UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

OLGA LURDES JOSSIAS FAFTINE

Efeitos da salinomicina no consumo, degradação no rúmen e in vitro, taxas de produção de gases e fermentação in vitro de dietas compostas por feno de capim coast cross (Cynodon dactylon) e sal proteinado

Pirassununga
2006

Universidade de São Paulo
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

**Efeito da salinomicina no consumo,
degradação no rúmen e in vitro, taxas de
produção de gases e fermentação in vitro de
dietas compostas por feno de capim coast
cross (Cynodon dactylon) e sal proteinado**

Olga Lurdes Jossias Faftine

Tese de Doutorado depositada na Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Zootecnia, na área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Orientador: Prof.Dr.Marcus Antonio Zanetti

Pirassununga - Estado de São Paulo - Brasil

Seção de Pós-Graduação FZEA/USP
EXEMPLAR DE DEFESA
Data de Entrada na Seção: 09/10/2006
Assinatura: *OK*

Dedico

Aos meus pais , Roda e Manuel,
que me mostraram o caminho....

Às minhas filhas:

Yara, Amo-te
Awassi, Amo-te

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho contou com o apoio de várias pessoas de diversos setores da Universidade de São Paulo e do Instituto de Produção Animal em Moçambique.

Agradeço à CAPES pela bolsa concedida.

Agradeço ao Instituto de Produção Animal por me ter concedido licença para fazer o doutorado e por ter financiado parte dos meus estudos: Aquisição de equipamento informático e softwares estatísticos, a compra do feno e suplementos usados nos ensaios de degradabilidade, as análises de cromo, AGV e NH₃, análises bromatológicas completas e mini-cursos. Agradeço a Doutora Paula Pimental, do Instituto de Produção Animal, por ter flexibilizado o processo da minha formação.

Agradeço a Intervet e a Minerthal pelos suplementos fornecidos na primeira parte do projeto.

Agradeço ao professor Zanetti, pela troca de idéias que culminaram na elaboração do projeto de pesquisa e o esclarecimento de dúvidas críticas que surgiram ao longo do trabalho. Agradeço ainda, pela captação de fundos para a aquisição de suplementos na primeira fase do projeto e para o pagamento do treinamento em técnicas in vitro de produção de gases.

Agradeço aos vários técnicos e professores dos diversos laboratórios por onde passei ao longo do doutorado. A experiência de trabalhar com pessoas

especializadas nessas áreas permitirá que eu leve para Moçambique uma dinâmica diferente da que tinha quando de lá parti.

Agradeço a Professora Catarina Abdala por incentivar e permitir que os alunos usem os equipamentos disponíveis no laboratório.

Agradeço a Rosely, a Rosilda e o Rafael por terem sido capazes de me passar conhecimentos técnicos importantes sempre num clima amigável.

Agradeço ao Ari pela ajuda na preparação das amostras para a análise de NH₃ e AGV.

Agradeço ao professor Marcelo e sua equipe, em especial a Andréa e todas as estagiárias do laboratório de Bioquímica pela orientação e ajuda na análise de uréia plasmática. Agradeço também os lanches deliciosos preparados pelas meninas do laboratório.

Agradeço ao Laboratório do Hospital Veterinário e ao professor Maia pelas análises coprológicas dos animais.

Agradeço ao Professor Abdalla do CENA, e o restante da equipe em especial ao Ives e a Patrícia por terem compartilhado conosco a técnica in vitro de produção de gases e pelas idéias para uma implementação desta técnica em Moçambique.

Agradeço a Carla Nussio pela ajuda na análise de NH₃ e AGV.

Agradeço ao senhor Manuel, Ricardo, Tiago, e Zé pela ajuda no trabalho de campo e por estarem sempre dispostos a ajudar no que fosse preciso.

Agradeço a equipe do gado de corte, Armando, Beto e Luís pela ajuda prestada na colheita de sangue nos animais, no rodízio dos animais pela

pastagem na primeira fase deste projeto, ao dr Fernando por nos ajudar a resolver os casos clínicos nos animais experimentais.

Agradeço a Márcia Saladini pela colaboração no trabalho desde a sua concessão colheita e análise de amostras. Agradeço também, ao Arlindo Saran pela colaboração neste trabalho.

Agradeço à comissão de Pós-Graduação pelo assistência prestada em especial ao Professor Raul Franzolin, Professor Douglas, à Gláucia , a Conceição a Roberta e o Régis. Agradeço a Sílvia por todos os contactos e encaminhamentos de documentos na perfeitura.

Agradeço a Rose, Rosane Rodrigues, Jujú, Kathery, Juce , Juliana Paschoal pela amizade.

Agradeço ao Nataniel, pelo amor , companherismo e muito mais.....

Resumo

Faftine, Olga L. J. **Efeitos da salinomicina no consumo, degradação no rúmen e in vitro, taxas de produção de gases e fermentação in vitro de dietas compostas por feno de capim coast cross (*Cynodon dactybn*) e sal proteinado.** 2006. 65 f. Tese – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

Este trabalho pretende avaliar o efeito da salinomicina no consumo de feno coast cross e sal proteinado, na digestibilidade total, ruminal in situ e in vitro, taxas de produção de gases e taxas de fermentação. Para a avaliação da digestibilidade e degradabilidade in situ foram utilizados 4 novilhos Holandeses com peso médio de 350 kg $\pm$ 43 kg. O delineamento experimental utilizado foi o quadrado latino com 4x4. No ensaio in vitro foram utilizados 4 substratos *8 inóculos *2 corridas com delineamento em blocos e arranjo fatorial. Os tratamentos estudados foram: 0; 0,1; 0,2; 0,3 mg de salinomicina /kg de peso vivo. Não foram encontradas diferenças significativas ($p>0,05$) no consumo de MS(1,92; 1,73; 1,60; 1,63 %PV), digestibilidade aparente da MS (81,79; 80,32; 80,32 e 80,49), na degradação in situ da MS (52; 51,25; 49,20 e 51,38) e na degradação in vitro da MS (45,31; 45,64; 45,77; 45,03) entre os vários tratamentos. Os únicos parâmetros onde foram identificadas alterações significativas entre os tratamentos foram no volume final de gases in vitro e nas curvas de taxas de fermentação. Os valores encontrados de para o volume final de gases foi de 231,8; 204; 168 e 157,78 ml /g de MS para a dose de 0; 0,1; 0,2 e 0,3 mg de salinomicina/ kg de PV, respectivamente. O tratamento 3 foi o que teve menores perdas de energia.

Palavras-chave: gases, ionóforo, in vitro; rúmen, inóculo

Abstract

Faftine, Olga L. J. **Effects of salinomycin on dry matter intake , in situ and in vitro degradability , rates of gas production and fermentation of cynodon (*Cynodon dactylon*) hay supplemented with proteic salt** 2006. 65 f. Tese – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

This experiment was conducted to evaluate the effect of graded levels of salinomycin on feed intake, apparent digestibility, gas production and fermentation rate, degradability in situ and in vitro of cynodon hay supplemented with proteic salt with 0, 0.1, 0.2 and 0.3mg of salinomycin per kg LW. Intake , digestibility and degradability studies were analysed as a latin square design 4x4 and in vitro trials followed the block randomized design with a two factors (inoculum and substrate). No differences ($p > 0.05$) were found between the treatments for DM intake (1.92, 1.73, 1.60, 1.63 per % LW), DM digestibility (81.79, 80.32, 80.32 and 80.49), DM in situ degradability (52, 51.25, 49.20 and 51.38) and in vitro DM degradability (45.31, 45.64, 45.77 and 51.38). Differences between treatments were found only for potential gas production in vitro (231.8, 204, 168 and 157.78 ml/g DM) for 0, 0.1, 0.2 and 0.3 mg of salinomycin/kg LW. Therefore, wasting energy was minimized at treatment 3.

Key -words: ionophore, in vitro; in situ; inoculum, rumen

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Proporção de ingredientes no sal proteinado -----	36
Tabela 2- Composição química do feno e do sal proteinado-----	36
Tabela 3- Consumo total de MS, Mo,FDN, PB (kg/animal/dia) -----	47
Tabela 4- Consumo (%PV) e digestibilidade aparente da MS, PB, FDN-----	49
Tabela 5- Parâmetros da degradabilidade in situ da MS do feno-----	51
Tabela 6- Parâmetros da degradabilidade in situ da FDN do feno-----	52
Tabela 7- Parâmetros da degradabilidade in situ da MS do sal-----	53
Tabela 8- Parâmetros da degradabilidade in situ da FDN do feno-----	54
Tabela 9- Parâmetros da produção in vitro de gases-----	60
Tabela 10- N-amoniacal-----	62

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Perfil da cinética da MS do feno-----	55
Figura 2- Perfil da cinética da FDN do feno-----	55
Figura 3- Perfil da cinética da MS do sal -----	56
Figura 4- Perfil da cinética da PB do sal-----	56
Figura 5- Curvas das taxas de fermentação com Líquido ruminal-----	61
Figura 6- Curvas das taxas de fermentação com inóculo fezes-----	61

SUMÁRIO

1. Introdução-----	14
2. Revisão da literatura-----	16
2.1. Modo de ação dos ionóforos-----	16
2.2. Efeito dos ionóforos no metabolismo energético-----	18
2.3. Efeito dos ionóforos no metabolismo do nitrogênio-----	20
2.4. Efeito da salinomicina na produção de bovinos e ovinos de corte-----	24
2.5. Técnicas usadas na avaliação dos ionóforos-----	30
3. Material e Métodos-----	35
4. Resultados e discussão-----	47
5. Conclusões -----	63

Introdução

A produtividade dos ruminantes criados nos países tropicais em desenvolvimento é limitada principalmente pelo baixo consumo de energia. Os fatores que determinam o consumo são complexos e as suas interações são ainda pouco conhecidas. Um dos fatores que comprometem o consumo nesses animais é a reduzida taxa de fermentação e passagem da fração dos carboidratos estruturais pelo rúmen. Além disso, uma parte da energia gerada durante a fermentação, sob a forma de calor e metano, não pode ser utilizada pelo animal.

A perspectiva de melhoramento do consumo de energia pelos ruminantes, a redução nos custos dos suplementos e redução na poluição ambiental tem impulsionado o uso de ionóforos. Considera-se que estas substâncias têm a capacidade de inibir o crescimento de bactérias metanogênicas, e desse modo, a energia que seria perdida na forma de metano é convertida em propionato.

Modificações na proporção de ácidos graxos produzidos no rúmen e na conversão alimentar, quando os ionóforos são introduzidos, têm sido relatados por vários pesquisadores. A diminuição no teor de N - amoniacal no rúmen e aumento na conversão alimentar também são reportados. Contudo vários trabalhos e métodos de pesquisa, como a degradabilidade in situ e a digestibilidade aparente não foram suficientes para detectar diferenças que permitam recomendar com segurança a quantidade de ionóforo adequada para obter os benefícios tão largamente difundidos destes aditivos. Poucos trabalhos estudaram o efeito da salinomicina na taxa de fermentação dos alimentos e na produção de gases no rúmen. A taxa de produção de gases e o volume de gás produzido podem dar uma idéia do potencial energético da dieta. Dietas ricas em propionato produzem

relativamente, menos gás em relação às que geram quantidades elevadas de acetato.

Os objetivos deste estudo foram avaliar o efeito do ionóforo salinomicina no consumo, pH, N - amoniacal, degradação in situ e digestibilidade aparente de dietas constituídas por feno de coast cross e sal proteinado e estudar também a degradação, a produção de gases e a taxa de fermentação dessas dietas por intermédio da técnica in vitro de produção de gases.

↳ comparar inoculos!

2. Revisão da Literatura

2.1 Modo de ação dos ionóforos

A salinomicina pertence ao grupo de antibióticos ionóforos carboxílicos produzidos por linhagens de *Streptomyces*. A principal ação dos ionóforos é a inibição do crescimento das bactérias gram positivas, produtoras de hidrogênio.

Bergen e Bates (1984), resumem os efeitos dos ionóforos na fermentação ruminal e no animal hospedeiro. Segundo estes autores, os ionóforos têm a capacidade de fazer ligações com íons metais, servindo assim de facilitadores do movimento dos íons na camada dupla lipídica da membrana celular.

A maioria das células expelle prótons ativamente (via ATPase) através da membrana celular e mantém o interior citoplasmático mais alcalino. Desse modo, as concentrações de cátions de potássio no interior da célula bacteriana são muito maiores que o meio extracelular. No interior da célula, o potássio participa na síntese de proteína e para tamponar o pH intracelular por meio de mecanismo de troca de potássio por hidrogênio.

Para que o pH se estabilize, o excesso de prótons de hidrogênio deve ser expelido para fora da bactéria. Esse gradiente de pH cria um gradiente químico de prótons; como o interior da membrana é mais negativo que o exterior, é criado também um potencial elétrico. O gradiente de pH e o potencial elétrico são responsáveis pela força motriz de prótons, que pode ser utilizada para importar solutos para dentro da membrana. Isso desorganiza o transporte de íons de tal modo que um cátion monovalente passa a ser trocado por outro cátion monovalente durante a passagem pela membrana plasmática.

O efluxo de potássio resulta no acúmulo de Hidrogênio, levando ao decréscimo no pH intracelular. Por exemplo, culturas de *S. bovis* mantêm pH interno próximo a 7,08 quando o pH extracelular é de 6,65, gerando uma potência próton- química de -26mV. Quando a monensina é adicionada ao ambiente, as células perdem a capacidade de expelir íons de hidrogênio e o meio citoplasmático fica mais ácido que o extracelular.

