóforos, entretanto a monensina sódica é um dos principais ionóforos usados na dieta de rebanhos leiteiros a fim de aumentar a produção de leite em consequência do aumento da eficiência da fermentação no rúmen. A monensina é produzida pelo microrganismo *Streptomyces cinnamonesis* e apresenta atividade na membrana celular dos microrganismos ruminais facilitando o movimento dos cátions através dessa membrana, com preferência de carreamento de sódio. Dessa maneira, as bactérias, principalmente as Gram positivas mais sensíveis, morrem por esgotamento energético na tentativa de restabelecer o gradiente de concentração do meio e acabam perdendo sua atividade ruminal.

Entretanto, mesmo com o elevado uso da monensina em rebanhos leiteiros e seus efeitos sobre o padrão de fermentação ruminal sejam bem conhecidos, alguns estudos têm buscado responder a falta de resultados mediante suplementação, seja por erro de dosagem, por tempo prolongado de uso ou por resistência das bactérias ao composto após um período. Foi sugerido que o uso contínuo de monensina pode aumentar a resistência dos microrganismos ruminais e então não causar os resultados esperados. Alguns estudos observaram que animais que foram suplementados previamente com ionóforo não apresentavam efeitos tão nítidos quando comparados a animais não adaptados (DOMESCIK; MARTIN, 1999b). Além disso, outros estudos ainda sugerem uma possível resistência cruzada entre ionóforos (NEWBOLD; WALLACE; WALKER, 1993) que pode ser explicada por um longo período de suplementação.

Diante disso, é necessário que novas alternativas de aditivos com eficiência similar à monensina sódica sejam desenvolvidos. Neste contexto, produtos naturais produzidos por actinobactérias têm sido avaliados como fontes de compostos anti-inflamatórios, antibióticos ou até com atividade semelhante aos ionóforos. Esses compostos bioativos são geralmente produzidos por biomas naturais, por actinobactérias, cianobactérias e fungos. Recentemente, isolados de actinobactérias foram colhidas de ambientes naturais como mangues e árvores, e a partir destes isolados foram obtidos extratos brutos, como o AMC (CREVELIN et al., 2014) e o Caat (comunicação pessoal)[2], capazes de produzir esses metabólitos ativos. Após isolamento, cultivo, micro-extração e cromatografia líquida (SMEDSGAARD, 1997), os metabólitos foram identificados quanto à classe pertencente e quanto à atividade biológica.

Assim, para avaliar novas alternativas de aditivos frente à monensina sódica, este estudo tem como objetivo avaliar, *in vitro*, dois extratos brutos (AMC e Caat) produzidos por actinobactérias sobre a fermentação ruminal, sobre os parâmetros de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e matéria orgânica (DIVMO), produção de gases totais, produção de gás metano (CH_4), produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e produção de nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_3$).

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Seleção de metabólitos e caracterização química

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (nº 2038140514). Os extratos brutos isolados de actinobactérias utilizados foram fornecidos pelo Laboratório de Espectometria de Massas Aplicada a Produtos Naturais (LEMAPN) do Departamento de Química/FFCLRP da Universidade de São Paulo. As actinobactérias produtoras desses extratos foram inicialmente isoladas pela Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna-SP) num estudo da biodiversidade microbiana do bioma caatinga e de solos de reflorestamento do estado de São Paulo. Nestes projetos foram caracterizados mais de 500

[2] Comunicação pessoal cedida pelo professor Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moares - LEMAPN

isolados de actinobactérias de 10 gêneros diferentes que foram submetidos a processos fermentativos em meios líquidos para obtenção de extratos brutos por meio da técnica de micro extração (SMEDSGAARD, 1997) e estes submetidos à cromatografia direta para identificação de possíveis metabólitos com atividade antibiótica ou ionófora.

Para obtenção do extrato bruto, os isolados de actinobactérias foram cultivados em placas de Petri com meio batata-dextrose-ágar (BDA) durante 10 dias a 27°C. Após este período, foram recortados 3 discos de aproximadamente 6 mm de diâmetro, e colocados em microtubo de polietileno contendo 1 mL da mistura metanol/clorofórmio 1:1. A amostra foi centrifugada e o sobrenadante transferido para outro microtubo; e então submetida a espectrometria de massas e ensaios de bioautografia direta (SMEDSGAARD, 1997). Os espectros de massa foram submetidos a um estudo comparativo no banco de dados Chemical Abstract (CAS) e Dictionary of Natural Products (DNP) e assim as massas moleculares dos compostos analisados foram correlacionadas com os compostos catalogados nestes bancos de dados, no caso do estudo as actinobactérias de diferentes gêneros.

De um total de 74 isolados de actinobactérias, foram selecionados 2 extratos brutos (AMC e Caat) que apresentaram maior produção de metabólitos ativos com atividade antibiótica e alguns com capacidade de transportar cátions, de forma semelhante aos ionóforos. Os principais compostos presentes no extrato bruto foram identificados como pertencentes à classe dos macrotetrolídeos isolados de actinobactérias (JANI; EMMERT; WOHLGEMUTH, 2008) como por exemplo a nonactina, monactina, dinactina, trinactina, valinomicina e actinomicina. O extrato AMC apresentou maiores espectros para dinactina e valinomicina, enquanto o extrato Caat apresentou maior atividade do antibiótico actinomicina. Entretanto, ambos os extratos foram identificados por sua capacidade de transportar cátions, assim como a monensina sódica.

4.2.2 Coleta de líquido ruminal para fermentação e preparo do meio de cultura

Três vacas da raça Holandesa, multíparas em terço médio de lactação, com 542 ± 32,25 kg de peso corporal e portadoras de fístula ruminal foram utilizadas como doadoras de líquido e massa ruminal (inóculo). As vacas foram alojadas em baias individuais com controle individual de consumo de alimento e submetidas a duas ordenhas diárias. A dieta das vacas

foi fornecida em duas refeições (manhã e tarde), formuladas de forma a atenderem as exigências nutricionais de vacas em lactação com aproximadamente 600 kg de peso corporal, com produção diária de leite de 32,0 kg e com 3,5% de gordura, conforme recomendações do NRC, (2001); à base de silagem de milho como volumoso, farelo de soja, ureia, milho moído e suplemento mineral, em relação 60:40 na dieta total.

Foi feita a análise bromatológica da dieta para determinação da proteína bruta (PB; N × 6,25; método 990.03; AOAC, 2000); extrato etéreo (EE; método 920.39; AOAC, 2000), fibra em detergente neutro (FDN), utilizando α-amilase sem adição de sulfito de sódio ao detergente; fibra em detergente ácido (FDA), de acordo com Mertens (2002) e lignina em detergente ácido (LDA) conforme Van Soest; Robertson e Lewis (1991). Os carboidratos não fibrosos foram calculados conforme metodologia de Mertens (1997), conforme metodologia descrita no NRC (2001).

Para a realização do ensaio *in vitro*, foram utilizadas garrafas de vidro para a incubação das amostras e inóculo. Foram avaliados dois extratos brutos (AMC e Caat) numa concentração de 10 mg por mL, diluídos em dimetil-sulfóxido (DMSO) e utilizados na dose de 1,20 mg. Os tratamentos foram: Controle (sem aditivo), Monensina (0,0017g Bovensin® 200 – Phibro), AMC e Caat, ambos na dose de 1,20 mg. Assim, nas garrafas foram adicionados: 0,5 g de substrato moído a 1 mm, 50 mL de solução tampão, 25 mL de inóculo, 1,20 mg dos extratos e 0,0017g de monensina. A solução tampão utilizada segundo metodologia de Theodorou et al. (1994) foi composta por soluções de macrominerais, microminerais, tampão e resazurina.

Cada vaca doadora de líquido ruminal foi considerada uma repetição, e todos os tratamentos (controle, monensina, AMC e Caat) e as garrafas de ‘brancos’ foram feitos em triplicata. Foram utilizadas 72 garrafas (3 repetições × 24 garrafas por repetição) com capacidade de 160 mL, que foram previamente lavadas, secas e identificadas. Cada repetição foi constituída por 12 garrafas de tratamento (4 tratamentos × triplicata) e 12 garrafas do ‘branco’. As garrafas ‘brancos’ não receberam o substrato (dieta), entretanto, foram utilizadas para correção das produções de gás oriundas da fermentação do inóculo em resposta à dieta ofertada diretamente às vacas doadoras, além da influência dos extratos sobre o inóculo separadamente (inóculo + extratos).

Na composição do inóculo, a fase líquida e a fase sólida do conteúdo ruminal das vacas foram coletadas separadamente por meio de bomba de vácuo e kitassato; e imediatamente acondicionadas em garrafas e caixas térmicas livres de oxigênio até a realização das análises. Foram utilizados volumes iguais das duas fases do conteúdo ruminal,

os quais foram agitados em liquidificador durante 10 segundos para recuperação dos microrganismos celulolíticos aderidos à fração sólida. Após a agitação, o material resultante foi filtrado em filtro de nylon e mantido a 39 ° C até ao final do preparo do inóculo e submetidos à análise de pH por um potenciômetro. A inoculação (adição do inóculo às garrafas) foi realizada por meio de seringa de plástico graduada de 10 mL e as garrafas foram posteriormente seladas com rolhas de borracha, agitadas e, em seguida, incubadas em estufa de circulação forçada de ar a 39°C (tempo zero de fermentação).