O complexo ionóforo - cátion envolve ligações de Hidrogênio entre os átomos de oxigênio presentes no éter, no grupo hidroxil do ácido carboxílico do poliéter e o cátion. Esse complexo adere às bactérias e protozoários e provavelmente também aos fungos, e torna-se solúvel na camada dupla fosfolipídica da membrana celular. Uma vez solubilizado na membrana celular, o cátion complexado é trocado por um próton. A troca primária e secundária de íons é ditada pelo gradiente de concentração de cátions e a afinidade relativa dos ionóforos por um certo cátion. Dado que o maior gradiente de concentração é o de cátions de potássio citoplasmático do que o do potássio extracelular, um cátion de potássio intracelular é trocado por um próton extracelular. O cátion complexado é depositado no fluido extracelular (rúmen). Uma vez livre, o ionóforo se complexa a um cátion extracelular e inverte o processo (Russel e Strobel, 1989).

Essas reações culminam com uma menor concentração intracelular de cátions de potássio e baixo pH e uma maior concentração de sódio intracelular. Com isso, as bactérias tipicamente gram positivas são forçadas a utilizar os sistemas de transporte celular para dissipar o excesso de hidrogênio e sódio intracelular. Para expelir o hidrogênio, as bactérias gram positivas usam as bombas próton - ATPase e Na^+ -ATPase, gastando cerca de 1 ATP por próton. Esse processo reduz as reservas de energia resultando na diminuição da capacidade de divisão celular e redução do potássio intracelular o que reduz, conseqüentemente, as taxas de síntese protéica. A morte celular resulta provavelmente da acidificação do citoplasma.

A adição de salinomicina na dieta quer *in vitro* como *in vivo* provocou mudanças no perfil de AGV no rúmen, similares às observadas em outros ionóforos (Fontenot et al., 1980). Também foi demonstrado que a salinomicina

aumentou a conversão alimentar em animais em crescimento e em acabamento em 10-20%.

O principal efeito que se espera ao utilizar ionóforos na dieta dos ruminantes é o aumento na eficiência alimentar e em alguns casos no ganho de peso. A sua utilização teria, teoricamente, um impacto na redução do consumo de suplementos. A suplementação de sal proteinado, por exemplo, em quantidade que varia de 0,1 a 0,3 % do peso vivo permite reduzir as perdas de peso vivo, manter o peso vivo ou até mesmo, alcançar ganhos moderados de cerca de 200g por animal / dia, dependendo da qualidade do volumoso. Nos sais proteinados, a uréia é fonte de amônia e também tem o papel de limitar o consumo (junto com o sal), a fonte de proteína natural como o farelo de algodão tem o papel de fornecer ácidos graxos de cadeia ramificada (isoácidos) aos microrganismos do rúmen e ou proteína degradável no rúmen (Paulino, 2001). A redução no consumo diário de sal proteinado por animal representaria uma poupança de recursos financeiros que poderiam ser investidos em outros empreendimentos na propriedade pecuária. O aumento na conversão alimentar, segundo Bergen e Bates (1984), resulta de três processos:

- (1) Aumento na eficiência do metabolismo energético no rúmen e /ou no animal.
- (2) Melhoramento do metabolismo do nitrogênio no rúmen e/ou no animal.
- (3) Retardamento de distúrbios metabólicos, como a acidose e timpanismo, no caso dos animais com dietas baseadas em teores elevados de carboidratos solúveis.

2.2. Efeito dos ionóforos no metabolismo energético dos ruminantes

Os principais nutrientes absorvidos pelo trato digestivo dos ruminantes são o acetato, propionato, butirato, aminoácidos e glicose. Nos animais cuja produção depende principalmente de pastagens com baixa digestibilidade, o acetato constitui a principal fonte de energia. A produção de propionato é baixa e a quantidade de glicose absorvida é também, baixa. O suprimento de aminoácidos a partir dessas dietas é tipicamente baixo, e a produção de proteína microbiana é

limitada pela baixa eficiência do crescimento microbiano. O balanço dos nutrientes absorvidos a partir da fermentação dessa dieta é, portanto, caracterizado pelo baixo suprimento de fontes de energia glicogênica (propionato, amido e aminoácidos) em relação à quantidade de energia disponível na forma de acetato (Leng, 1992).

Durante a formação do ácido acético produz-se dióxido de carbono e hidrogênio. O CO_2 é reduzido pelo hidrogênio e convertido em metano. Estima-se que a produção de metano resulta na perda de 2 a 12 % da energia contida no alimento fornecido aos bovinos, e o problema é mais acentuado nos animais alimentados por forragens (Jonhson & Johnson, 1995).

Além de não ser aproveitado pelos animais, o metano vem se acumulando na atmosfera a uma taxa de 1% por ano, e contribui em cerca de 19% no aquecimento global. A contribuição dos ruminantes nessa emissão global é relativamente pequena, sendo estimada entre 15-20%. Contudo, os ruminantes representam uma das poucas fontes de metano que ainda podem ser manipuladas. Além disso, o fato de a redução na produção do metano, estar associada ao aumento na produtividade animal (Leng, 1993), justifica a procura incessante de aditivos que alterem os padrões da fermentação ruminal, favorecendo a formação de ácido propiônico, diminuindo a formação do metano, reduzindo a proteólise e desaminação da proteína dietética.

Os ionóforos aumentam a proporção molar de ácido propiônico e diminuem a dos ácidos acético e butírico na quantidade total de ácidos graxos voláteis (AGV) produzidos no rúmen. Associada a essa mudança, ocorre uma redução na produção de metano. Desse modo, o animal retém maior quantidade de carbono e energia gerados na fermentação ruminal, o que resulta em um maior desempenho. O aumento de propionato tem um efeito secundário na substituição de aminoácidos que normalmente são usados para a gliconeogênese, tornando-os disponíveis para a formação da proteína corporal (Bergen e Bates, 1984). A inibição da metanogênese no rúmen ocorre devido à redução da quantidade de hidrogênio disponível no rúmen, que seria usado pelas bactérias metanogênicas para a formação de metano. Isso acontece porque a atividade dos ionóforos inibe

o crescimento das bactérias gram positivas, produtoras de hidrogênio no rúmen. Além disso, o hidrogênio disponível é capturado pelas bactérias gram negativas para produzir succinato ou propionato, reduzindo ainda mais a disponibilidade desse substrato. As bactérias gram negativas são tolerantes aos ionóforos, porque possuem uma membrana externa ausente nas gram positivas, e que envolve a parede celular e serve de barreira aos ionóforos. Desse modo, os ionóforos favorecem o crescimento das gram negativas, produtoras de succinato ou de ácido propiônico e inibindo as Gram positivas produtoras de ácido acético, butírico, fórmico, hidrogênio e metano. Porém, algumas bactérias gram negativas são sensíveis aos ionóforos, como é o caso da *Fibrobacter succinogenes*. Provavelmente, essa sensibilidade se deva a interferências no mecanismo de captação de glicose. Contudo, essas bactérias se tornam resistentes após um período de colonização longo (McGuffey et al., 2001), o que é importante nas dietas constituídas por forragens cuja digestão depende da ação fibrolítica dessas bactérias.

2.3. Efeito dos ionóforos no metabolismo do nitrogênio nos ruminantes

Os ionóforos diminuem a degradação ruminal da proteína contida no alimento ingerido, aumentando a passagem de proteína de origem alimentar para o intestino delgado. Por outro lado, os ionóforos podem reduzir o fluxo de proteína microbiana para o duodeno e a eficiência do crescimento microbiano ou síntese de proteína microbiana (Bergen e Bates, 1984).

A inibição do metano pode ter efeitos benéficos em situações onde a energia é limitante e o animal beneficia do desvio da energia do alimento do metano para a formação do propionato. Em situações nutricionais onde a proteína é limitante ou a eficiência dietética depende do uso eficiente de NNP existe a possibilidade de os animais não responderem aos agentes ionóforos (Van Soest, 1994).

Num experimento com bovinos em confinamento, alimentados com silagem de milho e farinha de soja, a proteína alimentar que escapou à fermentação ruminal aumentou de 22 para 55% em cinco experimentos diferentes. Ocorreu *uma queda nos valores do fluxo de proteína microbiana (g/dia) para o intestino delgado* e a eficiência do crescimento microbiano ou da síntese protéica de 96 para 76 e de 21 para 15, respectivamente (Bergen e Bates, 1984). Os mesmos autores referem que a presença de monensina reduziu a concentração de amônia ruminal.

Lana et al. (2002), cita trabalhos onde foi constatado que a monensina reduziu a produção ruminal de amônia pela inibição da população de bactérias gram positivas, fermentadoras obrigatórias de aminoácidos. Essas bactérias, apesar de estarem presentes em pequenas quantidades no rúmen, têm uma elevada atividade de desaminação de aminoácidos e por isso são responsáveis pela produção de elevadas quantidades de amônia no rúmen.

Porém, em dietas constituídas por pastagens com cerca de 21% de proteína bruta, dos quais 10-30% é composto por nitrogênio não protéico, os níveis de amônia ruminal aumentaram linearmente com o aumento da dose de salinomicina na dieta, contrariamente ao que ocorreu noutros estudos que usaram a monensina. Nesses estudos compilados por Bagley et al. (1988), as concentrações de N-NH₃ em novilhos confinados, consumindo dietas contendo 12 a 13% de PB, foram reduzidas pela monensina, principalmente devido ao aumento da proporção da proteína que não foi degradada no rúmen. Para os autores deste trabalho, contribuiu para o aumento da concentração de amônia ruminal, o fato de o pasto de ^{capim} Bermuda conter níveis altos de NNP e um tempo de retenção no rúmen muito longo o que resulta em maior disponibilidade de amônia, superando a capacidade de utilização de amônia pelos microrganismos ruminais (Bagley et al., 1988).

No caso de dietas constituídas por silagem de milho, oferecidas a 80 novilhos da raça Angus, com peso inicial de 228 kg, e suplementados com zero, 50 e 100 mg de salinomicina por dia e por animal, a amônia ruminal não foi

afetada pelos tratamentos. A concentração de N-uréico no plasma foi menor ($p < 0,01$) nos novilhos do grupo controle do que naqueles suplementados por salinomicina. Os animais suplementados com salinomicina e lasalocida tiveram concentrações similares de N - uréico plasmático (Reffeit –Stabel et al., 1989).

Quando a taxa de síntese de amônia é maior que sua utilização pelos microrganismos, ocorre uma elevação na concentração de amônia no rúmen aumentando a excreção de uréia e o custo energético da produção de uréia, resultando dessa forma na perda de proteína. A amônia que não é assimilada pelos microrganismos é absorvida através da parede do rúmen e removida da circulação portal pelo fígado onde entra no ciclo da uréia. A concentração plasmática de uréia é positivamente proporcional à ingestão de compostos nitrogenados, sendo necessário estimar os valores de N-uréico plasmático que representa o ponto a partir do qual ocorrem perdas de proteína dietética (Valadares et al., 2001).

A adição de salinomicina aumentou a digestibilidade do nitrogênio 5,4% acima da dieta controle embora não tenha alterado os coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca, matéria orgânica, FDN, FDA ou amido (Merchen e Berger, 1985). As razões para esse aumento, ainda não foram completamente esclarecidas. Uma das razões apontadas para isso, no caso da monensina, é o aumento no fluxo da proteína alimentar e a redução no fluxo de proteína microbiana para o intestino delgado, sendo a proteína alimentar mais digestível que a microbiana (Merchen e Berger, 1985).

Zinn (1986). Este autor utilizou quatro novilhos com peso médio de 234 kg, fistulados no rúmen e no duodeno, em um experimento com delineamento em quadrado latino 4 x 4. Os novilhos foram alimentados por uma dieta similar composta por 90% de concentrado e suplementada com 4 níveis de salinomicina: zero (0); ¹¹55; ^{16,5}11 e ⁵⁵16,5 mg/kg. A salinomicina não influenciou significativamente a digestibilidade total nem a digestão ruminal do nitrogênio. O efeito da salinomicina também não foi significativo no fluxo da proteína microbiana ou da alimentar para o intestino delgado. Para este autor, o

significado prático do efeito da salinomicina no metabolismo ruminal e no local e extensão da digestão da dieta no experimento em causa parece demasiadamente pequeno. O autor afirmou ainda que os benefícios, amplamente aceitos, dos ionóforos são exagerados e levantou dúvidas sobre os benefícios em dietas constituídas majoritariamente por forragens. Sua afirmação se baseia no fato de no experimento por ele realizado, as mudanças na concentração molar de acetato, propionato e butirato terem sido muito pequenas, embora significativas e a relação acetato: propionato não ter mostrado diferenças significativas, apesar de ter mostrado tendências a reduzir à medida que aumentou o nível de salinomicina na dieta. As concentrações molares de acetato foram 45,5; 45,4; 44,5; 42,2 do propionato foram: 47,3; 48,0; 48,6; 51,1 e de butirato foram: 7,2; 6,6; 6,9; 6,6 para os tratamentos com zero, 5,5; 11,0 e 16,5 mg de salinomicina por kg de MS da dieta. Ele levanta dúvidas sobre a possibilidade de esses benefícios serem alcançados nas dietas constituídas por forragens. Tal dúvida se baseia nos resultados de experimentos avaliaram o efeito da monensina na produção de ácidos graxos voláteis, usando sistemas contínuos de cultura contendo substrato rico em grãos ou forragens. No substrato com grãos, a relação acetato: propionato reduziu, como era esperado, 20-30%. Mas no substrato com forragens, a relação acetato: propionato aumentou 9%. As perdas de metano mostraram tendência a reduzir com o aumento do nível de salinomicina, mas o conteúdo de energia metabolizável na dieta não foi alterado significativamente. Assim, Zinn (1986) concluiu que o melhoramento na conversão alimentar pode estar associado mais diretamente ao próprio animal e influenciando provavelmente a eficiência da assimilação de nutrientes ou os gastos da energia basal.