4.2.3 Fermentação ruminal in vitro

4.2.3.1 Produção de gases

As leituras de pressão dos gases acumulados em cada garrafa de fermentação foram feitas utilizando um transdutor de pressão e um “data logger” (PDL800, LANA/CENA/USP, Piracicaba/SP, Brasil), nos tempos 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas após a inoculação. Após a leitura, o restante do gás foi liberado até que a pressão lida pelo transdutor fosse zero e rapidamente, as garrafas foram agitadas e colocadas em estufa novamente (Figura 12). Esse procedimento foi adotado para evitar acúmulo de pressão excessiva no interior das garrafas, porque, de acordo Abdalla et al. (2012), pode ocorrer inibição da fermentação por microorganismos do rúmen quando a pressão no interior ultrapassa 7 psi.

O volume de gás foi estimado de acordo com Mauricio et al. (1999) e para descrever a dinâmica da produção de gás ao longo do tempo, foi aplicado o seguinte modelo exponencial proposto pela France et al. (1993):

$$Vt = A \{1 - \exp [- b(t - L) - c \times (\sqrt{t} - \sqrt{L})]\}$$

onde: Vt representa o volume final do gás acumulado no tempo t (mL), A é a produção assintótica de gás (ml), L é o tempo de colonização (fase lag) e b (h^{-1}) e c ($h^{-0,5}$) = taxas fracionais constantes.

Figura 12 - Liberação dos gases produzidos na fermentação após as leituras de pressão em cada tempo com auxílio de seringas

Fonte: Alves (2015)

4.2.3.2 Produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

As concentrações de AGCC no fluido ruminal foram medidas por cromatografia gasosa (GC-2014, Shimadzu, Japão) utilizando coluna capilar (Stabilwax ®, Restek, EUA) a 145 ° C (isotérmico) e um injetor *splitless* e detector dual FID a 250 ° C utilizando o método descrito por Erwin; Marco e Emery (1961), adaptado por Getachew et al. (2004). As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e centrifugadas a 14500 × g durante 10 min. O sobrenadante (800 µL) foi transferido para um frasco limpo e seco com 200 µL de ácido fórmico a 98-100% PA ACS e 100 µL de padrão interno (ácido 2-etil-butírico 100 µM, Chemservice, EUA). O padrão externo foi preparado com os ácidos acético, propiônico, isobutírico, butírico, valérico e isovalérico (Service Chem, EUA). O software GCSolution® (Shimadzu, Japão) foi utilizado para os cálculos das concentrações de AGCC.

4.2.3.3 Digestibilidade da MS e MO

Os coeficientes de DIVMS e DIVMO foram determinados de acordo com Menke et al. (1979). O resíduo da fermentação após 24 horas foi obtido por filtração das garrafas em

cadinhos de vidro com placa porosa com peso vazio conhecido. Os resíduos foram secos a 105°C durante 24 horas e pesados para que fossem calculados os coeficientes de DIVMS com base na diferença do cadinho vazio. A DIVMO foi estimada pela diferença dos resíduos de cinzas obtidos em mufla (400°C).

4.2.3.4 Produção de nitrogênio amoniacal (N-NH3)

A determinação do nitrogênio amoniacal foi realizada pelo método colorimétrico do ácido salicílico (CHANEY; MARBACH, 1962). Foram coletados 2 mL do conteúdo de cada garrafa e armazenados juntamente com 1 mL de solução de H_2S0_4 1N em tubos de vidro com tampas de borracha e congeladas à -20°C, até a realização das análises. As amostras foram descongeladas e adicionadas de tungstato de sódio a 10% e posteriormente centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos.

Em seguida, foram pipetados 20 µl do sobrenadante a um tubo de vidro limpo e identificado, onde foram adicionados 1mL do tampão de ácido salicílico e 1mL da solução oxidante de hipoclorito de sódio. Os tubos foram homogeneizados e colocados em banho-maria a 37ºC durante 20 minutos, onde adquiriram coloração esverdeada. Após resfriamento as amostras foram analisadas em espectrofotômetro.

4.2.3.5 Produção de metano

A concentração de metano no líquido ruminal foi medida por cromatografia em fase gasosa (GC-2014, Shimadzu, Japão) segundo recomendações de Abdalla et al. (2008). Para análise do metano, foram coletados 2,5 mL do gás produzido em cada garrafa de fermentação durante cada leitura da produção de gás com auxílio de seringas descartáveis, totalizando ao final do período de incubação 15 mL. O gás foi armazenado em tubos de vidro, previamente identificados e com vácuo e tampados com rolha de borracha.

Das amostras totais colhidas durante a incubação foi utilizado cerca de 1 mL para quantificação do CH_4 e a última leitura e coleta de CH_4 foi feita 24 horas após o início da incubação das amostras. Na cromatografia gasosa foi utilizado o gás Hélio como gás de

arraste, injetor a 100°C e coluna Microempacotada – ShinCarbon/a 60°C com detector de ionização de chama (FID) 120°C. A calibração foi feita com 200 µL de padrão e a curva foi estabelecida no software GCSolution ® (Shimadzu, Japão). A concentração de metano em cada garrafa de fermentação foi expressa em porcentagem e em mL.

4.2.4 Análises Estatísticas

Os resultados foram analisados pelo programa computacional Statistical Analysis System ® (SAS, 2001) como delineamento experimental inteiramente casualizado. Inicialmente, foram verificadas a normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias pelo PROC UNIVARIATE. Os graus de liberdade foram calculados de acordo com o método Satterthwaite (DDFM = Satterth). As variáveis resposta de fermentação ruminal *in vitro* foram avaliadas pelo procedimento MIXED do SAS. Com a distribuição normal dos dados, o procedimento estatístico avaliou os efeitos principais dos tratamentos (controle - CO, monensina - MO, AMC e Caat). Diversas estruturas de erros foram investigadas, e a estrutura escolhida para cada variável avaliada foi de acordo com o critério de informação bayesiano (BIC). As variáveis AGCC, DIVMS, DIVMO, CH_4 e N-NH_3 foram analisadas de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_i = \mu + T_i + e_i,$$

onde Yi = é o valor observado ; µ = média geral; Ti = efeito fixo do tratamento i e e_i = erro aleatório associado a cada observação. As médias ajustadas foram calculadas e comparadas pela opção DIFF do ‘statement’ LSMEANS. Os testes para as diferenças de médias foram realizados por meio de contrastes ortogonais definidos previamente. Os contrastes avaliados foram: c1 (controle *versus* demais); c2 (monensina *versus* extratos brutos) e c3 (Caat *versus* AMC). Os interceptos e os coeficientes angulares foram obtidos utilizando a opção “estimate” do procedimento MIXED. Para todas as análises estatísticas foi utilizada o nível de significância de $P \leqslant 0,05$ e tendência de $P \leqslant 0,10$.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Produção de Gases

Não foram observados efeito dos tratamentos sobre os parâmetros da equação de produção de gases (A, b, c e L). Entretanto foi observado efeito dos aditivos sobre a produção de gás acumulada em 24 horas (P = 0,0005), sendo que a inclusão de monensina resultou em menor produção de gás (122,13 ml/g) que o AMC (156,70 ml/g) e o Caat (142,89 ml/g). Embora a produção de gás do controle não tenha sido diferente da produção dos extratos e da monensina, a monensina reduziu a produção de gás em aproximadamente 28% e 17% menor do que para a inclusão de AMC e Caat, respectivamente (Figura 13). Além disso, a inclusão de Caat reduziu a produção de gás (P = 0,0064) em comparação com o a inclusão do extrato AMC (Tabela 6).

Figura 13 - Produção acumulada de gases *in vitro* de dois extratos brutos (Caat e AMC) produzidos por actinobactérias e monensina sódica sobre substrato e inóculo ruminal de vacas leiteiras

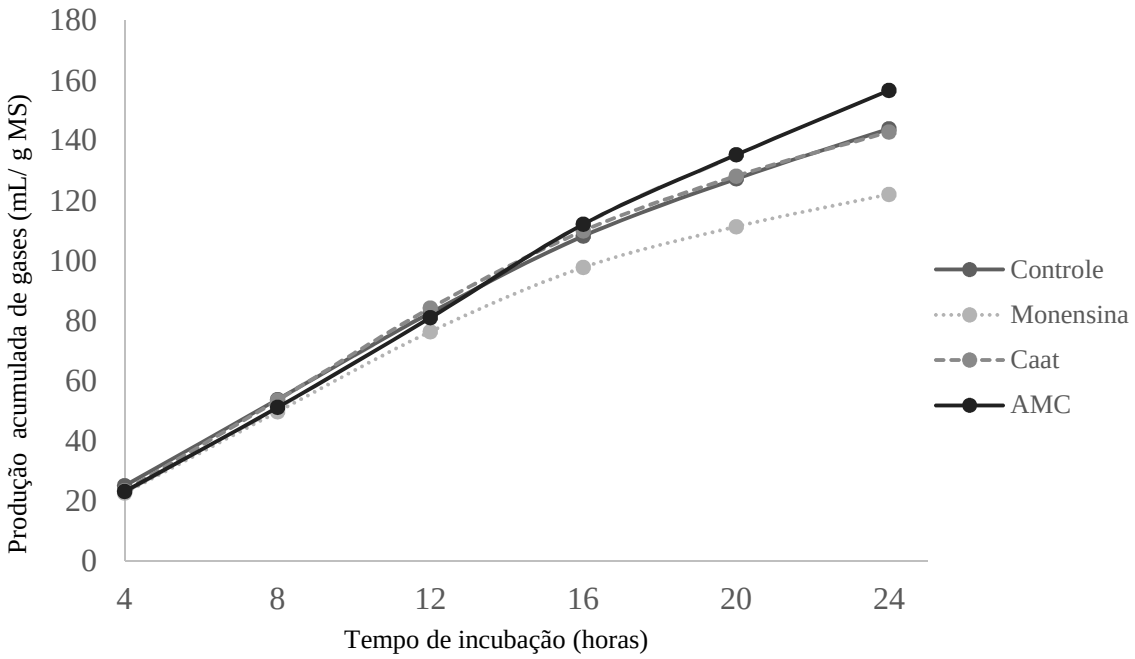


Tabela 6 - Produção acumulada de gás em 24 horas (ml / g), produção de gás assintótica (A, ml / g de MS), taxas fracionais b e c e tempo de colonização (L, horas) de extratos brutos produzidos por actinobactérias utilizando inóculo de vacas leiteiras