Porém, Lana e Russel (2001) concluíram que as bactérias ruminais provenientes de animais recebendo dieta exclusiva de forragem são mais sensíveis a monensina que aquelas provenientes de animais alimentados por concentrados, indicando que este ionóforo pode ter maior benefício no desempenho de bovinos em pastagens ou em dietas contendo elevado nível de volumoso em comparação àquelas ricas em concentrado. Essas conclusões foram

baseadas em ensaios in vitro com meio de cultura composto por forragem ou por 90% de concentrado. A relação acetato: propionato das bactérias de animais em dieta rica em forragem declinou 1,4 unidade (de 1,75 para 1,25) e das bactérias de animais recebendo concentrados, declinou apenas 0,5 unidades. A produção de metano decresceu acentuadamente nas bactérias em dietas com forragem enquanto que nas provenientes da dieta com concentrado não reduziu a já baixa produção de metano.

2.4. Efeito da salinomicina na produção de bovinos e ovinos de corte

Merchen & Berger (1985) avaliaram os efeitos de diferentes doses de salinomicina (5,5; 11 ou 22 ppm) em ovinos fistulados no rúmen e alimentados por uma dieta constituída por 60% de concentrado e 40% de feno de alfafa e observaram um aumento linear na proporção de propionato ($p < .05$) e uma redução linear ($p < .05$) na proporção molar de acetato e butirato e na relação acetato: propionato. Os valores do propionato, mol/100mol de fluido ruminal foram de 24,1; 28,4; 35,3 e 38,0, os valores da proporção acetato: propionato foram de 2,60; 1,74; 1,59 e 1,20, respectivamente para zero; 5,5; 11 e 22 ppm de salinomicina na dieta. Contudo aqueles autores não fizeram um estudo do desempenho animal para confirmar se essas mudanças no perfil ruminal se refletiam em ganhos na produção.

No entanto, os referidos autores forneceram salinomicina a 105 novilhos cruzados das raças Angus e Hereford, com peso inicial médio de 266 kg, e alimentados por uma dieta com 85% de concentrado. Os tratamentos foram de zero; 5,5; 11; 22 ou 33 ppm. Os níveis de salinomicina tiveram um aumento quadrático ($p < .05$) no ganho diário de peso e uma redução quadrática ($p < .05$) no consumo de alimentos melhorando desse modo, a eficiência alimentar em 10,3%. O ganho diário de peso vivo subiu de 1,27 kg no tratamento sem salinomicina e alcançou o máximo (1,37 kg) na dose de 5,5 ppm. O consumo diário de alimentos (kg) foi de 8,59; 8,36; 8,14; 7,91 e 7,91 e a relação consumo/ganho foi de 6,79; 6,13; 6,10; 5,89; 6,23 respectivamente para as doses zero; 5,5, 11, 22 e 33 ppm.

No terceiro experimento, Merchen e Berger (1985) suplementaram salinomicina (zero; 5,5; 11; 16,5 ou 22 ppm) e monensina (22 ppm) numa dieta constituída por 90% de concentrado. Nesse experimento foi mostrado que as taxas de ganho aumentaram e o consumo de alimentos se manteve. O ganho diário de peso vivo foi de 1,27; 1,42; 1,35; 1,33; 1,37; 1,45, respectivamente. Os valores médios da eficiência alimentar foram 5,1% menores nas dietas contendo ionóforo comparado com a dieta controle. Os novilhos suplementados por monensina ou por qualquer nível de salinomicina, apresentaram concentrações baixas de oocistos de coccídea nas fezes depois de 28 dias e 11 dias em comparação com o grupo controle.

Sendo assim, os autores concluíram que a salinomicina (1) não provocou efeitos indesejados na digestibilidade dos componentes da dieta (2) resultou em rápida mudança no perfil da fermentação ruminal aumentando o ácido propiónico (3) melhorou as taxas de ganho de peso e conversão de alimentos em animais em acabamento (4) foi efetiva no controle da coccidiose.

Aparentemente, o efeito da salinomicina na mudança dos produtos da fermentação ruminal foi maximizado na concentração de 11 ppm, mas os efeitos no desempenho animal foram maximizados na concentração de 5,5 ppm.

Reffett-Stabel et al. (1989) conduziram um experimento com duração de 120 dias, sendo um dos objetivos testar o efeito da salinomicina e lasalocida no crescimento e características ruminais de novilhos em crescimento alimentados por silagens de milho. Um lote de 80 novilhos Angus de porte médio, foi dividido em quatro blocos de acordo com os pesos. Quatro tratamentos foram testados (1) controle, (2) 50 mg de salinomicina /animal/ dia, (3) 100 mg de salinomicina por animal por dia, (4) 250 mg de lasalocida por animal dia. A diferença de ganho de peso entre os tratamentos não foi significativa, mas o consumo de alimentos foi menor ($p < 0,05$) nos animais suplementados por salinomicina do que no grupo controle. O consumo de alimentos foi menor ($p < 0,05$) no grupo alimentado por 100 mg do que com 50 mg de salinomicina por animal por dia. A redução do consumo foi graças à redução do consumo da silagem, enquanto o consumo de concentrado se manteve constante. A quantidade de alimento necessária por

unidade de ganho foi igual entre o grupo controle e o grupo suplementado com 50 mg de salinomicina. A relação consumo/ganho foi de 9,5 e 10,4% menor para o grupo com 100 mg de salinomicina e lasalocida, respectivamente, em relação ao grupo controle, contudo essas diferenças não foram estatisticamente significativas ($p < 0,10$).

A concentração total de AGV foi menor nos animais suplementados com salinomicina do que no grupo controle. As proporções molares de acetato foram menores ($p < 0,01$) nos novilhos suplementados com salinomicina. Não houve diferença quer na concentração total dos AGV ou na proporção de acetato entre os animais com salinomicina e com lasalocida. A proporção de propionato foi menor ($p < 0,05$) nos novilhos do grupo controle no 28º dia; Contudo, no 90º dia todos os tratamentos apresentaram proporções de propionato idênticas. Essa variação pode ser resultado de um processo de adaptação ao longo do tempo, dos animais alimentados por salinomicina e lasalocida ou pode também estar relacionada com diferenças no consumo de alimentos ao longo do tempo.

Com o objetivo de comparar diferentes níveis de salinomicina nas características ruminais e no desempenho de novilhos de corte em pastejo, Bagley et al., (1988), conduziram um ensaio com 40 novilhos cruzados de Brahman e peso médio inicial de 180 kg. Todos os animais foram mantidos numa pastagem de Bermuda e alimentados manualmente com 0,9 kg de milho moído misturado com zero, 50, 100 e 150 mg do ionóforo por dia. A proporção ($\mu\text{mol/ml}$) de propionato aumentou e a proporção de butirato e a relação acetato: propionato diminuíram linearmente com o aumento da dose de salinomicina. As quantidades de propionato foram 16,1, 16,4, 17,3, 18,1, a quantidade de butirato foi 13,9, 10,8, 10,9, 10,1; a relação acetato:propionato foi 4,36, 4,23, 3,86, 3,56 respectivamente. Os ganhos diários de peso e os pesos finais aumentaram linearmente ($p < 0,01$) e quadraticamente ($p < 0,05$) com o aumento das doses de salinomicina. O ganho médio diário de peso vivo aumentou 47% com a suplementação de salinomicina.

Bagley et al (1988) conduziram um segundo experimento onde 48 novilhos cruzados das raças Hereford, Angus e Brahman com peso médio inicial de 285 kg, em pastagem de Bermuda, foram agrupados de acordo com o peso e

distribuídos por dois tratamentos: com e sem salinomicina no sal mineral. A adição de salinomicina ao sal mineral reduziu ($p < 0,05$) o seu consumo diário (131 vs 65g/cabeça).

O consumo de salinomicina foi em média de 38mg/animal, abaixo do esperado, devido à redução na atividade efetiva da salinomicina. A salinomicina usada nesse experimento perdeu a estabilidade duas semanas após a mistura com outros ingredientes. Isso fez com que o consumo real de salinomicina fosse menor que o esperado apesar de o consumo de sal mineral estar dentro do previsto. Nesses níveis de consumo de salinomicina, os ganhos diários de peso e o ganho total não diferiram do controle.

Sánchez et al., (1997), adicionaram 10 mg de salinomicina na dieta de 29 borregos e compararam com uma dieta sem ionóforo e com outra contendo 25 mg de monensina. O tratamento com salinomicina apresentou melhor eficiência alimentar, embora não fosse estatisticamente significativa. Nesse experimento não foram observados efeitos sobre o consumo diário. Enquanto o tratamento com salinomicina apresentou aumento no ganho diário de peso em 16% em relação ao tratamento sem ionóforo, o tratamento com monensina não teve efeito sobre aquele parâmetro.

Zinn (1986), estudou o efeito de diferentes doses de salinomicina na taxa e eficiência de ganho de 75 novilhos e 75 novilhas, com peso médio de 220 kg, alimentados com uma dieta com teor alto de energia. Os tratamentos foram: zero; 5,5; 11; 16,5 e 22 mg/kg de MS da dieta. A dieta basal foi constituída por 39% de grãos floculados de milho e 39% de grãos de cevada laminados a vapor e continha 3% de gordura, 5,72% de melaço e forragem na proporção de 10%. Pequenas porções de cal (1,10%), uréia (0,85), sulfato de amônio (90,68%), microminerais (0,5%) e vitamina A foram incluídos na referida dieta. A taxa de ganho de peso não foi influenciada ($p > .20$), mas a conversão alimentar foi melhorada em 6% no nível de 11 mg de salinomicina /kg de MS da dieta ($p < .05$). Resultados obtidos em 10 experimentos em confinamento foram sumarizados por Zinn (1986), onde as doses de salinomicina variaram de zero a 22 mg/kg, o

aumento da taxa de ganho de peso variou de zero a 21%, o consumo diário de alimentos de -6,6 até 1,7% e a conversão alimentar de 2,4 a 21%.

Kobayashi et al., (1992), utilizou ovinos com fístula no rúmen e no duodeno, com peso médio de 35 kg, alimentados diariamente com feno de ryegrass italiano e 500 g de ração comercial misturada com ou sem 32ppm de salinomicina. O teor de PB no feno foi de 6,1 e o da ração 15,3%. O autor não encontrou diferenças no consumo de alimentos. Entretanto, o perfil de AGV foi modificado pela presença de salinomicina, aumentando o propionato e diminuindo o butirato e acetato sem alterar o volume total de AGV. A digestibilidade no rúmen e a digestibilidade total de MS, MO no rúmen diminuiu, mas a diferença não foi significativa. O crescimento e a eficiência de crescimento bacteriano não foi alterado. A salinomicina reduziu a degradação da PB no rúmen. A quantidade de nitrogênio total e de nitrogênio não amoniacal que entrou no duodeno não foi afetada pela salinomicina. Valinote et al. (2004), estudaram o efeito da salinomicina e da virginiamicina nos protozoários ciliados no rúmen de novilhos Nelore em terminação. Doze animais com peso inicial médio de 492 kg foram alimentados com uma dieta constituída por 20% de silagem de sorgo, 10% bagaço de cana in natura, 16,83% de milho em grão seco, 20% de casca de soja, 20% de citrus peletizada, 45% de farelo de soja, 0,96% de uréia, 0,65% de mineral e 0,255 de fosfato bicálcico. A dieta continha 13,50% de PB. Os autores observaram que a salinomicina reduziu a contagem de protozoários ciliados no rúmen ($\times 10^4$). O gênero *Entodinium* reduziu de 71,86 observados no controle, para 39,63. O gênero *Epidinium* de 6,79 para 1,23 e *Dasytricha* de 2,16 para zero e total de 91,14 para 45,80, respectivamente.

Ortolan (2005), utilizou quatro bovinos, distribuídos em 4 ^{monoculturas} tratamentos: A (sem aditivo); B (5,0g de levedura), C (0,42g de salinomicina). A dieta básica utilizada foi a silagem de sorgo e concentrado na proporção de 30:70. Os parâmetros avaliados foram degradabilidade ruminal in situ do volumoso e da dieta total, concentração de AGV, N amoniacal, pH ruminal, taxa de passagem líquida, *turnover* e volume ruminal, e identificação e contagem de protozoários ciliados. Houve aumento da fração b da MS, no tratamento levedura e no

Protozoários

tratamento salinomicina. O pH não foi afetado, a concentração de NH_3 e a cinética ruminal não foram afetados. O uso de ionóforos melhorou a relação entre os ácidos acético:propiónico e o ácido propiónico e butírico enquanto a levedura aumentou a concentração de ácido acético.

Os valores de amônia obtidos variaram de 8,12 a 10,99 ml/100 ml de líquido ruminal, passadas 0 até 8 horas pós alimentação. O pH médio foi de 6,26. As quantidades de ácido acético foram significativamente menores nos tratamentos com ionóforos em relação ao tratamento, com valores de 68,8; 66,49 e 64,56 para o tratamento controle, salinomicina e monensina respectivamente. O ácido propiónico, por seu turno, aumentou significativamente de 20,33 no tratamento controle para 22,05 e 24,55 para os tratamentos com salinomicina e virginiamicina, respectivamente. A relação entre o ácido acético e propiónico variou significativamente ($p < 0,05$) de 3,40; 3,08 e 2,74, enquanto as concentrações de ácido butírico não foram alteradas pelos tratamentos variando de 11,45; 10,84 e 10,84 para a dieta controle, salinomicina e virginiamicina, respectivamente.