Variável	Tratamentos				Média Geral	EPM	Efeitos			
	Controle	Monensina	AMC	Caat			Tratamento	C1	C2	C3
A (mL, g^{-1} MS)	249,10	206,07	267,03	229,33	237,88	9,183	0,097	0,397	**0,047**	0,105
b (h^{-1})	0,058	0,059	0,058	0,063	0,060	0,001	0,524	0,480	0,630	0,236
c ($h^{-1/2}$)	0,109	0,094	0,114	0,106	0,106	0,005	0,188	0,654	0,143	0,501
L (h)	0,903	0,707	0,973	0,701	0,821	0,097	0,541	0,586	0,540	0,283
Acum., 24	143,90	122,13	156,70	142,89	141,40	3,889	**0,0005**	0,294	**<0,0001**	**0,006**

A: volume final ou produção potencial de gases; b e c: constantes do modelo; L: tempo de colonização; Acum.: produção acumulada em 24 horas; EPM: erro-padrão da média; C1: contraste controle *versus* demais; C2: contraste monensina *versus* extratos brutos; C3: contraste AMC *versus* Caat.

4.3.2 Digestibilidade in vitro da matéria seca e matéria orgânica

Houve efeito de tratamento sobre a DIVMS, sendo que o grupo controle apresentou o maior coeficiente. Quando comparada aos extratos brutos (AMC e Caat), a monensina resultou em menores coeficientes de DIVMS (P = 0,0107), aproximadamente 30% menor do que ambos os extratos brutos. Entretanto, não foram observadas diferenças com a inclusão de ambos extratos sobre a DIVMS. Sobre a variável DIVMO não foi observado efeito de tratamento (Tabela 7).

Tabela 7 - Efeito da inclusão de monensina e extratos brutos produzidos por actinobactérias sobre a DIVMS e DIVMO de inóculos de vacas leiteiras

Variáveis	Tratamentos				Média Geral	EPM	P valor			
	Controle	Monensina	AMC	Caat			Tratamento	C1	C2	C3
DIVMS	0,620	0,463	0,607	0,616	0,576	0,025	**0,048**	0,192	**0,010**	0,868
DIVMO	0,705	0,796	0,817	0,802	0,780	0,034	0,507	0,249	0,873	0,886

DIVMS: digestibilidade *in vitro* da matéria seca; DIVMO: digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica; EPM: erro-padrão da média; C1: contraste controle *versus* demais; C2: contraste monensina *versus* extratos brutos; C3: contraste AMC *versus* Caat.

4.3.3 Produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

Foram observados efeitos de tratamento sobre as concentrações de AGCC tanto para a concentração em mM quanto em %. Foi observado efeito de tratamento sobre a concentração em mM para todos os ácidos analisados, com exceção do isobutírico. A inclusão de monensina e Caat resultaram nas maiores concentrações de propionato (34,18 mM e 30,00 mM, respectivamente); correspondendo a um aumento de aproximadamente 30% para a inclusão de monensina e de 16% para a de Caat em relação ao controle. Em contrapartida, a concentração de ácido acético foi menor quando foi incluída a monensina em comparação extratos AMC e Caat (P = 0,0108). Ademais, a inclusão do extrato Caat resultou em menores concentrações de ácido acético quando comparada ao controle (Tabela 8).

Os ácidos butírico, isovalérico e valérico apresentaram menores concentrações com a inclusão de monensina, quando comparados a ambos extratos. O ácido butírico foi cerca de 50% menor para a monensina quando comparada ao controle, e cerca de 30% menor para o Caat em relação ao controle. A concentração do ácido isovalérico não diferiu entre o controle para os demais aditivos (P = 0,8956), embora a inclusão de monensina tenha reduzido a concentração de ácido isovalérico em relação aos dois extratos brutos. Observou-se a maior concentração de ácido valérico para o controle (P = 0,0229), entretanto com concentrações menores com a inclusão de monensina em comparação aos extratos Caat e AMC. A relação acetato:propionato foi maior para o controle e AMC, enquanto que foi aproximadamente 45 e 17% menor com a inclusão de monensina e Caat, respectivamente.

As concentrações em porcentagens dos AGCC produzidos foram menores com a inclusão de monensina para os ácidos acético, butírico e isovalérico, enquanto que a concentração (%) de isobutírico não foi alterada. Para a concentração de ácido acético, não houve diferenças significativas do controle aos demais aditivos, entretanto com a monensina as concentrações de ácido acético foram menores do que ambos extratos (P = <0,0001). Ademais, a inclusão de Caat diminuiu cerca de 1,3% a concentração deste ácido quando comparado à concentração do AMC (P = 0,0134).

Assim como em mM, a concentração em % de ácido propiônico foi maior com a inclusão de monensina (28,88 %) em comparação aos demais, e Caat (24,15 %) aumentou a concentração de propionato em relação ao AMC (19,13 %) (P = <0,0001). Proporcionalmente, os valores de ácido butírico produzidos foram também menores com a inclusão de monensina e Caat, sendo aproximadamente 44 % e 31 % menores,

respectivamente. O ácido isovalérico apresentou menores concentrações após a inclusão de monensina em comparação ao controle ou aos extratos (AMC e Caat). Por fim, houve diferença na concentração de ácido valérico do controle contra os demais aditivos, sendo que as concentrações foram maiores no controle.

Tabela 8 - Efeito da inclusão de monensina e extratos brutos produzidos por actinobactérias sobre a produção *in vitro* de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

AGCC (mM)	Tratamentos				Média Geral	EPM	Probabilidade			
	Controle	Monensina	AMC	Caat			Tratamento	C1	C2	C3
		mM								
Acético	69,59	62,67	72,36	68,31	68,23	1,32	**0,037**	0,501	**0,010**	0,222
Propiônico	25,76	34,18	24,83	30,00	28,69	0,97	**<0,0001**	**0,002**	**<0,0001**	**0,001**
IsoButírico	2,31	1,90	2,30	2,25	2,19	0,13	0,679	0,614	0,279	0,883
Butírico	23,46	14,93	24,27	17,16	19,95	0,83	**<0,0001**	**0,0004**	**<0,0001**	**<0,0001**
IsoValérico	3,49	2,66	3,54	4,37	3,51	0,17	**<0,0001**	0,895	**0,0002**	**0,025**
Valérico	2,06	1,47	1,98	1,66	1,79	0,07	**<0,0001**	**0,022**	**0,031**	0,091
Relação A/P	2,71	1,86	2,95	2,30	2,45	0,08	**<0,0001**	**0,0002**	**<0,0001**	**<0,0001**
		%								
Acético	54,90	53,19	55,98	55,22	54,82	0,21	**<0,0001**	0,648	**<0,0001**	**0,013**
Propiônico	20,50	28,88	19,13	24,15	23,16	0,75	**<0,0001**	**<0,0001**	**<0,0001**	**<0,0001**
IsoButírico	1,81	1,62	1,77	1,82	1,76	0,10	0,894	0,761	0,499	0,880
Butírico	18,43	12,73	18,84	13,97	16	0,54	**<0,0001**	**<0,0001**	**<0,0001**	**<0,0001**
IsoValérico	2,72	2,30	2,72	3,48	2,80	0,11	**<0,0001**	0,563	**0,0005**	**0,003**
Valérico	1,60	1,26	1,53	1,33	1,43	0,04	**<0,0001**	**0,028**	0,131	0,122

EPM: erro-padrão da média; C1: contraste controle *versus* demais; C2: contraste monensina *versus* extratos brutos; C3: contraste AMC *versus* Caat.

4.3.4 Produção de Nitrogênio Amoniacal (N-NH_3)

Houve efeito de tratamento sobre a produção de nitrogênio amoniacal no inóculo das garrafas de fermentação; sendo que a menor produção foi observada com a inclusão de monensina (24,46 mg/dL), 19% menor do que o controle e com diferença significativa para os extratos brutos (P = 0,0009). Não foram observadas diferenças do controle para os demais aditivos (P = 0,1873) nem entre os extratos brutos (P = 0,7297) (Tabela 9).

Tabela 9 - Efeito da inclusão de monensina e extratos brutos produzidos por actinobactérias sobre a concentração *in vitro* de nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_3$) e metano (CH_4) de inóculo de vacas leiteiras

Variáveis	Tratamentos				Média Geral	EPM	P valor			
	Controle	Monensina	AMC	Caat			Tratamento	C1	C2	C3
$N\text{-}NH_3$(mg/dL)	29,20	24,46	29,76	26,07	27,37	0,65	**<.0001**	0,187	**0,0009**	0,729
Metano (mL)	13,87	8,31	9,47	9,02	10,17	0,5316	**<.0001**	0,0723	**0,0006**	**0,0001**
(%)	9,67	6,79	6,36	6,68	7,37	0,3233	**<.0001**	0,0799	**0,0307**	**<.0001**

EPM: erro-padrão da média; C1: contraste controle *versus* demais; C2: contraste monensina *versus* extratos brutos; C3: contraste AMC *versus* Caat.

4.3.5 Produção de Metano (CH_4)

Diante da mensuração de metano nas garrafas de fermentação, foi possível observar efeito de tratamento sobre a concentração de metano produzida, ao passo que a inclusão de monensina causou redução na concentração de metano (mL) quando comparada aos extratos brutos AMC e Caat (P = 0,0006). Foi possível observar também que entre os extratos, o Caat resultou em menor concentração de metano quando comparado ao AMC (9,02 e 9,47, respectivamente). Foi observada somente uma tendência para a porcentagem de metano do controle comparado aos demais aditivos. Entretanto, quando comparados aos extratos brutos, a monensina obteve maiores valores de metano produzido (P = 0,0307). Para os extratos brutos, no entanto, a concentração (%) de metano produzida foi menor no grupo AMC (P = <0,0001) (Tabela 9).

4.4 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo indicam que o extrato bruto Caat, derivados de actinobactérias, apresentou atividade semelhante à da monensina sódica na modulação da fermentação ruminal *in vitro*, diminuindo a produção cumulativa de gases em 24 horas sem afetar DIVMS. Adicionalmente, foi capaz de modular a produção de AGCC e diminuir a produção de metano e $N\text{-}NH_3$ produzido.

Em relação à produção acumulada de gases em 24 horas, observou-se que a inclusão de monensina resultou em redução da produção de gases totais. Embora o controle não tenha se diferido dos demais grupos de aditivos, a produção de gases mediante a inclusão de monensina foi cerca de 28% menor do que o AMC e 17% menor do que o Caat. Quando comparados os dois extratos AMC e Caat, este último causou menor produção de gases totais em comparação ao AMC. Com resultado similar, Kim et al. (2014), avaliaram a inclusão de monensina, ácido láurico e óleo de palma em ensaio *in vitro* de 24 horas com inóculo de novilhas da raça Holandesa e observaram diminuição da produção total de gases e do tempo de colonização (L) mediante inclusão da monensina.

Em estudo com vacas em lactação como doadoras de líquido ruminal, foi avaliada a inclusão de lasalocida, própolis ou monensina sobre substratos anteriormente já adicionados de monensina e óleo de soja, e foi observado que essa inclusão causou redução da produção total de gases, sendo que as menores produções observadas foram para o tratamento própolis seguido dos ionóforos (lasalocida e monensina) (LEOPOLDINO et al., 2007).

Foi observado redução da DIVMS com a inclusão da monensina, embora não se tenha observado mudanças na DIVMS com a inclusão de ambos extratos (AMC e Caat). Weimer et al. (2011) incubaram culturas mistas em ensaio 24 horas com forragens mistas e concentrados, e observaram que para os inóculos adaptados à monensina não houve alteração da DIVMS quando comparadas à inóculos de animais não adaptados.

Em avaliação da DIVMS de substratos concentrados e suplementados ou não com aditivos (probiótico ou monensina) sob inóculo bovino e bubalino, foi observado que para o inóculo bovino independentemente do nível de concentrado do substrato, a adição da monensina causou diminuição dos coeficientes de DIVMS (BELEZE et al., 2008), assim como demonstrado no presente estudo. Essa diminuição da DIVMS difere de outro estudo de Beleze (2005), que em experimento *in vivo* com bovinos e bubalinos alimentados com 50:50% de volumoso:concentrado, a adição de monensina sódica causou aumento dos coeficientes de DIVMS.

Com a inclusão dos aditivos do presente estudo, houve modulação na produção de AGCC’s de forma que os grupos monensina e Caat aumentaram as concentrações de propionato, assim como descrito por Wischer et al. (2013) que avaliaram os efeitos da monensina sobre a produção de gás total, metano e AGCC e observaram que a monensina aumentou a produção de propionato, além de reduzir a concentração de acetato. O presente estudo também observou menor concentração de ácido acético para a inclusão de monensina

quando comparados aos extratos, e menor concentração do mesmo ácido com a inclusão de ambos extratos (AMC e Caat) quando comparados ao controle.

Ponce et al. (2012) avaliaram o tipo de ionóforo na fermentação *in vitro* e observaram influência de tipo para as proporções molares de propionato, acetato e butirato, sendo que as concentrações foram maiores para o propionato e menores para acetato e relação acetato:propionato; sendo esta última também reportada no presente estudo. Em contrapartida, um estudo *in vivo* com quatro vacas da raça Holandesa em lactação avaliou os efeitos da inclusão do grão de soja e 24 mg monensina/ kg MS em dieta total, constituída por 40% de volumoso e 60% de concentrado e não foi observado efeito das dietas sobre as concentrações de acetato e butirato.

No presente estudo, a relação acetato:propionato foi maior para o controle e AMC, enquanto que houve redução de cerca de 45 e 17% menor para a monensina e Caat, respectivamente. Essa redução na relação acetato:propionato com a inclusão de monensina foi semelhante à observada por Markantonatos et al. (2009) em estudo com oito vacas da raça Holandesa em período de transição suplementadas com 300 mg/dia de monensina. A relação acetato:propionato foi reduzida de 2,66 para 2,43 com a inclusão da monensina durante o período.

Foi observada redução da porcentagem de metano produzida com a inclusão de monensina em relação aos extratos, e destes também houve redução quando comparados ao controle. Com resultado semelhante, Castro-Montoya; Makkar e Becker (2012) incubaram duas doses de monensina (5 e 8 µM), a primeira semelhante à utilizada neste ensaio; com substrato de 70% de feno e 30% de concentrado por 24 horas em um sistema de produção de gás *in vitro* e observaram redução de aproximadamente 30% na produção de metano com a inclusão de monensina quando comparado ao controle.

Também foi observada diminuição das concentrações de nitrogênio amoniacal, com menor valor observado mediante inclusão de monensina em relação a ambos extratos (AMC e Caat), entretanto, nenhum efeito da inclusão dos extratos pôde ser identificado. Em estudo *in vitro* com inóculo de novilhos alimentados com dieta 60:40 feno:concentrado e inclusão de 33 ppm de monensina, o metabolismo de nitrogênio foi avaliado e a inclusão de monensina diminuiu linearmente a concentração de nitrogênio amoniacal e microbiano (WHETSTONE; DAVIS; BRYANT, 1981). Benchaar et al. (2006) e Martineau et al. (2007), em estudos *in vivo* com vacas leiteiras encontraram menor concentração de nitrogênio amoniacal em dietas suplementadas com 350 mg/d e 24 mg/ kg MS de monensina, respectivamente.

Embora os resultados esperados diante da fermentação *in vitro* ainda sejam mais pronunciados com a inclusão da monensina sódica, os produtos naturais de actinobactérias se mostraram efetivos diante das variáveis resposta analisadas. Entretanto, apesar dos extratos brutos serem isolados da mesma bactéria apresentaram diferenças quanto à modulação da fermentação ruminal. Os compostos dinactina e valinomicina presentes no AMC apresentam fórmulas estruturais similares à da monensina sódica, entretanto no composto Caat a molécula de actinomicina não se encontrava em mistura com mais nenhum composto, o que provavelmente explica os resultados mais evidentes deste último (Caat) em comparação à monensina. Adicionalmente, por serem extratos brutos e não metabólitos puros, os efeitos podem ter sido diminuídos pela quantidade de metabólito isolado no extrato, como também pela dose utilizada do composto bruto.

4.5 CONCLUSÃO

O extrato Caat foi capaz de modular a fermentação ruminal *in vitro*, de forma similar à monensina sódica, uma vez que diminui a produção acumulada de gás em 24 horas, aumenta a concentração de propionato, reduz a concentração de butirato, acetato e a relação acetato:propionato e reduz a produção de N-NH_3 e CH_4. No entanto, o extrato Caat não altera a DIVMS ou DIVMO. A inclusão do extrato AMC causa diminuição da produção de CH_4 sem alterar a DIVMS ou DIVMO.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, A. L.; LOUVANDINI, H.; SALLAM, S. M. A. H.; BUENO, I. C. S.; TSAI, S. M.; FIGUEIRA, A. V. O. In vitro evaluation, in vivo quantification, and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 5, p. 953–64, jun. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22083272>. Acesso em: 18 dez. 2015.

ABDALLA, A. L.; SILVA FILHO, J. C. da; GODOI, A. R. de; CARMO, C. A.; EDUARDO, J. L. P. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. Número especial, p. 260–268, jul. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982008001300030&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 25 fev. 2016.

BELEZE, J. F. **Digestibilidade e parâmetros ruminais de rações com teores de concentrado e adição de ionóforo ou probiótico para bovinos e bubalinos**. 2005. xx p. Tese ou Dissertação (Doutorado ou Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2005.

BELEZE, J. R. F.; ZEOULA, L. M.; JACOBI, G.; CANDÊO FILHO, S. L.; KAZAMA, R.; PAULA, M. C. de. Aditivos vs teores de concentrado na ração de bubalinos e bovinos: digestibilidade in vitro da matéria seca. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 29, n. 4, p. 417–424, 2008. Disponível em: <http://eduem.uem.br/ojs/index.php/ActaSciAnimSci/article/view/1008>. Acesso em:

BENCHAAR, C.; PETIT, H. V; BERTHIAUME, R.; WHYTE, T. D.; CHOUINARD, P. Y. Effects of addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk production, and milk composition in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 11, p. 4352–4364, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72482-1>. Acesso em:

CASTRO-MONTOYA, J. M.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Effects of monensin on the chemical composition of the liquid associated microbial fraction in an in vitro rumen fermentation system. **Livestock Science**, v. 150, n. 1-3, p. 414–418, dez. 2012. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187114131200385X>. Acesso em: 12 mar. 2015.

CHANEY, A. L.; MARBACH, E. P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, v. 8, p. 130–2, abr. 1962. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13878063>. Acesso em: 25 fev. 2016.