Dietas constituídas exclusivamente por feno de coast cross (1) sem lasalocida; (2) com 100mg de lasalocida/ animal/ dia, (3) com 200 mg de lasalocida foram fornecidas a três bovinos fistulados com cerca de 500 kg, no delineamento em quadrado latino, por Possenti et al. (2005) para estudar a degradabilidade ruminal in situ e FDN, N- NH_3 e pH ruminal de diferentes níveis de lasolacida sódica. As concentrações médias de N- NH_3 não diferiram entre si e variaram de 10,34; 9,75; 10,31 para os níveis crescentes de lasalocida. Os níveis de pH não foram alterados pelos tratamentos. O feno apresentou valores maiores para os parâmetros da degradação ruminal da MS e FDN. Os autores concluíram que sob as condições em que o experimento foi conduzido, os resultados não permitem recomendar a utilização da lasolacida sódica para bovinos na expectativa de provocar alterações significativas na fermentação ruminal, mas como incremento da degradação potencial da matéria seca e da FDN, na quantidade de 200mg/ animal/ dia.

Netto et al. (2004), estudou o efeito da adição de salinomicina no sal proteinado sobre o desempenho de novilhas em pastejo. 48 novilhas com peso

médio inicial de 320 kg foram divididas em quatro grupos. Cada grupo tinha permanente acesso ao sal proteinado com apenas uma das seguintes doses de salinomicina: 0; 0,1; 0,2 e 0,3 mg/kg de PV. Cada grupo permaneceu em piquete com 6,8 hectares de pastagem *Brachiaria decumbens* provido de bebedouro e cocho coberto. Os animais foram rodados semanalmente pelos piquetes. O consumo de sal foi calculado pela diferença da quantidade de sal oferecida no início de cada semana e as sobras no cocho antes do rodízio e dividido pelo número total de dias. Os animais foram pesados mensalmente. Uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no consumo de sal proteinado foi observada com o aumento da dose de salinomicina no sal proteinado. Os animais consumiram 334,9; 321,54; 317,42 e 321,72 g/animal/dia de sal proteinado com 0; 0,1; 0,2 e 0,3 mg de salinomicina/kg de peso vivo, respectivamente. O melhor desempenho foi apresentado pelos animais do tratamento 4.

2.5. Técnicas usadas na avaliação dos ionóforos

O uso de aditivos, afeta de algum modo o crescimento microbiano e como consequência, a digestão da fibra. A adição de ionóforos pode melhorar a digestão da celulose em dietas ricas em carboidratos prontamente solúveis pela inibição de bactérias produtoras de lactato diminuindo desse modo as concentrações de lactato e elevando o pH. O preenchimento ruminal e a taxa de passagem são também influenciados. Porém, são necessárias pesquisas para determinar se as respostas do animal aos ionóforos resultam de efeitos no rúmen ou no trato digestivo posterior (Varga e Kolver, 1997). Em forragens de baixa qualidade, acima de 80% da digestão da fibra ocorre no rúmen. Valores da digestão no rúmen e no trato total dependem da dieta consumida e do nível de ingestão e, em dietas basicamente constituídas por forragem, a digestão ruminal é quase igual à digestão no trato total (Titgemeyer, 1997). Na impossibilidade de usar animais fistulados nos diversos compartimentos do trato gastrointestinal, o uso de técnicas de digestibilidade aparente *in vivo*, com a limitante de não levar em conta os fatores que limitam o consumo e a técnica *in vitro* de produção de gases, usando

fezes como inoculo são técnicas promissoras. A degradação in situ continuará a ser usada sempre que possível para comparar os dados obtidos in vitro com os obtidos in situ.

A degradação de alimentos fibrosos pelos ruminantes começa principalmente pela ação da fermentação microbiana no retículo – rúmen. A digestão microbiana também referida como degradação pode ser medida por meio da técnica in situ e pela técnica in vitro de Menke de produção de gases.

Na técnica in situ, as amostras contidas nos sacos de náilon são incubadas no rúmen por vários períodos de tempo, e as perdas por degradação são determinadas para cada período de tempo de incubação. O tamanho dos poros do tecido com que são confeccionados os sacos permite que os microrganismos entrem e colonizem o material alimentar contido nos sacos. Assume-se que as perdas de material nos sacos são causadas pela degradação microbiana da amostra nele contida.

A técnica de sacos de náilon permite classificar os alimentos de acordo com a taxa e extensão da degradação de MS, MO, N ou outros parâmetros nutricionais. A técnica in situ pode ser usada também, para medir os efeitos de diferentes ambientes ruminais mediante a incubação da mesma forragem em diferentes ambientes ruminais resultante de diferenças na dieta consumida por estes animais (HOVEL, 1997).

O que limita a implementação rotineira desta técnica é o fato de ser trabalhosa e precisar muito tempo para a obtenção de resultados. Outra limitação é a baixa repetibilidade e dificuldade de padronização (Huntington, 1988).

Outro grande problema está ligado ao princípio da técnica que descreve a degradação ruminal (hidrólise e fermentação) das forragens e suplementos in situ, em termos de cinética de primeira ordem e gera parâmetros que podem combinar numericamente com a taxa de passagem constante para estimar a extensão da degradação ruminal (Orskov e McDonald, 1979). O que está inerente nesta abordagem é que todos os alimentos solúveis são fermentáveis, e este pressuposto não é universalmente válido. Forragens submetidas ao processo de aquecimento contêm produtos maillard que apesar de serem solúveis têm baixa

aquecimento contêm produtos maillard que apesar de serem solúveis têm baixa fermentabilidade. Contudo, essa limitação pode ser superada pelo uso de técnicas que, em vez de medir o desaparecimento do alimento no rúmen, meçam a quantidade de produtos da fermentação, como o CO_2 e CH_4 (France et al., 1993).

A técnica *in vitro* de produção de gases foi desenvolvida para estimar a fermentação dos alimentos para ruminantes. Nesta técnica, o alimento é incubado com o fluido ruminal tamponado e o gás produzido é medido e serve como indicador da cinética da fermentação. O alimento incubado no fluido ruminal tamponado sofre degradação e a fração degradada pode ser fermentada e produzir gás e ácidos da fermentação ou ser incorporada na biomassa microbiana.

Quando as técnicas de produção de gases são combinadas com as estimativas de degradação, fornecem uma estimativa da proporção do alimento que é fermentado em relação ao que é incorporado no crescimento microbiano (Rymer et al., 2005).

A produção *in vitro* de gás está relacionada somente com a fermentação no rúmen e não com a digestibilidade que ocorre no trato digestivo total, a qual inclui também a digestão enzimática e absorção e fermentação nos intestinos. A fermentação ruminal resulta principalmente da atividade de bactérias, protozoários e fungos que habitam o rúmen (Williams, 2000).

A energia para o crescimento dos microrganismos no rúmen resulta da fermentação dos carboidratos, particularmente o amido e fibras, que são hidrolisados no rúmen dando origem a pentoses e hexoses, os quais são posteriormente catabolizados para produzir piruvato que é metabolizado dando origem à formação de ácidos orgânicos, de AGVs e de gases (CO_2 , CH_4 e H_2) e pode suprir também esqueletos de carbono para a síntese de biomassa microbiana. Os gases que são produzidos durante a formação de AGVs e os que são provenientes do efeito tampão do bicarbonato no rúmen são perdidos por eructação para a atmosfera. É esse tipo de gás que é mensurado na técnica *in vitro*. As reações estequiométricas da fermentação das hexoses são as seguintes:

A formação do ácido propiônico é a única reação que requiere a captação de hidrogênio. Qualquer sobra de H é convertida no rúmen em metano, pelas bactérias metanogênicas. A produção de propionato não envolve a geração de CO₂. Por isso para comparar os dados de produção de gás entre diferentes forragens é também importante avaliar as diferenças na relação acetato:propionato nos produtos finais da fermentação.

A produção in vitro de gases, pode ser influenciada por vários fatores (Rymer et al., 2005), dentre os quais destacamos os relacionados ao inóculo, nomeadamente: concentração do inóculo, horário da amostragem, alimentação do doador, fontes de inóculo e preparação do inóculo.

Na preparação do inóculo é importante misturar a fase sólida e líquida do conteúdo ruminal para garantir que a maioria das bactérias celulolíticas que estão aderidas às partículas dos alimentos e as oportunistas e não especializadas que se encontram na fase líquida, sejam representadas (Rymer et al., 1999). A contribuição dos microrganismos associados com a parte sólida é vital, sobretudo no estudo da degradação de forragens com teor elevado de parede celular. Contudo, não existem recomendações claras sobre o relação ótima entre a fase sólida e a líquida para a preparação do inóculo (Bueno et al., 1999).

Segundo Rymer et al. (2005), não existe consenso entre os vários autores sobre o efeito da concentração do inoculo e do horário de colheita no volume do gás produzido e na taxa da sua produção. Contudo, a recomendação de Menke e Steingass (1988) de colher o líquido ruminal justamente antes de fornecer a refeição matinal continua válida por reduzir a variação na composição e atividade do inóculo.

O efeito da dieta consumida pelo animal doador do inóculo, parece ter um efeito muito reduzido na produção de gás. Isso permite que a partir de um animal doador se possa avaliar vários alimentos diferentes (Rymer et al., 2005).

Várias pesquisas foram feitas e têm sido feitas para encontrar uma fonte de inóculo alternativa ao líquido ruminal. O principal objetivo dessas pesquisas é encontrar técnicas que dispensem o uso de animais fistulados e encontrar um inóculo mais padronizado do que é possível com o líquido ruminal que é muito variável (Rymer, 2005). Existem várias alternativas ao líquido ruminal que vão desde efluentes de cultura contínua in vitro; enzimas livres de células; culturas bacterianas e fezes.

As fezes têm um potencial de utilização muito grande, embora a sua população microbiana seja diferente da do fluido ruminal. A população microbiana nas fezes resulta de microrganismos que já passaram pela digestão gástrica e tem contribuição da flora do cecum. Geralmente a taxa de produção de gases é menor com o inóculo de fezes comparado com o fluido ruminal (Maurício et al., 1998^a, 1998b, 2001; Cone et al., 2002), o que torna difícil a estimativa dos parâmetros da produção de gases. Se a dieta do doador for muito fibrosa, de tal modo que a atividade microbiana no rúmen se torna baixa, as diferenças entre fluido ruminal e fezes é bem menor (Maurício et al., 1999c). Mas, para a caracterização de alimentos que serão fornecidos a animais altamente produtivos, tais inóculos terão um valor limitado. Apesar disso, existem meios matemáticos para ajustar os valores de produção de gases do inóculo fecal para os que seriam produzidos pelo inóculo ruminal (Dhanoa et al., 2004).

A digestão no rúmen depende da atividade dos microrganismos, os quais precisam de energia (ATP), N (amônia, peptídeos, aminoácidos), minerais e um meio com pH entre 6 - 6,5.

Muitas bactérias celulolíticas precisam de amônia (NH₃) como fonte de N para a incorporação na célula protéica. A amônia é suprida pela desaminação do alimento e proteína endógena ou pela degradação de NNP dietético e endógeno como a uréia. Os níveis de N - amoniacal para máxima atividade microbiana oscila entre 5 - 28 mg N / litro, e varia com as exigências diferentes para o crescimento e

fermentação microbiana, diferentes vias de incorporação de N - amoniacal e tipo de substrato (Givens e Moss, 1995). As bactérias fermentadoras de fibra utilizam amônia como única fonte de N. Concentrações baixas de amônia no rúmen reduzem o desaparecimento da fibra e reduzem a taxa de passagem e diminuem o consumo da matéria seca (Tedeschi et al., 2000).

3. Material e métodos

3.1. Local, Animais e Dietas

Os experimentos de digestibilidade aparente e degradabilidade in situ foram conduzidos na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga durante o período de Agosto a Dezembro de 2004. Foram utilizados 4 novilhos da raça Holandesa, castrados com peso médio inicial de 350 ± 43 kg. Antes do início do experimento, os animais foram vermifugados e tratados contra carrapatos. Os animais foram confinados em baias individuais cobertas, com piso de cimento, dotadas de comedouros e bebedouros individuais.

Os animais foram distribuídos em quadrado latino constituído por 4 níveis de salinomicina e 4 períodos. Cada período teve a duração de 31 dias, 21 para a adaptação e 10 dias para a colheita de amostras.

A dieta dos animais foi constituída por feno de capim *coast cross* (*Cynodon dactylon*) e sal proteinado contendo doses crescentes de salinomicina.

A salinomicina foi fornecida via sal proteinado. As fórmulas usadas para o sal, nos diversos tratamentos, e a sua composição química são apresentadas na tabela 1 e 2, respectivamente. Quantidades de sal equivalentes a 0,1% de peso vivo do animal foram fornecidas individualmente e diariamente ao animal antes de se colocar o feno no cocho para garantir que a quantidade de salinomicina desejada fosse consumida.

Tabela 1 – Proporção dos ingredientes nos sais proteinados com diferentes níveis de salinomicina, na base natural

Itens	Nível de salinomicina (mg/ kg de peso vivo)			
	0	0,1	0,2	0,3 ✓
Farelo de algodão	57,80	57,72	57,64	57,56
Sal branco	25,00	25,00	25,00	25,00
Uréia	10,00	10,00	10,00	10,00
Enxofre	0,20	0,20	0,20	0,20
Mistura mineral	7,00	7,00	7,00	7,00
SALOCIN (Produto comercial contendo salinomicina)	0	0,08	0,16	0,24

Segundo especificações do fabricante, cada 100g do produto SALOCIN contém 12 g de princípio ativo por isso para obter os níveis 0,1, 0,2 e 0,3 foram adicionadas as seguintes quantidades: 0,079; 0,157 e 0,236 kg de salocin por cada 100 kg de suplemento. Isso foi definido tomando em conta que o consumo do suplemento estaria por volta de 1g por kg de peso vivo.