CREVELIN, E. J.; CROTTI, A. E. M.; ZUCCHI, T. D.; MELO, I. S.; MORAES, L. a. B. Dereplication of *Streptomyces* sp. AMC 23 polyether ionophore antibiotics by accurate-mass electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 49, n. 11, p. 1117–1126, 2014. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/jms.3432>. Acesso em:

DINIUS, D. A.; SIMPSON, M. E.; MARSH, P. B. Effect of Monensin Fed with Forage on Digestion and the Ruminal Ecosystem of Steers. **Journal of Animal Science**, v. 42, n. 1, p. 229–234, 1 jan. 1976. Disponível em: <https://dl.sciencesocieties.org/publications/jas/abstracts/42/1/JAN0420010229>. Acesso em:

15 jan. 2016.

DOMESCIK, E. J.; MARTIN, S. A. Effects of laidlomycin propionate and monensin on the in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 8, p. 2305–12, ago. 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10462011>. Acesso em: 26 mar. 2015.

ERWIN, E. S.; MARCO, G. J.; EMERY, E. M. Volatile Fatty Acid Analyses of Blood and Rumen Fluid by Gas Chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 44, n. 9, p. 1768–1771, 9 set. 1961. Disponível em: <http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022030261899566/fulltext>. Acesso em: 18 dez. 2015.

FRANCE, J.; DHANOA, M. S.; THEODOROU, M. K.; LISTER, S. J.; DAVIES, D. R.; ISAC, D. A Model to Interpret Gas Accumulation Profiles Associated with In Vitro Degradation of Ruminant Feeds. **Journal of Theoretical Biology**, v. 163, n. 1, p. 99–111, jul. 1993. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022519383711094>. Acesso em: 18 dez. 2015.

GETACHEW, G.; ROBINSON, P. H.; DEPETERS, E. J.; TAYLOR, S. J. Relationships between chemical composition, dry matter degradation and in vitro gas production of several ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 111, n. 1-4, p. 57–71, jan. 2004. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840103002177>. Acesso em: 9 set. 2015.

JANI, P.; EMMERT, J.; WOHLGEMUTH, R. Process analysis of macrotetrolide biosynthesis during fermentation by means of direct infusion LC-MS. **Biotechnology Journal**, v. 3, n. 2, p. 202–8, fev. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18064609>. Acesso em: 2 fev. 2016.

KIM, D. H.; MIZINGA, K. M.; KUBE, J. C.; FRIESEN, K. G.; MCLEOD, K. R.; HARMON, D. L. Influence of monensin and lauric acid distillate or palm oil on in vitro fermentation kinetics and metabolites produced using forage and high concentrate substrates. **Animal Feed Science and Technology**, v. 189, p. 19–29, mar. 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840114000078>. Acesso em: 1 mar. 2015.

LEOPOLDINO, W. M.; LANA, R. P.; EIFERT, E. C.; ARCURI, P. B.; MANTOVANI, H. C.; MARTINS, R. G. R. Avaliação de ionóforos pela técnica da perda do potássio celular e produção de gases. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 1516–1522, 2007.

MARKANTONATOS, X.; AHARONI, Y.; RICHARDSON, L. F.; VARGA, G. a. Effects of monensin on volatile fatty acid metabolism in periparturient dairy cows using compartmental analysis. **Animal Feed Science and Technology**, v. 153, n. 1-2, p. 11–27, 2009.

MARTINEAU, R.; BENCHAAR, C.; PETIT, H. V; LAPIERRE, H.; OUELLET, D. R.; PELLERIN, D.; BERTHIAUME, R. Effects of lasalocid or monensin supplementation on digestion, ruminal fermentation, blood metabolites, and milk production of lactating dairy

cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 12, p. 5714–25, dez. 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030207720465>. Acesso em: 12 mar. 2015.

MAURICIO, R. M.; MOULD, F. L.; DHANOA, M. S.; OWEN, E.; CHANNA, K. S.; THEODOROU, M. K. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 79, n. 4, p. 321–330, jun. 1999. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840199000334>. Acesso em: 27 ago. 2015.

MENKE, K. H.; RAAB, L.; SALEWSKI, A.; STEINGASS, H.; FRITZ, D.; SCHNEIDER, W. The Estimation of the Digestibility and Metabolizable Energy Content of Ruminant Feedingstuffs from the Gas Production When They Are Incubated with Rumen Liquor in Vitro. **The Journal of Agricultural Science**, v. 93, n. 01, p. 217, 27 mar. 1979. Disponível em: <http://journals.cambridge.org/abstract_S0021859600086305>. Acesso em: 10 set. 2015.

MERTENS, D. R. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 7, p. 1463–81, jul. 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9241608>. Acesso em: 19 jan. 2016.

NARVAEZ, N.; WANG, Y.; MCALLISTER, T. Effects of extracts of Humulus lupulus (hops) and Yucca schidigera applied alone or in combination with monensin on rumen fermentation and microbial populations in vitro. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 10, p. 2517–22, 15 ago. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23483574>. Acesso em: 15 jan. 2016.

NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J.; WALKER, N. D. The effect of tetronasin and monensin on fermentation, microbial numbers and the development of ionophore-resistant bacteria in the rumen. **The Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, n. 2, p. 129–34, ago. 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8407673>. Acesso em: 10 set. 2015.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient requirements of dairy cattle.** 7. ed. rev. [s.l: s.n.]: 2001.

PONCE, C. H.; SMITH, D. R.; BRANINE, M. E.; HUBBERT, M. E.; GALYEAN, M. L. Effects of type of ionophore and carrier on in vitro ruminal dry matter disappearance, gas production, and fermentation end products of a concentrate substrate. **Animal Feed Science and Technology**, v. 171, n. 2-4, p. 223–229, fev. 2012. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840111004639>. Acesso em: 21 jan. 2016.

SMEDSGAARD, J. Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. **Journal of Chromatography. A**, v. 760, n. 2, p. 264–70, 31 jan. 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9062989>. Acesso em: 18 dez. 2015.

THEODOROU, M. K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M. S.; MCALLAN, A. B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation

kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 48, n. 3-4, p. 185–197, ago. 1994. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0377840194901716>. Acesso em: 10 set. 2015.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3583–97, out. 1991. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1660498>. Acesso em: 24 ago. 2014.

WEIMER, P. J.; STEVENSON, D. M.; MERTENS, D. R.; HALL, M. B. Fiber digestion, VFA production, and microbial population changes during in vitro ruminal fermentations of mixed rations by monensin-adapted and unadapted microbes. **Animal Feed Science and Technology**, v. 169, n. 1-2, p. 68–78, out. 2011. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840111002793>. Acesso em: 12 mar. 2015.

WHETSTONE, H. D.; DAVIS, C. L.; BRYANT, M. P. Effect of monensin on breakdown of protein by ruminal microorganisms in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 53, n. 3, p. 803–9, set. 1981. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7319956>. Acesso em: 9 set. 2015.

WISCHER, G.; BOGUHN, J.; STEINGAS, H.; SCHOLLENBERGER, M.; HARTUNG, K.; RODEHUTSCORD, M. Effect of monensin on in vitro fermentation of silages and microbial protein synthesis. **Archives of Animal Nutrition**, v. 67, n. 3, p. 219–34, jun. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23679006>. Acesso em: 15 out. 2015.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As aplicações dos extratos brutos derivados de actinobactérias, principalmente do Caat, na modulação da fermentação *in vitro* foram benéficas, já que nas duas fases do estudo foi possível observar aumento da concentração de propionato ruminal, fundamental para o aporte energético do animal, diminuição da concentração de butirato e acetato e da relação acetato:propionato. Também, houve diminuição da produção de gases totais em ambos os ensaios, representados também pelo CH_4. A DIVMO foi afetada somente na primeira fase do estudo, e a concentração de $N\text{-}NH_3$ e CH_4 produzidos foram menores com a inclusão do extrato Caat e da monensina sódica.

REFERÊNCIAS

ABDI, E.; FATAHNIA, F.; DEHGHAN BANADAKI, M.; AZARFAR, A.; KHATIBJOO, A. Effects of soybeans roasting and monensin on milk production and composition and milk fatty acids profile of lactating dairy cows. **Livestock Science**, v. 153, n. 1-3, p. 73–80, maio 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871141313000735>. Acesso em: 12 mar. 2015.

AKINS, M. S.; PERFIELD, K. L.; GREEN, H. B.; BERTICS, S. J.; SHAVER, R. D. Effect of monensin in lactating dairy cow diets at 2 starch concentrations. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 2, p. 917–29, fev. 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030213008308>. Acesso em: 12 mar. 2015.

APPUHAMY, J. A. D. R. N.; STRATHE, A. B.; JAYASUNDARA, S.; WAGNER-RIDDLE, C.; DIJKSTRA, J.; FRANCE, J.; KEBREAB, E. Anti-Methanogenic Effects of Monensin in Dairy and Beef Cattle: A Meta-Analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 8, p. 5161–73, 8 ago. 2013. Disponível em: <http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022030213004244/fulltext>. Acesso em: 12 mar. 2015.

ARAÚJO, R. C. **Óleos essenciais de plantas brasileiras como manipuladores de fermentação ruminal in vitro**. 2010. 178 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

ASCHENBACH, J. R.; PENNER, G. B.; STUMPFF, F.; GÄBEL, G. Ruminant nutrition symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 4, p. 1092–1107, 2011.

BAGG, R. Mode of action of ionophores in lactating dairy cattle. In: USEFULNESS OF IONOPHORES IN LACTATING DAIRY CATTLE, 1997, Guelph, Ontario. **Anais**... Guelph, Ontario: Symposium ADSA, 1997.

BAYONA-BAFALUY, M. P.; MANFREDI, G.; MORAES, C. T. A chemical enucleation method for the transfer of mitochondrial DNA to rho(o) cells. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 16, p. e98, 15 ago. 2003. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=169990&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 10 set. 2015.

BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. de. **Nutrição de ruminantes**. 2. ed.Piracicaba: Funep , 2011

BERGEN, W. G.; BATES, D. B. Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. **Journal of Animal Science**, v. 58, p. 1465–1483, 1984.

BHATTA, R.; TAJIMA, K.; TAKUSARI, N.; HIGUCHI, K.; ENISHI, O.; KURIHARA, M.

Comparison of sulfur hexafluoride tracer technique, rumen simulation technique and in vitro gas production techniques for methane production from ruminant feeds. **International Congress Series**, v. 1293, p. 58–61, jul. 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0531513106003633>. Acesso em: 6 jan. 2016.

BLU¨MMEL, M.; ØRSKOV, E. R. Comparison of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v. 40, n. 2-3, p. 109–119, jan. 1993. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037784019390150I>. Acesso em: 2 set. 2015.

BLÜMMEL, M.; GIVENS, D. I.; MOSS, A. R. Comparison of methane produced by straw fed sheep in open-circuit respiration with methane predicted by fermentation characteristics measured by an in vitro gas procedure. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123-124, p. 379–390, set. 2005. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840105002580>. Acesso em: 20 ago. 2015.

BUENO, I. C. S.; CABRAL FILHO, S. L. S.; GOBBO, S. P.; LOUVANDINI, H.; VITTI, D. M. S. S.; ABDALLA, A. L. Influence of inoculum source in a gas production method. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123-124, p. 95–105, set. 2005. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840105001975>. Acesso em: 20 ago. 2015.

CALSAMIGLIA, S.; STERN, M. D.; BACH, A. Enzymatic and microbial-cell preparation techniques for predicting rumen degradation and postruminal availability of protein. In: GIVENS, D. I.; OWEN, E.; OMED, H. M.; AXFORD, R. F. E. (Ed.). **Forage evaluation in ruminant nutrition**. Bangor, UK: CAB, 2000. p. 259–279.

CAMPOS NETO, O.; RAMOS, A. A.; ESCOBAR, M. J.; DALANESI, J. A.; DE BEM, C. H. W. AVALIAÇÃO DA MONENSINA SÓDICA EM VACAS LEITEIRAS. **Scientia Agricola**, v. 52, n. 2, p. 268–273, 1995.

CHOW, J. M.; RUSSELL, J. B. Effect of ionophores and pH on growth of Streptococcus bovis in batch and continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1588–93, jun. 1990. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=184476&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 30 mar. 2015.

CLARY, E. M.; BRANDT, R. T.; HARMON, D. L.; NAGARAJA, T. G. Supplemental fat and ionophores in finishing diets: feedlot performance and ruminal digesta kinetics in steers. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 11, p. 3115–3123, 1993.

CONE, J. W.; VAN GELDER, A. H.; BACHMANN, H. Influence of inoculum source on gas production profiles. **Animal Feed Science and Technology**, v. 99, n. 1-4, p. 221–231, ago. 2002. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840102000731>. Acesso em: 10 set. 2015.

COOPER, R.; KLOPFENSTEIN, T. J.; STOCK, R.; PARROTT, C.; HEROLD, D. **Effect of rumensin and feed intake variation on ruminal pH**. 1997. (Nebraska Beef Cattle Reports. Paper 430. Disponível em: <http://digitalcommons.unl.edu/animalscinbcr/430>. Acesso em: 10 set. 2015.

CREVELIN, E. J.; CROTTI, A. E. M.; ZUCCHI, T. D.; MELO, I. S.; MORAES, L. a. B. Dereplication of *Streptomyces* sp. AMC 23 polyether ionophore antibiotics by accurate-mass electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 49, n. 11, p. 1117–1126, 2014. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/jms.3432>.

DA SILVA, D. C.; SANTOS, G. T.; BRANCO, A. F.; DAMASCENO, J. C.; KAZAMA, R.; MATSUSHITA, M.; HORST, J. A.; DOS SANTOS, W. B. R.; PETIT, H. V. Production performance and milk composition of dairy cows fed whole or ground flaxseed with or without monensin. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 6, p. 2928–2936, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2006-573>.

DE CESPEDES, C.; CHRISTENSEN, H. N. Complexity in valinomycin effects on amino acid transport. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 339, n. 1, p. 139–45, 26 fev. 1974. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4851127>. Acesso em: 10 set. 2015.

DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **The Journal of Antibiotics**, v. 62, n. 1, p. 5–16, jan. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19132062>. Acesso em: 6 ago. 2015.

DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S. C.; HENRIQUES, L. T.; PINA, D. S.; PAULINO, M. F.; VALADARES, R. F. D.; CHIZZOTTI, M. L.; MAGALHÃES, K. A. Estimação da digestibilidade dos carboidratos não-fibrosos em bovinos utilizando-se o conceito de entidade nutricional em condições brasileiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1479–1486, ago. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982006000500030&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 10 set. 2015.

DOMESCIK, E. J.; MARTIN, S. A. Effects of laidlomycin propionate and monensin on the in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 8, p. 2305–12, ago. 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10462011>. Acesso em: 26 mar. 2015.

DONIUS, D. A.; SIMPSON, M. E.; MARSH, P. B. Effect of monensin fed with forage on digestion and the ruminal ecosystem of steers. **Journal of Animal Science**, v. 42, n. 1, p. 229–34, jan. 1976. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2571>. Acesso em: 9 set. 2015.

DUBUC, J.; DUTREMBLAY, D.; BRODEUR, M.; DUFFIELD, T.; BAGG, R.; BARIL, J.; DESCÔTEAUX, L. A randomized herd-level field study of dietary interactions with monensin on milk fat percentage in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 2, p. 777–81, fev. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19164691>. Acesso em: 9 set. 2015.

DUFFIELD, T. F.; RABIEE, A. R.; LEAN, I. J. A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 1. Metabolic effects. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 4, p.

1334–46, abr. 2008a. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203020871261X>. Acesso em: 12 mar. 2015.

DUFFIELD, T. F.; RABIEE, A. R.; LEAN, I. J. A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 2. Production effects. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 4, p. 1347–60, abr. 2008b. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030208712621>. Acesso em: 12 mar. 2015.

ERASMUS, L. J.; MUYA, C.; ERASMUS, S.; COERTZE, R. F.; CATTON, D. G. Effect of virginiamycin and monensin supplementation on performance of multiparous Holstein cows. **Livestock Science**, v. 119, n. 1-3, p. 107–115, dez. 2008. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871141308000784>. Acesso em: 12 mar. 2015.

FAULKNER, D. B.; KLOPFENSTEIN, T. J.; TROTTER, T. N.; BRITTON, R. A. Moneimsin effects on digestibility, ruminal protein escape and microbial protein synthesis on high-fiber diets. **Journal of Animal Science**, v. 61, n. 3, p. 654–660, 17 abr. 1985. Disponível em: <https://dl.sciencesocieties.org/publications/jas/abstracts/61/3/JAN0610030654>. Acesso em: 30 mar. 2015.

FELLNER, V.; SAUER, F. D.; KRAMER, J. K. Effect of nigericin, monensin, and tetronasin on biohydrogenation in continuous flow-through ruminal fermenters. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 5, p. 921–8, 1 maio 1997. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/14040926_Effect_of_nigericin_monensin_and_tetronasin_on_biohydrogenation_in_continuous_flow-through_ruminal_fermenters>. Acesso em: 24 mar. 2015.

GANDRA, J. R. **Avaliação do uso de monensina sódica em rações de vacas leiteiras: desempenho produtivo e resíduos no leite**. 2009. 93 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

GETACHEW, G.; ROBINSON, P. H.; DEPETERS, E. J.; TAYLOR, S. J.; GISI, D. D.; HIGGINBOTHAM, G. E.; RIORDAN, T. J. Methane production from commercial dairy rations estimated using an in vitro gas technique. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123-124, p. 391–402, set. 2005. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840105001720>. Acesso em: 1 dez. 2015.

GOMES, C. T. **Aditivos (monensina sódica , levedura e probióticos) para bovinos da raça nelore terminados com rações com concentrado rico em co-produtos**. 2009. 109 p. Dissertação (Mestrado em Ciênicas) - Escola Superior de Agricultura “ Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

GOODFELLOW, M.; FIEDLER, H.-P. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 98, n. 2, p. 119–42, ago. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20582471>. Acesso em: 9 set. 2015.

GRAINGER, C.; AULDIST, M. J.; CLARKE, T.; BEAUCHEMIN, K. A.; MCGINN, S. M.; HANNAH, M. C.; ECKARD, R. J.; LOWE, L. B. Use of monensin controlled-release capsules to reduce methane emissions and improve milk production of dairy cows offered pasture supplemented with grain. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 3, p. 1159–65, mar. 2008. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030208713729>. Acesso em: 12 mar. 2015.

GRÖHN, Y.; SALONIEMI, H.; SYVÄJÄRVI, J. An epidemiological and genetic study on registered diseases in Finnish Ayrshire cattle. I. The data, disease occurrence and culling. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 27, n. 2, p. 182–95, jan. 1986. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3799396>. Acesso em: 10 set. 2015.

GUAN, H.; WITTENBERG, K. M.; OMINSKI, K. H.; KRAUSE, D. O. Efficacy of Ionophores in Cattle Diets for Mitigation of Enteric Methane. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 7, p. 1896–906, 10 jul. 2006. Disponível em: <https://dl.sciencesocieties.org/publications/jas/abstracts/84/7/0841896>. Acesso em: 30 mar. 2015.

HANEY, M. E.; HOEHN, M. M. Monensin, a new biologically active compound. I. Discovery and isolation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 7, p. 349–52, jan. 1967. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5596158>. Acesso em: 9 set. 2015.