0,4 mg/kg

Os tratamentos consistiram em níveis diferentes de salinomicina por kg de peso vivo por dia.

Tratamento 1: zero mg de salinomicina/kg de PV

Tratamento 2: 0,1 mg de salinomicina/kg de PV

Tratamento 3: 0,2 mg de salinomicina/kg de PV

Tratamento 4: 0,3 mg de salinomicina/kg de PV

Tabela 2 - Teores médios de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), lignina e carboidratos totais (CHT) dos sais proteinados e do feno.

Itens	Feno	Nível de salinomicina (mg/ kg de peso vivo)			
		0	0,1	0,2	0,3
C/O					
MS (% da matéria natural)	92	89,65	90,46	89,62	89,99
MO	85,65	48,9	50,11	49,57	48,32
PB	4,26	55,73	54,87	56,33	55,23
EE	6,35	0,84	0,86	0,87	0,87
FDN	83,59	17,78	17,27	17,61	17,62
FDA	46,16	11,53	9,98	10,71	17,62
LIGNINA	6,75	4,36	3,91	5,48	4,19

3.2. Determinação do consumo de feno

No início de cada período, cada animal recebeu diariamente, feno equivalente a 4% do seu peso vivo. O consumo diário de matéria seca do feno foi determinado pela diferença entre a quantidade de feno oferecido e a quantidade

de sobras. Na última semana do período foi fornecida a quantidade calculada de modo a não sobrar feno no cocho e não possibilitar a sua seleção pelos animais. As amostras do feno e do sal foram colhidas diariamente no período da coleta de dados. As amostras diárias foram misturadas de modo a formar uma amostra única de feno e de cada um dos tipos de sal proteinado, por período. Depois de secas em estufa a 65C com ventilação forçada, durante 72 horas, as amostras foram moídas a 1mm para posteriores análises.

3.3. Determinação da digestibilidade aparente

A produção fecal foi obtida pelo método descrito por Valadares Filho et al. (2002). Dez gramas de óxido crômico foram fornecidos uma vez ao dia diretamente no rúmen, via cânula, durante 5 dias antes do início das coletas e durante o período das coletas, que duraram 5 dias. A colheita de amostras de fezes foi realizada uma vez ao dia em intervalos de 26 horas. As amostras de fezes colhidas diretamente no reto foram imediatamente congeladas e no final do período foram reunidas em uma amostra composta por animal, tratamento e período. No final dos quatro períodos as amostras de fezes foram descongeladas à temperatura ambiente e secas em estufa de ventilação forçada a 65C. Em seguida foram moídas e submetidas à análise de cromo e à análise de fibra em detergente neutro. Uma subamostra foi colocada na estufa de ventilação forçada a 105C e a matéria seca obtida foi usada para corrigir a matéria seca original. 1 grama de cada amostra foi colocada em recipiente apropriado para análise por fluorescência de raios X (cubeta de plástico com fundo de Mylar de 6,3 micrometros de espessura), prensada a 2 ton/cm² e

levada diretamente para análise, sem passar por nenhum tipo de pré-tratamento químico.

A quantificação da concentração dos elementos químicos foi realizada através da técnica analítica denominada fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF, *energy dispersive X-ray fluorescence*), em equipamento disponível no Laboratório de Instrumentação Nuclear, da Divisão de Desenvolvimento de Métodos e Técnicas Analíticas e Nucleares, do CENA/USP (Nascimento Filho, 1999).

A excitação foi feita com raios X Mo-K α de 17,44 keV, provenientes de um tubo de raios X com alvo de Mo e filtro de Zr, operado a 25 kV e 10 mA, possibilitando a detecção do elemento químico Cr pelo seu raio X característico K α . As amostras foram excitadas por 100 segundos, sendo o raio X detectado por um espectrômetro multicanal, baseado em detector semicondutor de Si(Li) e eletrônica nuclear convencional.

A concentração do elemento Cr foi estimada através da intensidade do raio X característico, levando-se em conta o efeito matriz. A validação da metodologia foi realizada analisando-se uma amostra de referência certificada (*hay powder*, V-10) produzida pela Agência Internacional de Energia Atômica, Viena.

As amostras dos alimentos e fezes foram submetidas às análises de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB) e estrato etéreo (EE), segundo o AOAC (1990), e a fibra em detergente neutro, segundo (Van Soest, 1991).

O valor da excreção fecal foi obtido pela fórmula descrita por Smith e Reid (1955):

Excreção fecal (g/dia) = gramas de óxido crômico ingerido / concentração de óxido crômico nas fezes

Os coeficientes de digestibilidade total aparente foram obtidos pela diferença entre a quantidade de alimento ingerido e a produção fecal, segundo a fórmula de Silva & Leão (1979):

Coeficiente de digestibilidade da MS = $100 * [(MS \text{ ingerida} - MS \text{ fecal}) / MS \text{ ingerida}]$

Estudo da degradação in situ

Para a determinação da degradabilidade potencial da matéria seca do feno de coast cross e do sal proteinado, foi adotada a técnica in situ, proposta por Orskov e McDonald (1979), modificada por McDonald (1981).

O feno foi moído em moinho com peneira de 5 mm. Uma amostra de cerca de 6 g de matéria seca (65C) do feno foi colocada em sacos de náilon da marca Ankom Technologic, medindo 10cm x 20cm e com uma abertura de malha de 50µm a fim de manter uma relação de 20 mg de MS/cm² da área da superfície do saco. Todos os saquinhos foram inseridos no rúmen de uma só vez, via fístula ruminal e retirados seqüencialmente após 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas de incubação das amostras de feno e 3, 6, 12, 24 e 48 horas após a incubação das amostras do sal proteinado. Os sacos retirados do rúmen foram imediatamente colocados em balde com água corrente fria e lavados até o clareamento da água. Os sacos referentes ao tempo zero, não foram incubados no rúmen, mas imersos em balde com água corrente a 39C por cerca de 10 minutos e depois foram lavados do modo descrito para os restantes tempos de incubação. Depois da lavagem, os sacos com as amostras foram secos em estufa com circulação forçada de ar, a

65C por 72 horas. Retirados da estufa foram colocados em dessecador e depois pesados. Os valores de MS antes da incubação e depois da incubação foram usados para calcular o desaparecimento da MS. Os dados de desaparecimento foram usados para calcular a degradabilidade in situ.

3.4.1. Cálculo da degradabilidade in situ

Para descrever a cinética da degradação da matéria seca do feno, foi usado o modelo exponencial de Orskov e McDonald (1979), modificado por McDonald (1981):

$$DP = A; \quad t \leq L$$

$$DP = a + b(1 - e^{(-c \cdot t)}); \quad t > L$$

Onde:

DP = degradabilidade potencial no tempo "t"

→ a = fração imediatamente solúvel ~~em água~~

b = material insolúvel ~~em água~~ potencialmente degradável

c = taxa de degradação da fração b (%h⁻¹)

A = fração que se perde durante a lavagem

Os parâmetros do modelo de Orskov e McDonald (1979) foram estimados por ajuste de curvas de degradação, mediante um procedimento de quadrados mínimos, utilizando-se o programa Fcurve 6 (Chen, 1997). Com base nos parâmetros matemáticos, a, b e c, definidos nesse modelo, foram calculados os seguintes parâmetros biológicos:

(1) Degradabilidade potencial:

$$DP = a + b$$

(2) Fração insolúvel na água potencialmente degradável:

$$B = (a+b) - A$$

(3) Fração não degradável:

$$I = 100 - (a+b)$$

(5) Degradabilidade efetiva :

$$DE = a + [(b * c) / (c + K)]$$

Em que k representa a taxa de passagem das partículas do rúmen. Para calcular a degradabilidade efetiva foram usadas as taxas de passagem de 2% por hora, que correspondem à taxa de passagem no rúmen em animais com baixo consumo e em manutenção.

3.5. Medição do pH e NH_3

Por meio de uma bomba de vácuo colocada no rúmen por intermédio da fistula ruminal, efetuou-se a coleta de amostras de cerca de 250 ml de líquido ruminal. O pH do líquido ruminal foi determinado imediatamente na hora da colheita, com um potenciômetro digital. O material coletado foi filtrado em tecido de gaze duplo e foi retirada uma amostra de 2 ml que foi colocada em frascos de vidro escuro com tampa de polietileno contendo 1 ml de ácido sulfúrico 1N. Em seguida os frascos foram armazenados a -15°C para posterior determinação das concentrações de N-amoniaco. A análise de N - amoniacal foi realizada no laboratório da ESALQ (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo). Para determinação de amônia ruminal, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e centrifugadas a 11.000 g (4°C), durante 30 minutos. Uma alíquota de 40 ml foi transferida para tubo de ensaio para determinação de amônia em duplicatas pelo método de Chaney & Marbach (1962) adaptado leitura em Leitor de Microplaca (BIO-RAD, Hercules, CA, EUA) utilizando-se filtro para absorvância de 550 nm. Foram utilizados como padrões soluções de 0; 1; 2; 4; 8; 16; e 32 mg/dL de amônia. A alíquota de 40ml de

ml

amostra ou padrão foi incubada em banho-maria a 37 °C por 10 minutos, juntamente com 2,5 mL de reagente fenol e 2,0 mL de reagente hipoclorito. Decorrido o período, as amostras foram pipetadas em microplaca para leitura. Somente foram aceitos resultados provenientes de placas com $r^2 = 0,99$ e coeficiente de variação entre duplicatas menor que 5%.

3.6. Degradação da MS, taxas de produção de gases e fermentação pela técnica in vitro de produção de gases.

Para estudar o efeito da salinomicina na produção de gases in vitro, foram feitas duas corridas. Em cada corrida 4 inóculos de líquido ruminal e 4 inóculos de fezes e 4 substratos foram usados. Amostras moídas a 1 mm de feno de *cost cross* e sal proteinado, foram misturadas na proporção representativa da consumida pelos animais experimentais. Desse modo, 4 amostras de 1 kg de feno moído misturado com cerca de 0,05 kg de sal proteinado com 4 níveis de salinomicina foram misturadas e designadas por:

dieta 1: feno + sal proteinado sem salinomicina

dieta 2: feno + sal proteinado e 0,1 mg de salinomicina / kg de PV

dieta 3: feno + sal proteinado e 0,2 de salinomicina / kg de PV

dieta 4: feno + 0,3 de salinomicina / kg de PV.

Depois de homogenizadas, foi retirada, de cada uma delas, uma amostra de 1 grama para formar o substrato correspondente.

Os perfis para a produção acumulada de gases foram gerados usando a metodologia de Theodorou et al., (1994) modificada por Maurício et al. (1999) com um transdutor de pressão e *data logger* (PDL200, LANA/ CENA – USP, Piracicaba/ SP, Brasil). Nas duas corridas, um grama de amostra foi colocado em frascos de fermentação com a capacidade de 160 ml, previamente injetados com CO₂. Em cada frasco, foram adicionados 90 ml de solução tampão (meio de cultura). Os frascos foram vedados com rolhas de borracha e selados com anéis

Nas
correspond
ao que
foi feito.

de alumínio. Para evitar que ocorresse qualquer tipo de fermentação, os frascos foram mantidos a 4C durante a noite. Cinco horas antes da inoculação, os frascos foram removidos da geladeira para a estufa a 39C até o momento da inoculação. A inoculação foi feita através da injeção de 10 ml de inóculo por frasco usando uma seringa plástica conectada a uma agulha (0,6 mm). A pressão originada pelos gases acumulados na parte superior dos frascos foi medida por meio de um transdutor de pressão conectado em sua extremidade a uma agulha (0,6 mm). As leituras foram feitas 3, 6, 10, 14, 23, 29, 35, 48, 60, 72 e 96 horas após a inoculação e a quantidade de gás foi estimada de acordo com a fórmula: $V = 0,112ap^2 + 4.1098p$ (Machado et al., 1998), onde V é o volume do gás (ml) e p é a pressão medida (psi = pressão por polegada quadrada).

A degradabilidade da MS no ponto final (96h) foi também determinada pela recuperação da fração não digerida depois da incubação, pela filtração da matéria remanescente usando cadinhos com porosidade de 100 a 160 μ m. Esse resíduo foi seco por 48 horas a 100C e pesado. Brancos e um padrão interno foram incluídos para permitir os ajustes na variação entre as corridas. Brancos foram usados para cada inóculo para medir a fração da produção total de gás devido ao substrato no inóculo. Esses valores foram subtraídos do total para obter produção líquida de gases (isto é, a produção de gás devido à fermentação do substrato). O feno de Tifton – 85 foi usado como alimento padrão para determinar a variação entre as corridas.

Os inóculos foram preparados a partir de líquido ruminal e fezes colhidas em oito novilhos fistulados, mantidos em dietas de feno e sal proteinado com vários níveis de salinomicina, antes do fornecimento matinal do feno e do sal proteinado cerca de 300 ml de fase sólida do conteúdo ruminal e 300 ml da fase líquida e 300 ml de fezes foram colhidos em cada animal. A fase sólida do rúmen foi colhida manualmente no saco dorsal do rúmen através da fístula. A fase líquida foi colhida no saco ventral por meio de uma bomba de vácuo acoplada a um kitassato. A fase líquida foi armazenada em garrafas térmicas, pré-aquecidas a 40C preenchidas até ao topo para não deixar espaço para ar. A fase sólida e as

fezes foram armazenadas em sacos plásticos, retirando-se o ar antes de fechá-los e colocados em caixa térmica pré-aquecida a 40C.