HARRIS, H.; WATKINS, J. F.; FORD, C. E.; SCHOEFL, G. I. Artificial heterokaryons of animal cells from different species. **Journal of Cell Science**, v. 1, n. 1, p. 1–30, mar. 1966. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4286457>. Acesso em: 10 set. 2015.

HAYES, D. P.; PFEIFFER, D. U.; WILLIAMSON, N. B. Effect of intraruminal monensin capsules on reproductive performance and milk production of dairy cows fed pasture. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 6, p. 1000–8, jun. 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8827463>. Acesso em: 9 set. 2015.

HEUER, C.; LUINGE, H. J.; LUTZ, E. T.; SCHUKKEN, Y. H.; VAN DER MAAS, J. H.; WILMINK, H.; NOORDHUIZEN, J. P. Determination of acetone in cow milk by Fourier transform infrared spectroscopy for the detection of subclinical ketosis. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 3, p. 575–82, mar. 2001. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030201745109>. Acesso em: 5 ago. 2015.

HUNGATE, R. E. Ruminations on the rumen. In: **The rumen and its microbes**. New York: Academic Press, 1966. p. 533.

IPHARRAGUERRE, I. R.; CLARK, J. H. Usefulness of ionophores for lactating dairy cows: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 106, n. 1-4, p. 39–57, abr. 2003. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0377840103000658>. Acesso em: 27 out. 2013.

IRBIS, C.; USHIDA, K. Detection of methanogens and proteobacteria from a single cell of

rumen ciliate protozoa. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 203–12, ago. 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15754246>. Acesso em: 9 set. 2015.

JOHNSON, K. A.; JOHNSON, D. E. Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 8, p. 2483–92, ago. 1995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8567486>. Acesso em: 30 mar. 2015.

JOHNSON, K.; HUYLER, M.; WESTBERG, H.; LAMB, B.; ZIMMERMAN, P. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a sulfur hexafluoride tracer technique. **Environmental Science & Technology**, v. 28, n. 2, p. 359–362, fev. 1994. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/es00051a025>. Acesso em: 6 jan. 2016.

KIM, D. H.; MIZINGA, K. M.; KUBE, J. C.; FRIESEN, K. G.; MCLEOD, K. R.; HARMON, D. L. Influence of monensin and lauric acid distillate or palm oil on in vitro fermentation kinetics and metabolites produced using forage and high concentrate substrates. **Animal Feed Science and Technology**, v. 189, p. 19–29, mar. 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840114000078>. Acesso em: 1 mar. 2015.

KNOWLTON, K. F.; ALLEN, M. S.; ERICKSON, P. S. Lasalocid and particle size of corn grain for dairy cows in early lactation. 2. Effect on ruminal measurements and feeding behavior. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 4, p. 565–74, abr. 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8744221>. Acesso em: 9 set. 2015.

KOZLOSKI, G. V.; HÄRTER, C. J.; HENTZ, F.; DE ÁVILA, S. C.; ORLANDI, T.; STEFANELLO, C. M. Intake, Digestibility and Nutrients Supply to Wethers Fed Ryegrass and Intraruminally Infused with Levels of Acacia Mearnsii Tannin Extract. **Small Ruminant Research**, v. 106, n. 2-3, p. 125–130, ago. 2012. Disponível em: <https://www.infona.pl//resource/bwmeta1.element.elsevier-b82ee14c-133f-3e81-9ba9-9b1c25d9aa66>. Acesso em: 5 ago. 2015.

KRISHNAMOORTHY, U.; STEINGASS, H.; MENKE, K. H. Preliminary observations on the relationship between gas production and microbial protein synthesis in vitro. **Archiv für Tierernährung**, v. 41, n. 5, p. 521–6, jun. 1991. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1953335>. Acesso em: 10 set. 2015.

KUSCHE, B. R.; SMITH, A. E.; MCGUIRL, M. A.; PRIESTLEY, N. D. Alternating pattern of stereochemistry in the nonactin macrocycle is required for antibacterial activity and efficient ion binding. **Journal of American Chemistry Society**, v. 131, p. 17155–17165, 2009.

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. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 1, p. 254–260, fev. 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982001000100036&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 22 fev. 2016.

LÓPEZ, S. In vitro and in situ techniques for estimating digestibility. In: DIJKSTRA, J.; FORBES, J. M.; FRANCE, J. (Ed.). **Quantitative aspects of ruminant digestion and**

metabolism. 2. ed. [s.l.]: CAB International, 2005. p. 87–121.

LOVETT, D.; LOVELL, S.; STACK, L.; CALLAN, J.; FINLAY, M.; CONOLLY, J.; O'MARA, F. P. Effect of forage/concentrate ratio and dietary coconut oil level on methane output and performance of finishing beef heifers. **Livestock Production Science**, v. 84, n. 2, p. 135–146, dez. 2003. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301622603002331>. Acesso em: 22 fev. 2016.

LOWE, L. B.; BALL, G. J.; CARRUTHERS, V. R.; DOBOS, R. C.; LYNCH, G. A.; MOATE, P. J.; POOLE, P. R.; VALENTINE, S. C. Monensin controlled-release intraruminal capsule for control of bloat in pastured dairy cows. **Australian Veterinary Journal**, v. 68, n. 1, p. 17–20, jan. 1991. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2018451>. Acesso em: 9 set. 2015.

MACHMÜLLER, A.; OSSOWSKI, D. .; WANNER, M.; KREUZER, M. Potential of various fatty feeds to reduce methane release from rumen fermentation in vitro (Rusitec). **Animal Feed Science and Technology**, v. 71, n. 1-2, p. 117–130, mar. 1998. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840197001260>. Acesso em: 30 mar. 2015.

MARKANTONATOS, X.; AHARONI, Y.; RICHARDSON, L. F.; VARGA, G. A. Effects of monensin on volatile fatty acid metabolism in periparturient dairy cows using compartmental analysis. **Animal Feed Science and Technology**, v. 153, n. 1-2, p. 11–27, 2009.

MARTÍNEZ, E. D.; A.V., K.; D., O.; T., S.; L.M., G.; K., T.; D.P., P.falta sobrenome dos autores Between animal variance in ruminal bacteria and protozoal communities from DGGE profiles of steers on a low quality forage diet. In: BIENNIAL ANIMAL PRODUCTION IN AUSTRALIA, 28., 2010, **Anais**... 2010. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/265869867_Between_Animal_Variance_in_Ruminal_Bacteria_and_Protozoal_Communities_from_DGGE_Profiles_of_Steers_on_a_Low_Quality_Forage_Diet>. Acesso em: 10 set. 2015.

MCCARTHY, M. M.; YASUI, T.; RYAN, C. M.; MECHOR, G. D.; OVERTON, T. R. Performance of early lactation dairy cows as affected by dietary starch and monensin supplementation. **Journal of Dairy Science**, 2015a. p. 1–16, Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8820>. Acesso em:

MCCARTHY, M. M.; YASUI, T.; RYAN, C. M.; PELTON, S. H.; MECHOR, G. D.; OVERTON, T. R. Metabolism of early lactation dairy cows as affected by dietary starch and monensin supplementation. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 5, p. 3351-3365, mar. 2015b. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030215001733>. Acesso em: 12 mar. 2015.

MCGUFFEY, R. K.; RICHARDSON, L. F.; WILKINSON, J. I. D. Ionophores for Dairy Cattle: Current Status and Future Outlook. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. E194–E203, jun. 2001. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030201702184>. Acesso em: 12 mar. 2015.

MENKE, K. H.; RAAB, L.; SALEWSKI, A.; STEINGASS, H.; FRITZ, D.; SCHNEIDER, W. The Estimation of the Digestibility and Metabolizable Energy Content of Ruminant Feedingstuffs from the Gas Production When They Are Incubated with Rumen Liquor in Vitro. **The Journal of Agricultural Science**, v. 93, n. 01, p. 217, 27 mar. 1979. Disponível em: <http://journals.cambridge.org/abstract_S0021859600086305>. Acesso em: 10 set. 2015.

MOSS, A. R.; JOUANY, J. P.; NEWBOLD, J. Review article Methane production by ruminants : its contribution to global warming. **Annales de Zootechnie**, v. 49, n. 3, p. 231–253, 2000.

MOURA, M. T. **Utilização da actinomicina d como método de enucleação química de ovócitos bovinos destinados à transferência nuclear**. 2007. , Tese ou Dissertação (Doutorado em... ou Dissertação em...) - Faculdadade de Agronomia e Medicina Veterinária - Universidade de Brasília, Brasília, 2007. Disponível em: <http://repositorio.unb.br/handle/10482/2518>. Acesso em:

MULLINS, C. R.; MAMEDOVA, L. K.; BROUK, M. J.; MOORE, C. E.; GREEN, H. B.; PERFIELD, K. L.; SMITH, J. F.; HARNER, J. P.; BRADFORD, B. J. Effects of monensin on metabolic parameters, feeding behavior, and productivity of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 3, p. 1323–36, mar. 2012. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030212000896>. Acesso em: 30 mar. 2015.

MUNTIFERING, R. B.; THEURER, B.; NOON, T. H. Effects of Monensin on Site and Extent of Whole Corn Digestion and Bacterial Protein Synthesis in Beef Steers. **Journal of Animal Science**, v. 53, n. 6, p. 1565–1573, 1 dez. 1981. Disponível em: <https://dl.sciencesocieties.org/publications/jas/abstracts/53/6/JAN0530061565>. Acesso em: 30 mar. 2015.

NAGARAJA, T. G.; AVERY, T. B.; BARTLEY, E. E.; ROOF, S. K.; DAYTON, A. D. Effect of lasalocid, monensin or thiopeptin on lactic acidosis in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 54, n. 3, p. 649–58, mar. 1982. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7085521>. Acesso em: 9 set. 2015.

NEVES, M. C. **Produção in vitro de metano e análise da diversidade genética das archaea metanogênicas do rúmen de bovinos**. 2008. , Tese ou Dissertação (Doutorado em... ou Dissertação em...) -Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, , 2008.

NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J.; WALKER, N. D. The effect of tetronasin and monensin on fermentation, microbial numbers and the development of ionophore-resistant bacteria in the rumen. **The Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, n. 2, p. 129–34, ago. 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8407673>. Acesso em: 10 set. 2015.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient requirements of dairy cattle.** 7. ed. rev. Washington, DC: NRC, 2001.

OBA, M.; ALLEN, M. S. Effects of brown midrib 3 mutation in corn silage on productivity

of dairy cows fed two concentrations of dietary neutral detergent fiber: 1. Feeding behavior and nutrient utilization. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 6, p. 1333–41, jun. 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10877399>. Acesso em: 9 set. 2015.

ODONGO, N. E.; BAGG, R.; VESSIE, G.; DICK, P.; OR-RASHID, M. M.; HOOK, S. E.; GRAY, J. T.; KEBREAB, E.; FRANCE, J.; MCBRIDE, B. W. Long-term effects of feeding monensin on methane production in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 4, p. 1781–8, abr. 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203020771665X>. Acesso em: 12 mar. 2015.

PHIPPS, R. H.; WILKINSON, J. I.; JONKER, L. J.; TARRANT, M.; JONES, A. K.; HODGE, A. Effect of monensin on milk production of Holstein-Friesian dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 12, p. 2789–94, dez. 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11132848>. Acesso em: 9 set. 2015.

PLAIZIER, J. C.; MARTIN, A.; DUFFIELD, T.; BAGG, R.; DICK, P.; MCBRIDE, B. W. Effect of a prepartum administration of monensin in a controlled-release capsule on apparent digestibilities and nitrogen utilization in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 12, p. 2918–25, dez. 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11132864>. Acesso em: 27 out. 2013.

PRESSMAN, B. C. Biological Applications of Ionophores. **Annual Review of Biochemistry**, v. 45, p. 501–30, 28 jan. 1976. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.bi.45.070176.002441?journalCode=biochem>. Acesso em: 24 mar. 2015.

RAMOS, S.; KABACK, H. R. The electrochemical proton gradient in Escherichia coli membrane vesicles. **Biochemistry**, v. 16, n. 5, p. 848–854, mar. 1977. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/bi00624a006>. Acesso em: 10 set. 2015.

RANGEL, A. H.; LEONEL, F. P.; SIMPLÍCIO, A. A.; MENDONÇA JUNIOR, A. F. Utilização de ionóforos na produção de ruminantes. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 8, n. 2, p. 173–182, 2008.

REZANKA, T.; SPI´ZEK, J.; PRIKRYLOVA, V.; PRELL A, D.; EMBITSKY, V. Five new derivatives of nonactic and homo-nonactic acids from Streptomyces globisporus. **Tetrahedron**, v. 60, p. 4781–4787, 2004.

RICHARDSON, L. F.; RAUN, A. P.; POTTER, E. L.; COOLEY, C. O.; RATHMACHER, R. P. Effect of monensin on rumen fermentation in vitro and in vivo. **Journal of Animal Science**, v. 43, n. 3, p. 657–664, 1976.

RIVERA, A. R.; BERCHIELLI, T. T.; MESSANA, J. D.; VELASQUEZ, P. T.; FRANCO, A. V. M.; FERNANDES, L. B. Fermentação ruminal e produção de metano em bovinos alimentados com feno de capim-tifton 85 e concentrado com aditivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 3, p. 617–624, mar. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982010000300022&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 30 mar. 2015.

ROGERS, J. A.; DAVIS, C. L. Rumen volatile fatty acid production and nutrient utilization in steers fed a diet supplemented with sodium bicarbonate and monensin. **Journal of Dairy Science**, v. 65, n. 6, p. 944–952, 1982.

RUSSELL, J. B. A proposed mechanism of monensin action in inhibiting ruminal bacterial growth: effects on ion flux and protonmotive force. **Journal of Animal Science**, v. 64, n. 5, p. 1519–25, maio 1987. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3583956>. Acesso em: 30 mar. 2015.

RUSSELL, J. B.; HOULIHAN, A. J. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 1, p. 65–74, abr. 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12697342>. Acesso em: 10 set. 2015.

RUSSELL, J. B.; STROBEL, H. J. MINIREVIEW Effect of Ionophores. **Microbiology**, v. 55, n. 1, 1989.

SAUER, F. D.; FELLNER, V.; KINSMAN, R.; KRAMER, J. K.; JACKSON, H. A.; LEE, A. J.; CHEN, S. Methane output and lactation response in Holstein cattle with monensin or unsaturated fat added to the diet. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 3, p. 906–14, mar. 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9535354>. Acesso em: 14 set. 2015.

SEAL, C. J.; REYNOLDS, C. K. Nutritional Implications of Gastrointestinal a N D Liver. **Nutrition Research Reviews**, v. 6, p. 185–208, 1993.

SINDIRAÇÕES. **Compêndio brasileiro de alimentação animal**. [São Paulo]: Gráfica Sã, 2009..

SMEDSGAARD, J. Micro-scale extraction procedure for standardized screening of fungal metabolite production in cultures. **Journal of Chromatography A**, v. 760, n. 2, p. 264–70, 31 jan. 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9062989>. Acesso em: 18 dez. 2015.

SOBELL, H. M. Actinomycin and DNA transcription. In: National Academy of Sciences of the United States of America, 16, **Anais**...ago. 1985. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=390561&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 4 abr. 2015.

STERN, M. D.; HOOVER, W. H. Methods for determining and factors affecting rumen microbial protein synthesis: A review. **Journal of Animal Science**, v. 49, p. 1590–1603, 1979. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/237571580_Methods_for_determining_and_factors_affecting_rumen_microbial_protein_synthesis_A_review>. Acesso em: 22 fev. 2016.

TEDESCHI, L. O.; FOX, D. G.; TYLUTKI, T. P. Potential Environmental Benefits of Ionophores in Ruminant Diets. **Journal of Environment Quality**, v. 32, n. 5, p. 1591, 1 set. 2003. Disponível em: <https://dl.sciencesocieties.org/publications/jeq/abstracts/32/5/1591>. Acesso em: 30 mar. 2015.

THEODOROU, M. K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M. S.; MCALLAN, A. B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 48, n. 3-4, p. 185–197, ago. 1994. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0377840194901716>. Acesso em: 10 set. 2015.

THORNTON, J. H.; OWENS, F. N. Monensin supplementation and in vivo methane production by steers. **Journal of Animal Science**, v. 52, n. 3, p. 628–34, mar. 1981. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6267003>. Acesso em: 9 set. 2015.

TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. A Two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. **Grass and Forage Science**, v. 18, n. 2, p. 104–111, jun. 1963. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x>. Acesso em: 10 set. 2015.

TOMKINS, N. W.; DENMAN, S. E.; PILAJUN, R.; WANAPAT, M.; MCSWEENEY, C. S.; ELLIOTT, R. Manipulating rumen fermentation and methanogenesis using an essential oil and monensin in beef cattle fed a tropical grass hay. **Animal Feed Science and Technology**, v. 200, p. 25–34, fev. 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840114003988>. Acesso em: 20 jan. 2015.

VAN DER WERF, J. H.; JONKER, L. J.; OLDENBROEK, J. K. Effect of monensin on milk production by Holstein and Jersey cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 2, p. 427–33, fev. 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9532496>. Acesso em: 9 set. 2015.

VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I. Determination of rumen microbial growth in vitro from 32P-labelled phosphate incorporation. **The British Journal of Nutrition**, v. 38, n. 1, p. 101–14, jul. 1977. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/889765>. Acesso em: 30 mar. 2015.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2 ed. ed. [s.l: s.n.]

WADA, F. Y.; PRADO, I. N. do; SILVA, R. R.; MOLETTA, J. L.; VISENTAINER, J. V.; ZEOULA, L. M. Grãos de linhaça e de canola sobre o desempenho, digestibilidade aparente e características de carcaça de novilhas nelore terminadas em confinamento**. Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, 21 dez. 2008. Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/1135>. Acesso em: 30 mar. 2015.

WEDEGAERTNER, T. C.; JOHNSON, D. E. Monensin effects on digestibility, methanogenesis and heat increment of a cracked corn-silage diet fed to steers. **Journal of Animal Science**, v. 57, n. 1, p. 168–77, jul. 1983. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6885657>. Acesso em: 30 mar. 2015.

WEIMER, P. J.; STEVENSON, D. M.; MERTENS, D. R.; HALL, M. B. Fiber digestion, VFA production, and microbial population changes during in vitro ruminal fermentations of mixed rations by monensin-adapted and unadapted microbes. **Animal Feed Science and Technology**, v. 169, n. 1-2, p. 68–78, out. 2011. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840111002793>. Acesso em: 12 mar.

2015.

WEIMER, P. J.; WEIMER, P. J. Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 3114–3122, 1998.

WHETSTONE, H. D.; DAVIS, C. L.; BRYANT, M. P. Effect of monensin on breakdown of protein by ruminal microorganisms in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 53, n. 3, p. 803–9, set. 1981. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7319956>. Acesso em: 9 set. 2015.

ZINN, R. A. Comparative feeding value of supplemental fat in finishing diets for feedlot steers supplemented with and without monensin. **Journal of Animal Science**, v. 66, n. 1, p. 213–27, jan. 1988. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3366709>. Acesso em: 10 ago. 2015.