No laboratório, volumes iguais de fase sólida e líquida foram misturados no liquidificador por 10s. Depois da mistura, o fluido ruminal foi filtrado em duas camadas de gaze e conservado em banho Maria a 39C com saturação de CO₂ até a inoculação. Uma amostra de cada inóculo final foi coletada para determinar o seu teor de MS e pH.

3.7. I. Determinação dos Parâmetros

Foi utilizado o modelo $Y = A \{ 1 - \exp [-b(t-L) - c \cdot \text{raiz } t - \text{raiz } L] \}$ (equação 1) de France et al. (1993), onde Y = produção acumulada de gases (ml), A = assíntota ou potencial máximo de produção de gases, L = tempo de colonização, b (h⁻¹) e c (h^{-0,5}) = taxas fracionais constantes. A taxa fracional (h⁻¹) combinada com a produção de gases (μ) foi calculada como sendo $\mu = b + c / 2 \text{ raiz de } t$ (equação 2) onde μ = taxa de produção de gases (h⁻¹), b e c = parâmetros semelhantes aos da equação (1), t = tempo de inoculação (h).

A análise estatística dos dados foi feita no programa SAEG (2001). Onde não houve interação, os fatores substrato e inóculo foram estudados isoladamente. O inóculo foi submetido ao teste de médias de Tukey e os valores do substrato ao teste de regressão. Onde a interação foi significativa fez-se o desdobramento da interação substrato* inóculo para estudar o efeito do comportamento do inóculo dentro da cada dosagem de salinomicina. As variáveis independentes com menos de 10% de significância e as equações que apresentaram coeficiente de determinação menor que 50% ($R^2 < 0,50$), foram eliminadas.

Para os experimentos de degradabilidade in situ e digestibilidade aparente, foi usado um delineamento em quadrado latino 4x4 (4 animais e 4 períodos) e 4 tratamentos correspondentes aos níveis de zero; 01; 02 e 0,3 mg de salinomicina

por kg de peso vivo. No ensaio de produção in vitro de gases, foi usado o modelo em blocos casualidade. Os resultados foram submetidos à análise de variância e regressão, adotando-se o nível de 5% de probabilidade. Os modelos foram selecionados com base nos coeficientes de determinação e na significância dos coeficientes de regressão, adotando-se o nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o teste F. As equações de regressão para o desaparecimento da matéria seca foram estimadas no programa SAEG – Sistema de Análises Estatísticas e Genética, (versão 9).

As variáveis foram analisadas segundo o modelo matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + A_j + P_k + e_{ijk}$$

Y_{ijk} = variável dependente (consumo, digestibilidade aparente ou degradação da MS) referente ao animal j;

μ = média geral;

T_i = efeito do tratamento ($i = 1$ a 4)

A_j = efeito do animal ($j = 1$ a 4);

P_k = efeito do período ($k = 1$ a 4);

e_{ijk} = erro aleatório associado à cada observação

O modelo matemático para o ensaio vitro da produção de gases foi:

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + T_i + P_k + S_i * I_j + e_{ijk}$$

Onde,

Y_{ijk} = os parâmetros da digestão local

μ = média geral

S_i = efeito do substrato (dietas

I_j = efeito do inoculo ($j = 1$ a 4)

$S_i * I_j$ = efeito da interação substrato*inoculo

E_k = efeito do período ou corrida

E_{ijk} = resíduo

4. RESULTADOS

e Discussão

4.1. Consumo e digestibilidade aparente

Os consumos totais médios de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN) do feno e sal proteinado em kilogramas por dia (kg/dia), % de peso vivo (% PV) e respectivos coeficientes de variação são apresentados nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

Nenhum dos parâmetros medidos foi influenciado pela salinomicina. Provavelmente outros fatores não ligados à capacidade fermentativa da microflora ruminal, interferiram no consumo de matéria seca e de outros nutrientes. Segundo Jung e Allen (1995), a capacidade de enchimento do rúmen pela fibra limita o

Tabela 3 - Consumos médios e coeficientes de variação (CV%) de matéria seca de sal (CMSsal), feno (CMSfeno) e consumos totais médios de matéria seca (CTMS), matéria orgânica (CTMO), proteína bruta (CTPB), fibra em detergente neutro (CTFDN) de novilhos alimentados com feno de coast cross e sal proteinado com vários níveis de salinomicina

item	Níveis de salinomicina mg/ Kg de peso vivo				CV(%)
	0	0,1	0,2	0,3	
CMSsal	0,459	0,424	0,457	0,457	16,60
CMSfeno	6,87	5,21	6,09	6,13	13,50
CTMS	7,33	6,52	6,58	6,59	13,41
CTMO	6,09	6,13	6,13	7,32	13,44
CTPB	0,58	0,50	0,51	0,51	13,86
CTFDN	5,82	5,17	5,20	5,21	13,48

Os valores de digestibilidade aparente da matéria seca e de todos os nutrientes avaliados também, não diferiram entre os tratamentos. Os valores observados para a digestibilidade aparente são maiores do que os retratados para o capim coast cross noutros trabalho. Itavo et al. (2002), forneceu uma dieta exclusiva de capim coast cross com 7,7% de PB, a cinco novilhos Nelore, e encontrou valores de digestibilidade aparente de cerca de 53%, 45%, 63% para a MS, PB e FDN, respectivamente. É possível que no nosso experimento a presença de sal proteinado tenha contribuído para o aumento do valor da digestibilidade aparente total. Note-se que a degradação da MS do sal proteinado (figura 3), foi muito rápida em relação à do feno de tal modo que após 24 horas cerca de 82% do sal (figura 3) já tinha passado pelo rúmen. Entretanto, apenas 50% da MS do feno tinha sido degradada (figura 1).

Os valores de digestibilidade aparente da matéria seca e de todos os nutrientes avaliados também, não diferiram entre os tratamentos. Os valores observados para a digestibilidade aparente são maiores do que os retratados para o capim coast cross noutros trabalho. Itavo et al. (2002), forneceu uma dieta exclusiva de capim coast cross com 7,7% de PB, a cinco novilhos Nelore, e encontrou valores de digestibilidade aparente de cerca de 53%, 45%, 63% para a MS, PB e FDN, respectivamente. É possível que no nosso experimento a presença de sal proteinado tenha contribuído para o aumento do valor da digestibilidade aparente total. Note-se que a degradação da MS do sal proteinado (figura 3), foi muito rápida em relação à do feno de tal modo que após 24 horas cerca de 82% do sal (figura 3) já tinha passado pelo rúmen. Entretanto, no mesmo período de tempo, apenas 50% da MS do feno tinha sido degradada (figura 1).

repetido

Tabela 4- Consumos médios e coeficientes de variação de matéria seca de sal (CMSsal) e feno (CMSfeno) em porcentagem do peso vivo e coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca (DMS) e matéria orgânica (DMO), proteína bruta (DPB), fibra em detergente neutro (DFDN), carboidratos totais de novilhos alimentados com feno de coast cross e sal proteinado com vários níveis de salinomicina (% da MS)

Item	Níveis de salinomicina mg/ Kg de peso vivo				CV(%)
	0	0,1	0,2	0,3	
CMSsal	0,10	0,10	0,10	0,10	0
CMSfeno	1,82	1,73	1,60	1,63	12,53
DAMS	81,79	80,32	80,32	80,49	3,70
DAMO	81,15	81,04	79,44	79,56	4,04
DAFDN	83,16	82,88	81,69	81,55	3,78
DAPB	84,12	83,69	82,70	82,83	3,06

4.2. Parâmetros da degradabilidade in situ

Os parâmetros do modelo de Orskov & McDonald (1979) para a degradação in situ da matéria seca do feno de coast cross incubado em novilhos alimentados pelo mesmo feno e sal proteinado com vários níveis de salinomicina são apresentados nas Tabelas 5, 6, 7, 8, para a MS e FDN do feno e para a MS e PB dos sais proteinados, respectivamente. O ajuste dos dados pelo modelo de Orskov e McDonald (1979) foi satisfatório para as quatro dietas ($R^2 > 0,88$).

Os perfis da cinética de degradação in situ da MS e da FDN do feno coast cross da MS e PB dos sais proteinados incubados em novilhos alimentados com o feno e sal proteinado com 0, 0,1, 0,2 e 0,3 mg de salinomicina por kg de PV ajustados pelo modelo de Orskov & McDonald (1979), são apresentados na figura 1, 2, 3 e 4.

Os parâmetros da degradação in situ, não foram influenciados pelo nível de salinomicina na dieta. Os resultados são semelhantes aos obtidos por Ortolan, (2005), usando salinomicina em dietas constituídas por silagem de sorgo e concentrado e aos observados por Possenti et al., (2005), com dietas constituídas exclusivamente por feno de coast cross suplementadas com lasolacida. *por quê?*

No presente experimento, a fração indigestível do feno (Tabela 5) e da fibra em detergente neutro (Tabela 6) nos tratamentos variou de 34,30% a 37,51% e de 43% a 49% respectivamente. Isso quer dizer que a partida qualquer resposta à manipulação no rúmen vai ser limitada por esta fração. Ainda assim, nas condições do meio ruminal proporcionado pela alimentação de feno de coast cross e sal proteinado na presença ou ausência de salinomicina a degradabilidade efetiva da fibra do feno foi similar àquela calculada para a mesma taxa de passagem das partículas no rúmen de 2% /hora, em dietas exclusivamente constituídas por feno. Ítavo et al. (2000) encontrou ^{rum} valores de 49,72 e 45,77 para a degradabilidade efetiva da MS e da FDN do feno de coast cross, respectivamente, incubado em animais consumindo exclusivamente feno de coast cross.

Contudo, as taxas de passagem estimadas neste estudo (Tabela 5 e 6) foram maiores que as observadas no estudo de Ítavo et al. (2000). ^{estes autores} Este autor encontrou ^{rum} valores de 3,2%/h e 3,8%/h para as taxas de passagem da MS e FDN, respectivamente.

No contexto do presente estudo, as diferenças mais nítidas entre as taxas de passagem são observadas entre a taxa de passagem da FDN do feno e a PB do sal proteinado. Os valores da taxa de passagem da FDN variaram de 5% a 6% por hora e a da PB de 7% a 8% por hora (Tabelas 6 e 8). Ao observar as curvas da cinética do feno e do sal nota-se a grande diferença na velocidade com que ocorre a degradação desses alimentos. Este é um aspecto que deve ser explorado para melhorar a sincronização entre a energia contida na fibra e a proteína suprida pelo sal proteinado.

Tabela 5 - Valores médios estimados das frações solúvel em água (a), insolúvel em água, mas potencialmente degradável no rúmen (b), taxas de degradação da fração insolúvel potencialmente degradável no rúmen (c), fração indegradável (i), degradação potencial e efetiva da matéria seca do feno de capim coast-cross, incubado em novilhos alimentados pelo mesmo tipo de feno e sal proteinado contendo vários níveis de salinomicina (%).

Parâmetros	Níveis de salinomicina mg/ Kg de peso vivo				CV(%)
	0	0,1	0,2	0,3	
Matemáticos					
a	15,75	7,23	17,78	9,53	21,52 ✓
b	49,95	57,58	44,71	54,29	8,22
C	0,05	0,07	0,05	0,07	16,53
Biológicos					
A	0,27	0,27	0,27	0,27	0 ✓
B	65,43	64,55	62,22	63,58	4,02
I	34,30	35,18	37,51	36,15	4,02
DP	65,72	64,80	62,53	63,83	3,97
DE (k= 2%h ⁻¹)	52,00	51,25	49,40	51,38	5,08

a e b: constantes do modelo Orskov e MacDonald (1979);

A: fração imediatamente solúvel (%);

B: fração insolúvel potencialmente fermentável (%);

DP = A+B = degradabilidade potencial (%);

c: taxa de degradação da fração B (h⁻¹);

DE: degradabilidade efetiva (%);

K: taxa de passagem no rúmen da fração sólida do conteúdo ruminal.

Tabela 6 - Valores médios estimados das frações solúvel em água (a), insolúvel em água mas potencialmente degradável no rúmen (b), taxas de degradação da fração insolúvel potencialmente degradável no rúmen (c), fração indegradável (i), degradação potencial e efetiva da fibra em detergente neutro do feno coast-cross, incubado em novilhos alimentados pelo mesmo tipo de feno e sal proteinado contendo vários níveis de salinomicina (%).

Parâmetros	Níveis de salinomicina mg/ Kg de peso vivo				CV(%)
	0	0,1	0,2	0,3	
Matemáticos					
a	11,05 ^a	3,59 ^b	3,32 ^b	1,92 ^b	47,7
B	56,66	55,84	55,65	50,42	5,08
C	0,06	0,06	0,05	0,05	10,67
Biológicos					
A	0,25	0,25	0,25	0,25	0
B	56,66	55,84	55,65	50,42	5,08
I	43,09	43,91	44,1	49,33	5,08
DP	61,48	59,45	58,73	58,40	2,25
DE (k= 2%h ⁻¹)	46,10	44,88	44,00	43,73	2,22

a e b: constantes do modelo Orskov e MacDonald (1979);

A: fração imediatamente solúvel (%);

B: fração insolúvel potencialmente fermentável (%);

DP = A+B = degradabilidade potencial (%);

c: taxa de degradação da fração B (h⁻¹);

DE: degradabilidade efetiva (%);

K: taxa de passagem no rúmen da fração sólida do conteúdo ruminal.

Tabela 7 - Valores médios estimados das frações solúvel em água (a), insolúvel em água mas potencialmente degradável no rúmen (b), taxas de degradação da fração insolúvel potencialmente degradável no rúmen (c), fração indegradável (i), degradação potencial e efetiva da matéria seca do sal proteinado, incubado em novilhos alimentados por sal proteinado similar ao sal testado e feno de coast cross.

Parâmetros	Níveis de salinomicina mg/ Kg de peso vivo				CV(%)
	0	0,1	0,2	0,3	
Matemáticos					
A	58,77	53,52	53,35	52,99	6,84
B	38,79	35,19	34,44	30,40	10,22
C	0,08	0,07	0,07	0,06	32,24
Biológicos					
A	2,41	2,41	2,41	2,41	0
B	88,28	86,75	85,75	85,40	4,58
I	9,31	10,84	11,84	12,19	4,58
DP	90,68	89,15	85,75	85,40	4,47
DE (k= 2%h ⁻¹)	82,30	81,78	80,60	79,70	2,66

a e b: constantes do modelo Orskov e MacDonald (1979);

A: fração imediatamente solúvel (%);

B: fração insolúvel potencialmente fermentável (%);

DP = A+B = degradabilidade potencial (%);

c: taxa de degradação da fração B (h^{-1});

DE: degradabilidade efetiva (%);

K: taxa de passagem no rúmen da fração sólida do conteúdo ruminal.

Tabela 8- Valores médios estimados das frações solúvel em água (a), insolúvel em água, mas potencialmente degradável no rúmen (b), taxas de degradação da fração insolúvel potencialmente degradável no rúmen (c), fração indegradável (i), degradação potencial e efetiva da proteína bruta do sal proteinado incubado em novilhos alimentados por sal proteinado similar ao sal testado e feno de coast cross.

Parâmetros	Níveis de salinomicina mg/ Kg de peso vivo				CV(%)
	0	0,1	0,2	0,3	
Matemáticos					
a	73,79	73,57	73,13	71,20	7,912
b	28,59	26,59	26,26	25,83	17,48
C	0,09	0,09	0,08	0,07	32,13
Biológicos					
A	0,86	0,86	0,86	0,86	0
B	98,75	98,60	98,48	98,40	2,25
I	0,39	0,54	0,66	0,74	2,25
DP	99,65	99,45	99,35	99,25	0,76
DE (k= 2%h ⁻¹)	94,90	94,65	94,18	94,10	2,40

a e b: constantes do modelo Orskov e MacDonald (1979);

A: fração imediatamente solúvel (%);

B: fração insolúvel potencialmente fermentável (%);

DP = A+B = degradabilidade potencial (%);

c: taxa de degradação da fração B (h^{-1});

DE: degradabilidade efetiva (%);

K: taxa de passagem no rúmen da fração sólida do conteúdo ruminal.

Contaminação microbiana

Figura 1: Perfis da cinética de degradação *in situ* da MS do feno coast cross incubado em novilhos alimentados com o mesmo feno e sal proteinado com 0, 0,1, 0,2 e 0,3 mg de salinomicina por kg de PV ajustados pelo modelo de Orskov & McDonald (1979).

Figura 2: Perfis da cinética de degradação *in situ* da FDN do feno coast cross incubado em novilhos alimentados com o mesmo feno e sal proteinado com 0, 0,1, 0,2 e 0,3 mg de salinomicina por kg de PV ajustados pelo modelo de Orskov & McDonald (1979).

Figura 3: Perfis da cinética de degradação *in situ* da MS dos sais proteinados incubados em novilhos alimentados por feno coast cross com o sal proteinado correspondente a 0, 0,1, 0,2 e 0,3 mg de salinomicina por kg de PV ajustados pelo modelo de Orskov & McDonald (1979).

Figura 4: Perfis da cinética de degradação *in situ* da ~~MS~~ dos sais proteinados incubados em novilhos alimentados por feno de coast cross com o sal proteinado correspondente a 0, 0,1, 0,2 e 0,3 mg de salinomicina por kg de PV ajustados pelo modelo de Orskov & McDonald (1979).

4.3. Produção de gases

A Tabela 9 apresenta os parâmetros da cinética fermentativa dos alimentos incubados com inóculo de líquido ruminal ou fezes provenientes de animais alimentados com dietas similares ao substrato testado.

O efeito do tipo de inóculo (líquido ruminal vs fezes), foi significativo em todos os parâmetros estudados com a exceção da degradação da matéria seca após 96 horas de incubação no rúmen. Portanto, podemos afirmar que as fezes podem substituir o líquido ruminal como fonte de inóculo nos ensaios para a determinação da degradação in vitro da MS após 96 horas de incubação.

O substrato teve efeito significativo ($p < 0,05$) apenas na produção de gases, 48 horas e 72 horas após a incubação. A interação inóculo*substrato ocorreu apenas no período 48 horas após a incubação.

O volume final de gases não foi diferente entre os tratamentos quando o líquido ruminal foi usado como fonte do inóculo. Mas, quando as fezes foram a fonte de inóculo usada na incubação, foi possível identificar diferenças entre os tratamentos. O maior volume final de gases foi observado no tratamento 1. No tratamento 2 volume final foi menor que no primeiro mas a diminuição não foi significativa. A partir do tratamento 3 ocorreu uma diminuição significativa de volume de gases produzidos que se manteve no tratamento 4.

Considerando que o volume de gases produzido representa perdas de energia (Williams, 2000), podemos concluir que a melhor dieta em termos energéticos é a dieta 3, contendo 0,2 mg de salinomicina por kg de peso vivo.

Os valores de volume final de gases e o tempo de colonização observados nas dietas inoculadas com líquido ruminal, são similares aos observados por Bueno (2002) e menores do que os obtidos por Castro et al. (2005). Os valores médios observados por Bueno (2002), foram de 165,6 para o volume final e 5,34 horas para o tempo de incubação do feno de Tifton incubado com inóculos provenientes de animais alimentados exclusivamente pelo alimento testado.

Castro et al. (2005) observou valores entre 232 a 237 ml de gás por g de MS em capim *Brachiaria* submetido a várias idades de corte e não observou

diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os tratamentos nas taxas de fermentação observadas em cada período de tempo.

O volume final de gases ou potencial máximo de produção de gases é um bom indicador da degradação do substrato uma vez que quando as altas taxas de degradabilidade diminuem, as exigências para manutenção microbiana também diminuem e talvez a eficiência microbiana aumente. Os valores de degradabilidade refletem o quanto do substrato foi usado para a formação de todos os produtos da fermentação, nomeadamente, os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), gases e biomassa microbiana (Blummel, 2003).

A regressão entre a degradação da MS estimada após 96 horas de incubação *in vitro* e o volume final, neste experimento, mostrou coeficientes de regressão significativos ($p < 0,0006$) para as funções linear, quadrática e cúbica. Porém, as taxas de determinação desses modelos são muito baixas. A melhor taxa de determinação foi $r^2 = 25\%$ para a equação:

$$Y = -0,338 - 0,6448X^3 + 0,4673X^2 + 0,107X$$

Onde Y = degradação *in vitro* após 96 horas

X = produção de gás

Os valores de degradação da matéria seca depois de 96 horas de incubação não foram diferentes significativamente ($p < 0,005$) entre os tratamentos.

Contudo, mesmo quando não ocorrem diferenças na degradação do alimento, podem ocorrer diferenças na taxa de fermentação. No modelo de Francês (1993), a taxa de fermentação das diversas frações do alimento varia ao longo do tempo.

As curvas para as taxas de fermentação das diversas dietas em estudo incubadas com líquido ruminal ou fezes, são apresentadas nas figuras 5 e 6.

Quando a fonte de inóculo foi o líquido ruminal as diferenças entre as curvas não são muito destacadas. Mas, o tratamento 3 (0,2 mg de salinomicina/kg

de peso vivo) foi o que teve maiores taxas de fermentação em todos os momentos.

As diferenças entre as taxas de fermentação das diferentes dietas são mais evidentes, quando as fezes foram usadas como fonte de inóculo. As maiores taxas de fermentação ao longo de todo o tempo foram apresentadas pelo tratamento 4 (0,3 mg de salinomicina/ kg de peso vivo). Observou-se que todos os tratamentos com salinomicina tiveram taxas de fermentação maiores do que o tratamento sem salinomicina.

As médias e coeficientes de variação do N-amoniaco e pH do líquido ruminal coletado 3 horas após o fornecimento da alimentação matinal aos novilhos, em função do nível de salinomicina na dieta, são apresentados na Tabela 5. Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Todos os tratamentos foram maiores do que o valor de 5 mg / 100ml considerado o nível mínimo ideal para o funcionamento normal do rúmen (Given e Bates, 1985).

Os valores de pH ruminal, também não foram afetados pelos níveis de salinomicina e todos estiveram dentro do intervalo considerado normal para bovinos.

Tabela 9 – Valores médios do potencial máximo de produção de gases (A), tempo de colonização (L), taxa de produção de gases (μ) e produção acumulada de gases (Y) segundo o tempo de incubação de feno de coast cross e sal proteinado com vários níveis de salinomomicina, incubado com inoculo ruminal (LR) ou fezes (FZ) de novilhos alimentados com a dieta correspondente ao substrato

Variável	Níveis de salinomomicina (mg/ kg de peso vivo)							
	0		0,1		0,2		0,3	
	LR	FZ	LR	FZ	LR	FZ	LR	FZ
A(ml/gMS)	164,55 ^{bc}	231,84 ^a	166,03 ^{bc}	204,29 ^{ab}	164,33 ^{bc}	168,45 ^{bc}	169,66 ^{bc}	157,78 ^c
A	0,05 ^a	0,009 ^a	0,05 ^a	0,01 ^a	0,06 ^a	0,02 ^a	0,05 ^a	0,02 ^a
Vo	0,23 ^a	0,04 ^a	0,22 ^a	0,07 ^a	0,27 ^a	0,08 ^a	0,21 ^a	0,09 ^a
μ (/h)	0,06 ^a	0,06 ^a	0,07 ^a	0,06 ^a	0,011 ^a	0,02 ^a	0,02 ^a	0,03 ^a
L(h)	5,62 ^a	4,44 ^a	6,25 ^a	6,39 ^a	5,60 ^a	5,32 ^a	5,29 ^a	5,68 ^a
Y (ml)								
3h	2,80 ^{ab}	0,00 ^d	2,03 ^{bc}	0,10 ^{cd}	4,12 ^a	0,15 ^{cd}	3,90 ^{ab}	0,03 ^d
6h	5,26 ^{ab}	3,47 ^{abc}	3,51 ^{abc}	1,68 ^c	6,60 ^a	2,94 ^{bc}	6,56 ^a	2,37 ^{bc}
10h	10,20 ^{ab}	9,90 ^{ab}	8,00 ^{ab}	7,56 ^b	11,22 ^{ab}	7,97 ^{ab}	11,77 ^a	7,77 ^{ab}
23h	37,25 ^b	18,19 ^c	36,99 ^b	13,81 ^c	43,39 ^a	15,74 ^c	39,71 ^{ab}	15,81 ^c
48h	102,37 ^a	42,10 ^b	98,89 ^a	48,28 ^b	106,08 ^a	51,51 ^b	96,74 ^a	61,15 ^b
72h	138,39 ^a	78,12 ^b	138,11 ^a	80,09 ^b	145,13 ^a	81,16 ^b	140,35 ^a	78,98 ^b
96h	152,81 ^a	99,44 ^b	155,88 ^a	98,35 ^b	155,88 ^a	94,81 ^b	155,64 ^a	95,72 ^b
Deg(%)	45,31 ^a	43,97 ^a	45,64 ^a	45,51 ^a	45,77 ^a	42,26 ^a	45,03 ^a	45,51 ^a

a, b, c médias seguidas por letras diferentes , nas linhas, diferem entre si ($p < 0,05$)

Figura 5 - Taxa de fermentação (/hora) do feno de coast cross com sal proteinado sem salinomicina; com 0,1; 0,2 e 0,3 mg de salinomicina por kg de peso vivo, utilizando como inoculo líquido ruminal de bovinos alimentados com dietas semelhantes ao substrato.

Figura 6 - Taxa de fermentação (/hora) do feno de coast cross com sal proteinado sem salinomicina; com 0,1; 0,2 e 0,3 mg de salinomicina por kg de peso vivo, utilizando como inoculo as fezes de bovinos alimentados com uma dieta similar ao substrato.

Fora de lugar

62 ✓

Tabela 10.- Médias e coeficiente de variação para N – amoniacal (ml/ 100ml de líquido ruminal) e PH de novilhos alimentados com feno de coast cross e sal proteinado com vários níveis de salinomicina

Item	Níveis de salinomicina mg/ Kg de peso vivo				CV(%)
	0	0,1	0,2	0,3	
N – amoniacal	18,28 ^a	19,02 ^a	15,97 ^a	17,48 ^a	10,13
PH	6,82 ^a	6,80 ^a	6,84 ^a	6,86 ^a	1,90

5. Conclusões

*Diferentes da apresentação
Reiter*

A salinomicina não influenciou o consumo e a digestibilidade aparente da matéria seca, fibra em detergente neutro e proteína bruta. *do que?*

A degradação in situ da matéria seca do feno, matéria seca do sal proteinado, da fibra em detergente neutro do feno e proteína bruta, não foram influenciados significativamente pelas doses de salinomicina.

A degradação in vitro da matéria seca após 96 horas de incubação, não foi diferente significativamente entre os tratamentos.

Os únicos parâmetros onde foram detectadas alterações entre os tratamentos foram o volume final de gases produzidos in vitro e nas curvas das taxas de fermentação.

A fonte de inóculo influenciou significativamente ($p < 0,05$) todos os parâmetros avaliados. As fezes foram mais sensíveis às alterações ocorridas nos parâmetros volume final de gases e nas taxas de fermentação.

Bibliografia

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS Official methods of Analysis. 15ed. Airlington: AOAC, 1990. 1298p.

BAGLEY, C.P., FEAZEL, J. I., MORRISON, D. G., E LUCAS, D. M., Effects of salinomycin on ruminal characteristics and performance of grazing beef steers. *J. Anim. Sci.* 66:792 -797. 1988

BERGEN, W.G.; BATES, D.B., Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. *J. Anim. Sci.*, 58:1465-83.1984.

BLUMMEL, A., KARSIL A., RUSSEL J.R., Influence of diet on growth yield of variable carbon fluxes to fermentation products .British Journal of Nutrition (90), 625-634, 2003.

BUENO, I.C.S., CABRAL FILHO, S.L.L., GOBBO, S.P., LOUVANDINI, H., VITTI, D.M.S.S., ABDALLA, A.L., Influence of inoculum source in a gás production method. *Animal Feed Science and technology*, 123 – 124, 95-105, 2005.

BUENO, I.C.S., Cinética digestiva e síntese microbiana de ovinos alimentados com fenos de três qualidades distintas. Tese de Doutorado CENA/USP (2002).

CABRAL, L.S., VALADARES FILHO, S.C., ZERVOUDAKIS, J.T., SOUZA, A.L., DETMANN, E., Estimativa da degradação ruminal da proteína bruta por intermédio dos métodos in situ e in vitro: validação: 41ª Reunião da SBZ. Campo Grande, MS. 19 de Julho, 2004.

CHANEY, A.L., MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and amonia. *Clinical Chemistry*, v.8, n.2, p 130 – 132, 1962

CHEN, X.B. Neway Excel – A utility for processing data of feed degradability and in vitro gas production. Versão 6. 1997.

CASTRO, G.H.F., GONÇALVES, L.C., GRAÇA, D.S., RODRIGUEZ, N.M., BORGES, I., TOMICH, R.T., MAURÍCIO, R.M., Avaliação da brachiaria brizantha cv marundu colhida em quatro diferentes idades pela técnica in vitro semi-automática de produção de gases. 42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. 25 a 28 de Julho de 2005. Goiânia, Goiás.

CONE, J.W., VAN GELDER, A.H., BACHMANN, H., Influence of inoculum source on gas production profiles. *Anim Feed Sci Technology*. 99, 221 – 231. 2002.

DHANOA, M.S., FRANCE, J., CROMPTON, L.A., MAURÍCIO, R.M., KEBREAB, E., MILLS, J.A.N., SANDERSON, R., DIJKSTRA, J., LOPEZ, S., Technical note: A proposed method to determine the extent of degradation of a feed in the rumen from the degradation profile obtained with the in vitro gas production technique using faeces as the inoculum. *J. Anim. Sci.*, 82, 733 – 746, 2004.

FONTENOT, J.P., WEBB, K.W., LUCAS, D.M., Effect of salinomycin on in vitro ruminal volatile fatty acids. *J. Anim. Sci.* 51 (suppl. 1):360 (Abstract). 1980.

JONHSON, K.A. E JONHSON, D.E., Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73:2483-2492. 1995

FRANCE, J., DHANOA, M.S., THEODOROU, M.K., LISTER, S.J., DAVIES, D.R., E ISAC, D. A model to interpret gas accumulation profiles with in vitro degradation of ruminant feeds. *J. Theor. Biol.* 163: 99-111. 1993

GIVENS, D.I., e MOSS, A.R. The nutritional value of cereal straw for ruminants. A Review. **Nutrition Abstracts and Reviews** (Series B), Nov, vol 65. No 11, 1995.

JUNG, H.G., E ALLEN, M.S., Characteristics of plant cell walls affecting intake and Digestibility of forages by ruminants. *J.Anim.Sci.*1995 73:2774 – 2790

ÍTAVO, L.C.V., VALADARES FILHO, S.C., SILVA, F.F., VALADARES, R.F.D., CECON, P.R., ÍTAVO, C.C.B.F., MORAES, E.H.B.K., PAULINO, P.V.R., Consumo, degradabilidade ruminal e digestibilidade aparente de fenos de gramíneas do gênero *Cynodon* e rações concentradas utilizando indicadores internos. *R. Brás. Zootecnia.*, v.31, n.2, p.1024 – 1032, 2002 (suplemento).

HUNTINGTON, J.A., LAWRENCE, T.L.J. (EDS), In vitro techniques for measuring nutrient supply to ruminants, BSAS, Edinburgh, UK, 182 – 184, BSAS OCC Publ. No 22. 1998b.

KOBAYASHI, Y., WAKITA, M., HOSHINUO, S., Effects of the ionophore salinomycin on nitrogen and long – chain fatty acid profiles of digesta in the rumen and the duodenum of sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 36, 67 – 76. 1992.

LANA, R.P., RUSSEL, J., Efeitos da monensina sobre a fermentação e sensibilidade de actérias ruminais de bovinos sob dietas ricas em volumoso ou concentrado. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30 (1): 254-260, 2001.

LANA, R.P., OLIVEIRA, J. S., BORGES, A.C., VELOSO, R.G., NUNES, P. M. M, Efeito da monensina e lasalocida sobre a atividade da fermentação de aminoácidos in vitro pelos microrganismos ruminais. *R. Brasileira de Zootecnia*, v31, n.2, p.724-730, 2002

- LENG, R..A. Drought feeding strategies: Theory and practice. Pernambul Books. 1992, 162pp.
- LENG, R..A. Quantitative ruminant nutrition _a green science. *Aust. J. Agric. Res.* 44:363-80. 1993.
- MCDONALD, I., A revised model for estimation of protein degradability in the rumen. *Journal of Agricultural Science*, v.96, p.251 – 252, 1981.
- MERCHEN, N. R. E BERGER, E. L., Effect of salinomycin on nutrient digestibility and ruminal characteristics of sheep and feedlot performance of cattle. *J. Anim. Sci.* 60(5):1338-1345. 1985
- MACHADO, M.C., GOBBO, S.P., PEÇANHA, M.R.S.R., CASTILHO, L.A., BUENO, I.C.S., ABDALLA, A.L., Equações de conversão de pressão em volume da técnica de produção de gases in vitro na avaliação de braquiárias. *Anais do VI Encontro de iniciação Científica*, vol.1, Piracicaba, USP, p.548. 1998.
- MAURÍCIO, R.M., ABDALLA, A.L., MOULD, F.L., ALTAF, U.R., SMITH, T., OWEN, E., GIVENS, D.I., DHANOA, M.S., THEODOROU, M.K., Comparison of bovine rumen liquor and faeces as sources of microorganisms for the in vitro gas production technique assessed using twelve graminaceous forages. *Proc. Br. Soc. Anim. Sci.*, 68, 1998a.
- MAURÍCIO , R.M., OWEN, E., DHANOA, M.S., THEODOROU, M.K., Comparison of rúmen liquor and faeces from cows as sources of microorganisms for the in vitro gas production technique. In: Deaville, E.R., Owen, E., Adesogen, A.T., Rymer, C., 1999

MAURÍCIO, R.M., MOULD, F.L., DHANOA, M.S., OWEN, E., CHANNA, K.S., THEODOROU, M.K., A semi – automated in vitro gás production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Animal feed science and Technology*. 79, 321 – 330., 1999.

MAURÍCIO, R.M., OWEN, E., MOULD, F.L., GIVENS, I., THEODOROU, M.K., FRANCE, J., DAVIES, D.R., DHANOA, M.S., Comparison of bovine rumen liquor and bovine faeces as inoculum for an in vitro gas production technique for evaluating forages. *Animal Feed Science and Technology*. 89, 33-48, 2001.

MAURÍCIO, R.M., PEREIRA, L.G.R., GONÇALVES, L.C. et al. Relação entre pressão e volume para a implantação da técnica in vitro semi – automática de produção de gases na avaliação de forrageiras tropicais. *Arquivos Brasileiros de medicina Veterinária*, v.55, p.216 -219, 2003.

MCGUFFEY R. K.; RICHARDSON, L. F.; WILKINSON, J. I. D., Elanco. Animal Health Greenfield, IN 46140. *J. Dairy Sci.* 2001. www.adsa.org/jds/abs/2001/jds

MENKE, K.H., STEINGASS, H., Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal research and development*. 28, 7 – 55. 1988.

NETTO, A.S., ZANETTI, M.A., FAFTINE, O.L.J., SALADINI, M.S.V., VALARELLI, R.L., MERGULIS, S.C.F., Efeito da adição de salinomicina no sal proteinado sobre o desempenho de novilhas nelore em regime de pastejo em *Brachiaria Decumbens*, 41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. 19 de Julho a 22 de Julho de 2004 – Campo Grande, MS.

NASCIMENTO FILHO, V.F., Técnicas analíticas nucleares de fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF) e por reflexão total (TXRF). Piracicaba: ESALQ, Depto. de Física e Meteorologia; CENA, 1999. 32 p.

http://web.cena.usp.br/apostilas/Virgilio/cen-5723/EDXRF_TXRF.doc

ORSKOV, E.R., McDONALD, I. A revised model for estimation of protein degradability in the rumen. *Journal of Agricultural Science*, v. 96, p. 251 -252, 1981.

ORTOLAN, J.M., Efeitos da levedura, monensina sódica e salinomicina na degradabilidade, parâmetros ruminais e protozoários ciliados de novilhos Nelore arraçoados com dietas concentradas. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo. 2005

PAULINO, M.F., DETMAN, E., ZERVOUDAKIS, J.T., Suplementos múltiplos para recria e engorda de bovinos em pastejo. In II Simpósio de Produção de gado de corte. Pg 187 – 229. Viçosa, 14 – 17 Junho, 2001.

REFFETT-STABEL, J., SPEARS, J. W., HARVEY, R. W., LUCAS, D. M. ,
Salinomycin and lasalocid effects on growth rate, mineral metabolism and ruminal fermentation in steers. *J. Anim. Sci.* 67:2735-2742. 1989.

RUSSELL, J.B.; STROBEL, H.J., Minireview. Effect of ionophore on ruminal fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55:1-6. 1989.

RYMER, C., HUNTINGTON, J.A., GIVENS, D.I. Effects of inoculation preparation method and concentration, method of inoculation and pre-soaking the substrate on the gas production profile of high temperature dried grass. *Animal Feed Science Technology*, 78, 199-213, 1999.

- RYMER, C., HUNTINGTON, J.A., WILLIAMS, B.A., GIVENS, D.I., In vitro cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Animal Feed Science and technology* 123-124, 9-30, 2005.
- SÁNCHEZ, T.A.E., GUTIÉRREZ, O.A.J., TAPLA, E., GONZÁLEZ, V.F.E., PALOMO, L.A.A. Efecto de la salynomicina y la monensina sodica sobre el comportamiento de borregos en engorda intensiva. *Memórias VI Reunión Nutricion Animal*. Octubre de 1997. Pg 90—92. 1997
- SILVA, D.J., *Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)*. Viçosa. 1981. 166p.
- SILVA, J.F.C., LEÃO, M.I. *Fundamentos de nutrição de ruminantes*. 1. ed. Piracicaba: Livrocere; 1979. 380p.
- SMITH, A.M., REID, J.T., Use of chromic oxide as an indicator of fecal output for the purpose of determining the intake of a pasture herbage by grazing cows. *J. Dairy Sci.*, 38 (5): 515 – 524. 1955.
- TEDESCHI, L.O.; FOX, D.G., RUSSEL, J.B. Accounting for the effects of a ruminal nitrogen deficiency within the structure of the Cornell net carbohydrate and protein system. *Journal of Animal Science*. V. 78, p.1648 – 1658, 2000.
- 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*. 79, 321-330, 1994.
- TITGEMEYER, E.C. Design and interpretation of nutrient digestion studies. *Journal of Animal Science*, v.75, n.8, p.2235-2247, 1997.

VALADARES, R.F.D., GONÇALVES, L.C., SAMPAIO, I. B. et al. Níveis de proteína em dietas de bovinos. 4. Concentração de uréia plasmática e excreção de uréia e creatinina. *Revista Brasileira de Zootecnia*. V.26, n.6, p.1270-1278, 1997.

VALADARES FILHO, S.C., PAULINO, P.V., MAGALHÃES, K.A., Modelos nutricionais alternativos para a otimização de renda na produção de bovinos de corte. In III Simpósio de Produção de Gado de Corte, Pg 197 – 254. Viçosa, 30 – 31 de Maio e 1 de Junho de 2002.

VALINOTE, A.C. NOGUEIRA FILHO, J.C.M., LUZ E SILVA S., ALMEIDA R., LEME PR, LANNA D.P.D. Efeitos da virginiamicina e da salinomicina nos protozoários no rúmen de novilhos Nelore em terminação. 41ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. 19 de Julho a 22 de Julho de 2004. Campo Grande, MS.

VAN SOEST, P.J. Development of a comprehensive system of feed analysis and its application to forage. *J. Anim. Sci.*, 26(1):119-128, 1967

VARGA, G.A. e KOLVER, E.S., Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilization. In: Conference: New developments in forage science contributing to enhanced fiber utilization by ruminants. American Society for Nutritional Sciences. 1997.

WILLIAMS, B.A., Cumulative gas – production techniques for forage evaluation. CAB International. Forage Evaluation in ruminant nutrition (eds D.I Givens, Owen, E., Axford, R.F.E e Omed, H.M.) 2000

ZINN, R. A., Effect of salinomycin supplementation on characteristics of digestion and feedlot performance of cattle. *J. Anim. Sci.* 63:1996-2004. 1986.